pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 5, pp. 390~401 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.5.390

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

식품 중 락카인산 성분 분리정제를 통한 분석법 확립 및 실태조사

신재욱[1] · 이현주[2] · 임은주[3] · 김정복[2]*

[1]한국식품과학연구원 연구사업팀
[2]유한대학교 건강생명학부 유한생명바이오학과
[3]㈜피크만에스피

Analytical Method for Determination of Laccaic Acids in Foods with HPLC-PDA and Monitoring

Jae Wook Shin[1], Hyun Ju Lee[3], Eunjoo Lim[2], Jung Bok Kim[3]*

[1]Korea Advanced Food Research Institute, Uiwang, Korea
[2]Dept. of Yuhan Biotechnology, Schcool of Bio-Health Sciences, Yuhan University Bucheon, Korea
[3]Peakmansp, Hanam, Korea

(Received April 26, 2023/Revised August 21, 2023/Accepted August 22, 2023)

ABSTRACT - Major components of lac coloring include laccaic acids A, B, C, and E. The Korean Food Additive Code regulates the use of lac coloring and prohibits its use in ten types of food products including natural food products. Since no commercial standards are available for laccaic acids A, B, C, and E, a standard for lac pigment itself was used to separate laccaic acids from the lac pigment molecule. A standard for each laccaic acid was then obtained by fractionation. To obtain pure lac pigment for use in food by High performance Liquid Chromatography Photo Diode Array (PDA), a C8 column yielded the best resolution among various tested columns and mobile phases. A qualitative analytical method using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Tandem Mass(LC-MS/MS) was developed. The conditions for fast and precise sample preparation begin with extraction using methanol and 0.3% ammonium phosphate, followed by concentration. The degree of precision observed for the analyses of ham, tomato juice and Red pepper paste was 0.3–13.1% (Relative Standard Deviation (RSD%)), degree of accuracy was 90.3–122.2% with r^2=0.999 or above, and recovery rate was 91.6–114.9%. The limit of detection was 0.01–0.15 μg/mL, and the limits of quantitation ranged from 0.02 to 0.47 μg/mL. Lac pigment was not detected in 117 food products in the 10 food categories for which the use of lac pigment is banned. Multiple laccaic acids were detected in 105 food products in 6 food categories that are allowed to use lac color. Lac pigment concentrations range from 0.08 to 16.67 μg/mL.

Key words: Lac color, Laccaic acid, Method validation, HPLC-PDA, LC-MS/MS

색소는 일반적으로 가시광선 350-750 nm 범위에서 파장을 흡수할 수 있는 색을 나타낼 수 있는 물질을 말하며, 식품에 존재하는 색소는 천연적으로 존재하는 자연 색소와 착색을 목적으로 하는 합성 색소로 구분되며 식품첨가물에서는 착색료로도 구분할 수 있다. 식품첨가물인 락색소의 경우 인도, 동남아, 중국 등지에서 주로 서식하는 패각충과 락패각충(*laccifer lacca KERR. coccidae*)의 유충이 분비하는 수지상 물질을 물로 추출하여 얻어진 색소로서 락카인산(laccaic acid)류를 주성분으로 하는 색소이다[1].

우리나라의 경우 락색소는 식품 및 식육가공품 등에서는 사용이 허용되지만, 천연식품, 다류, 커피, 고춧가루 및 실고추, 김치류, 고추장, 조미고추장, 식초 및 향신료가공품에는 사용할 수 없도록 사용기준이 설정되어있다[2]. 최근 축산물 가공식품과 식육가공품 등에서 발색제의 용도

*Correspondence to: Jung Bok Kim, Dept. of Yuhan Biotechnology, Schcool of Bio-Health Sciences, Yuhan University Bucheon 14780, Korea
Tel: +82-2-2610-0872, Fax: +82-2-2610-0874
Email: amsam@yuhan.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

로 사용되는 아질산에 대한 소비자의 부정적 인식 증가로 인해 식육가공품 등에서 아질산을 대체하여 색도 유지를 위해 그 사용이 증가하고 있는 추세이다.

락색소의 주된 색소 성분은 안트라퀴논계인 laccaic acid 이며, 유사한 구조를 가지는 5가지의 anthraqinone carboxylic acid A, B, C, D, E로 존재하며 일반적으로 주요 성분은 laccaic acid A와 B로 알려져 있다[3]. 보고된 분석 방법으로는 thin layer chromatography (TLC) 방법이 일반적이고, 락색소의 순도를 높이기 위해 preparative TLC으로 정제하고 있으나 시료에 존재하는 락색소 정량분석으로는 적합하지 않은 분석방법이다[4].

우리나라 식품 중 식품첨가물 분석법에서 RP-C18 TLC plate를 이동상(methanol:0.5N-80% methanolic oxalic acid =6:4, v/v)을 사용하여 분리하고 있는 실정이다. Hong 등[5]은 spectrophotometer를 이용하여 락색소를 이루고 있는 주성분의 기본 구조인 anthraquinone을 분석하여 총 anthraquinone 함량을 구하고 락색소를 구성하고 있는 laccaic acid A, B, C, D, E를 HPCE를 이용하여 성분비를 확인하였다[5-7]. Wouters 등[8]은 색소들이 가지고 있는 특정 파장을 이용하여 분석이 가능하다는 것이 보고되었다.

하지만 락색소의 경우 식물뿐만 아니라 곤충으로부터 유래될 수 있는 여러 가지 성분을 함유한 색소로서 성분 하나를 독립적으로 분리하여 정량분석을 하기 위해 HPLC와 photodiode array detector (PDA)를 이용하였다. 이 논문에서는 *Kerria lacca* 곤충에서 추출한 시료에서 존재하는 색소의 분리 및 검출을 위해 분석 방법을 적용하였다[9].

Santos 등[9], Rafaelly 등[10], Szostek 등[11], Novotna 등[12]의 연구에서는 HPLC를 사용하여 laccaic acid를 분리한 후 PDA와 mass spectrometric detector를 이용하여 락색소를 분석하였다.

HPLC-MS를 이용하여 락색소를 분석한 Santos 등[9]의 연구에서는 mass spectrometer (MS)가 제공하는 구조 정보를 이용하여 시료에 존재하는 화합물의 정성분석을 실시하였고, 이러한 방법을 이용하여 미량의 시료 중에서도 높은 감도의 단일 물질 분석이 가능한 것을 장점이라고 보고하였다. 또한 Szostek 등[11] HPLC-UV-Vis와 MS를 결합한 분석 장비를 이용하여 섬유 시료 중 천연염료인 락색소를 분석하였다. Novotna 등[12]은 직물의 염료 중에서 HPLC을 이용하여 락색소의 구성성분인 laccaic acid A와 B의 표준물질을 이용하여 분석하였다.

현재 국제기구인 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)나 European Food Safety Authority (EFSA)에서 Acceptable Daily Intake (ADI)가 설정되어 있지 않지만 락색소의 주산지인 인도에서는 2 mg/kg/day로 설정되어있다.

Laccaic acid에 대한 독성 연구는 아직까지 많이 보고되지 않았으며, 현재 식품에서 식품첨가물인 착색료로 많이 사용하고 있지만 개별물질로 사용기준이 설정되어 있지 않은 실정이다. Dube 등[13]의 연구에 따르면 단기 분석법을 통해 돌연변이 유발성 및 세포독성을 평가한 결과 고농도의 laccaic acid는 종양 촉진제의 역할을 수행될 수 있다고 보고되었다. 최근 수행된 식품의약품안전처에서는 락색소의 인체알레르기 안전성 연구를 위해 약 2년여간 유전, 면역독성시험을 수행하였다. 그 결과 rat을 이용하여 독성 확인 결과 유전독성 음성, 면역독성은 4 mg/kg 이하에서 독성이 없는 것으로 보고되었다[14].

본 연구에서는 5가지 laccaic acid 중 4가지 laccaic acid A, B, C 그리고 E에 대한 Prep-LC 분리정제 방법 확립을 통해 각각의 표준품을 확보하는 분석조건과 유효성이 검증된 정성 및 정량 분석법을 확립하여 시료에 존재하는 미량의 성분까지도 분석할 수 있는 분석법을 확립하였다. 또한 고체, 액체, 페이스트 등 다양한 메트릭스를 적용하여 분석법을 확립하여 객관적이고 과학적인 실험 결과를 도출하였다. 향후 본 연구 결과를 이용하여 laccaic acid 개별 성분에 대한 활성, 독성 연구 및 기준규격 설정, 관리의 참고자료가 될 수 있다.

Materials and Methods

시약 및 재료

분석법 개발과 정량분석에 사용된 표준품 확보를 위해 natural red 25 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 구입하여 사용하였다. 전처리 및 분석에 사용된 acetonitrile, methanol, Hexane 등은 J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 HPLC 등급으로 구매하여 사용하였다. 분석에 사용된 이동상 시약인 trifluoroacetic acid (99.0%, TFA)와, acetyl acetone (99.0%) 그리고 ammonium phosphate (Sigma-Aldrich)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 시험에 사용된 일반 시약들은 특급시약 및 HPLC 등급을 사용하였다.

표준물질 분리정제

락색소의 4가지성분인 laccaic acid A, B, C, E의 상용화된 표준품이 시판되지 않아 Sigma-Aldrich사의 Natural red 25를 구매하여 laccaic acid류를 분취하고, 개별 표준품을 확보하여 식품 중 개별 laccaic acid의 함량을 분석하고자 하였다.

분취는 확립된 기기 분석조건을 토대로 Shiseido사(Osaka, Japan)의 HPLC-PDA를 이용하여 실시하였다. Fig. 1과 같이 laccaic acid A, B, C, E 중 C와 E는 구조가 매우 유사하여 확립된 기기조건 내에서 retention time의 차이가 적고, laccaic acid A와 B 역시 서로 구조가 유사하여 retention time의 차이가 적은 것을 감안하여 편의상 Group A (laccaic acid C 및 E), Group B (laccaic acid A 및 B)

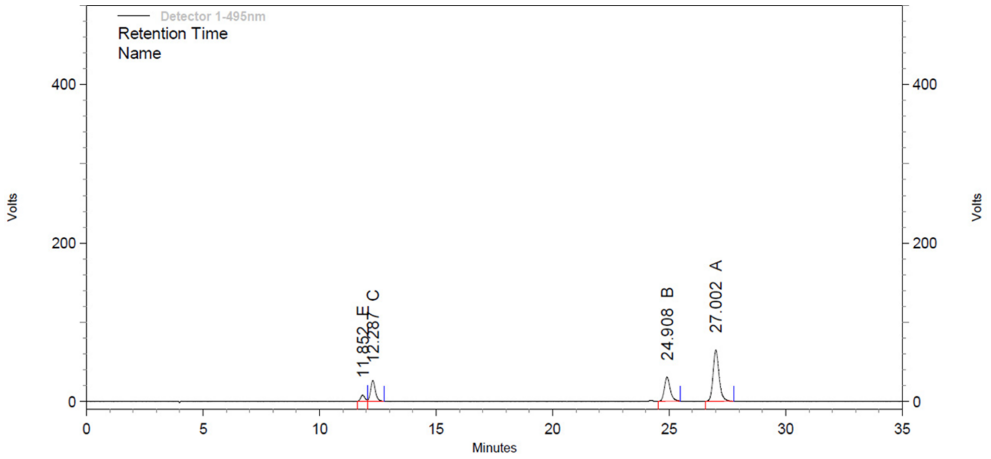

Fig. 1. HPLC-PDA chromatogram of a standard mixture of laccaic acid A, B, C, and E.

Table 1. Condition of Pre LC system (Group A and B)

Column	Capcellpak C18 UG120 (20 mm×250 mm, 5 μm, Shiseido)
HPLC Instrument	Auto-sampler (Shiseido 3023), High-pressure valve (Shiseido 3012), UV-Vis detector (Shiseido 3002), Degassing unit (Shiseido 3009), HPLC pump (Shiseido 3001)×2 set, Column oven (Shiseido 3004)
Preparation condition	Mobile phase A, B : 45% methanol with 0.2% TFA Flow rate : 2.0 mL/min each (total flow 4.0 mL/min) Oven temp. : 50°C Injection volume : 400 μL Detection : 490 nm
Switching valve	Valve A : 11.0 min to position B (collection), 18.0 min to position A Valve B : 23.0 min to position B (collection), 32.0 min to position A

Table 2. Condition of Pre LC system (Group A:laccaic acid C and E)

Column	Capcellpak C18 UG120(4.6mm×250 mm, 5 μm, Shiseido)		
HPLC Instrument	Auto-sampler (Shiseido 3023), High-pressure valve (Shiseido 3012), UV-Vis detector (Shiseido 3002), Degassing unit (Shiseido 3009), HPLC pump (Shiseido 3001)×2 set, Column oven (Shiseido 3004)		
Preparation condition	Mobile phase A : 0.2 % TFA in water B : 0.2 % TFA in acetonitrile		
	Time(min.)	% B	% A
	Init.	5	95
	40.0	15	85
	40.1	5	95
	50.0	5	95
	Flow rate : 1.0 mL/min each Oven temp. : 40°C Injection volume : 10 μL Detection : 490 nm		
Switching valve	Valve A : 32.4 min to position B (collection), 33.8 min to position A Valve B : 34.1 min to position B (collection), 35.0 min to position A		

Table 3. Condition of Pre LC system (Group B:laccaic acid A and B)

Column	Unison UK C8 (4.6mm×150 mm, 3 μm, Imtakt)		
HPLC Instrument	Auto-sampler (Shiseido 3023), High-pressure valve (Shiseido 3012), UV-Vis detector (Shiseido 3002), Degassing unit (Shiseido 3009), HPLC pump (Shiseido 3001)×2 set, Column oven (Shiseido 3004)		
Preparation condition	Mobile phase A : 0.2 % TFA in water B : 0.2 % TFA in acetonitrile		
	Time (min.)	% B	% A
	Init.	10	90
	30.0	19	81
	35.0	40	60
	35.1	10	90
	45.0	10	90
	Flow rate : 0.8 mL/min each Oven temp. : 40°C Injection volume : 10 μL Detection : 490 nm		
Switching valve	Valve A : 22.2 min to position B (collection), 23.2 min to position A Valve B : 25.0 min to position B (collection), 26.1 min to position A		

Table 4. Instrumental conditions of Laccaic acid A, B, C and E with HPLC-PDA

HPLC	Column	Unison UK C8 (4.6 mm×250 mm, 3 μm)					
	Oven temp.	40°C					
	Mobile phase	A : 0.3% TFA in water B : 0.3% TFA in methanol					
	Gradient	Time (min)	0.0	10.0	12.0	27.0	27.1	35.0
		A(%)	70	70	68	62	70	70
		B (%)	30	30	32	38	30	30
	Flow rate	0.8 mL/min						
	Injection volume	5°C						

나누어 분취를 진행하였다. Group A와 B를 분취를 위하여 락색소 표준품을 메탄올을 이용하여 10%의 농도로 한 후 Table 1과 같은 조건에서 분취를 실시하였으며, Group A의 laccaic acid C와 E의 분취 조건은 Table 2, Group B의 laccaic acid A와 B의 분취조건은 Table 3과 같다.

시료 전처리 방법

식품 및 가공품 중 락색소의 4가지 성분의 시료전처리 방법은 아래와 같다. 즉, 시료 2 g을 정밀히 취하여 메탄올 20 mL, 0.3% ammonium phosphate ((NH_3) H_2PO_4) 5 mL, 헥산 20 mL를 가한 후 5분간 초음파 추출을 하고, 다시 5분간 진탕 추출한다. 4,000× g 에서 5분간 원심분리한 후 round flask에 상등액을 취하고, 잔사는 다시 재추출을 하여 상등액을 모두 모은 후 40°C에서 감압농축기를 이용하여 완전히 건조하였다. 건고물에 이동상 1:1 용액 1 mL를 가하여 잘 녹이고, 0.45 μm membrane filter를 이용하여 여과 후 HPLC에 주입한다.

기기분석 조건

락색소의 4가지 성분 laccaic acid A, B, C 및 E 정량분석을 위한 HPLC 분석조건은 다음과 같다. 분석장비로는 Shiseido사(SL-2, Shiseido) HPLC 제품을 이용하였다. 분석용 컬럼은 Capcellpak ADME (4.6×100 mm, 2.7 μm, Shiseido)을 사용하였고, 이동상은 A (0.05% TFA contained 5 mM acetyl acetone in DW)와 B (acetonitrile)를 70 : 30 (v/v)의 비율로 하였다. 유속은 0.2 mL/min, 컬럼 오븐은 40°C였다(Table

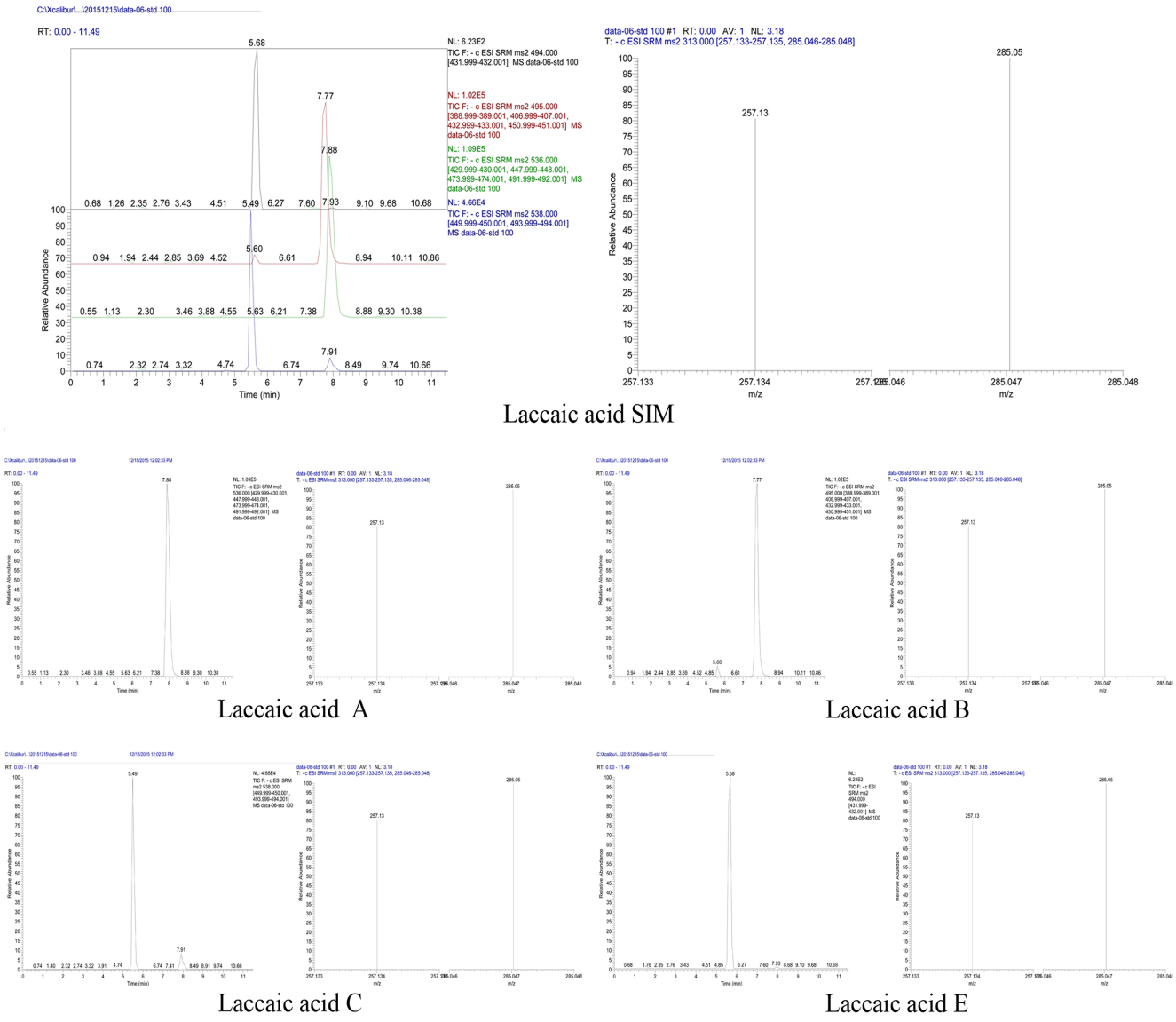

Fig. 2. Chromatogram of laccaic acid A, B, C and E standard with LC-MS/MS

4). 정성분석을 위해서 LC-MS/MS (TSQ Quantum, Thermofisher, Waltham, MA, USA)를 이용하였고(Fig. 2), Ionization mode는 electrospray ionization (ESI)에서 negative ion mode을 이용하여 SRM조건을 탐색하였다. 락색소의 4가지 laccaic acid 분석물의 single reaction monitoring (SRM)은 다음과 같다.

Laccaic acid A (MW=536, Negative)의 SRM은 m/z=492 (14,64), m/z=474(21,64), m/z=448(19,64), m/z=430(26,64)이며, Laccaic acid B (MW=495, Negative) m/z=451 (14,55), m/z=433(20,55), m/z=407(17,55), m/z=389(26,55), Laccaic acid C (MW=538, Negative), m/z=494(14,69), m/z=450(19,69), Laccaic acid E (MW=494, Negative), m/z=432(19,103), m/z=285(20,235)이었으며 이를 이용하여 분석을 실시하였다(Table 5).

시험법 유효성 검증

본 연구에서는 matrix 선정을 위해 시중에 유통되고 있는 색소 사용이 가능한 것과 불가능한 식품시료를 고려하여 3가지로 선정하였다. 고체 시료로는 햄, 액체시료는 토마토 쥬스, 페이스트 시료로는 색소를 첨가한 고춧가루로 만든 고추장을 blank로 선정하였다. 선정된 3가지 blank를 이용하여 method validation를 실시하였다. 유효성 검증 항목으로는 분석물질과 matrix의 방해와 간섭을 확인하기 위해 선택성, 특이성, 직선성, 정밀성, 정확도 및 회수율을 확인하였다. 락색소 성분 4가지 중 laccaic aicd A와 C에 2가지 성분에 대해 측정불확도 산출을 위해 불확도 요인을 선정하였다. 불확도 요인은 총 6가지로 표준품의 순도, 표준품의 제조, 검량선 3가지 농도, 검량선(회귀분석), 시료의 반복 측정 등으로 불확도 요인을 Fig. 3과 같이 설

Table 5. Instrumental conditions of laccaic acid A,B,C and E with LC-MS/MS

Instrument		LC-MS/MS						
HPLC	Column	ADME (4.6×100, 2.7 μm)						
	Oven temp.	40°C						
	Mobile phase	A=0.05% TFA contained 5 mM acetyl acetone in DW B=Acetonitrile (A:B=70:30,v/v)						
	Gradient	Time (min)	0.0	3.0	10.0	15.0	18.0	20.0
		A(%)	80	80	0	0	80	80
		B (%)	20	20	100	100	20	20
	Flow rate	0.2 mL/min						
	Injection volume	2 μL						
MS/MS	Ionization Mode	ESI (negative ion mode)						
	Source	Turboionspray source						
	Fragment ion	- Laccaic acid A (MW=536) m/z=492(14,64), m/z=474(21,64), m/z=448(19,64), m/z=430(26,64) - Laccaic acid A (MW=495) m/z=451(14,55), m/z=433(20,55), m/z=407(17,55), m/z=389(26,55) - Laccaic acid A (MW=538) m/z=494(14,69), m/z=450(19,69) - Laccaic acid A (MW=494) m/z=432(19,103), m/z=285(20,235)						

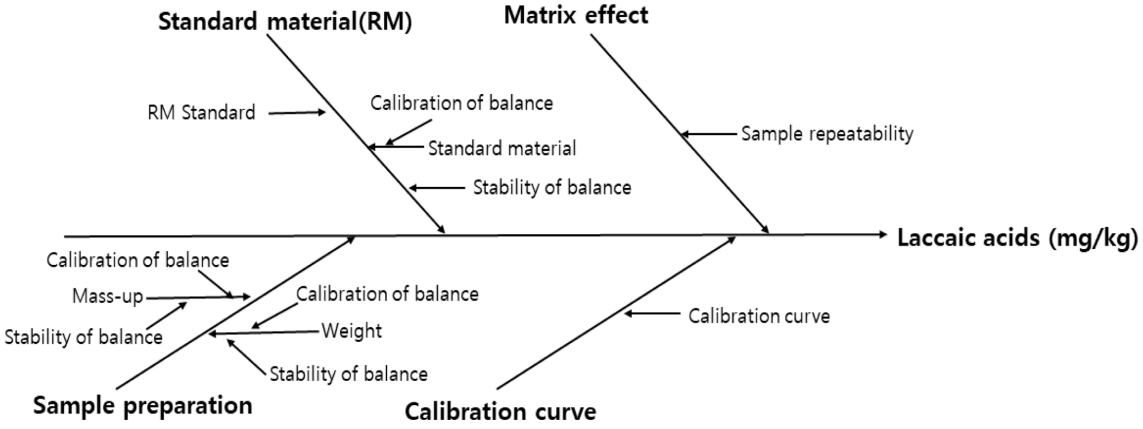

Fig. 3. Fish bone diagram of uncertainty.

정하여 각 과정 오차 각각의 표준불확도를 산출하여 합성 측정불확도를 산출하는 방법을 이용하여 식품 중 락색소의 2가지 물질에 대한 측정불확도를 산출하였다.

Results and Dicussion

표준물질 분리정제

개별 laccaic acid A, B, C, E의 상용화된 표준품이 없으므로 Sigma-Aldrich사의 Natural red 25를 이용하여 laccaic acid류를 분리정제를 통해 분취하고, 이를 개별 표준품을 이용하여 식품 중 존재하는 laccaic acid의 함량을 분석하였다. Fig. 1과 같이 Laccaic acid의 경우 유사한 구조적 특성으로 확립된 기기조건 내에서 retention time의 차이가 작아 우선적으로 group A (laccaic acid C 및 E), B (laccaic acid A와 B)로 구분하여 1차 정제를 실시하였고, 정제를 위한 장비는 HPLC-PDA를 사용하였다. Table 1, 2, 3의 분취조건을 이용하여 laccaic acid A, B, C 및 E를 각각 분리하여 정성 및 정량 표준품으로 사용하였다.

시료전처리 및 분석법 확립

UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 spectrum을 확인한 결과 락색소는 280 nm 부근과 495 nm 부근에서 극대흡수파장을 나타내었다. 그러나 실제 HPLC를 이용하여 분석을 실시한 결과 280 nm에서는 matrix에 의한 간섭물질의 영향으로 baseline이 매우 복잡하였으나, 495 nm 부근에서는 간섭물질의 영향이 적어 분석의 특이성을 확보할 수 있었다. 따라서 분석법 확립을 위한 최적의 검출 파장은 495 nm으로 확인하여 분석법에 적용하였다. 사용금지 및 사용 가능식품 유형 중 시료의 물리적 특성 및 matrix의 특성을 고려하여 선정된 시료에 일정 농도의 락

색소를 첨가한 후 문헌상의 전처리법을 이용하여 전처리한 후 시험용액을 조제하였다. 확립된 기기분석 조건을 이용하여 분석하고 회수율을 계산하여 전처리 방법을 개발하였다.

보다 간편하고 전처리 시간을 단축하기 위하여 추출용매, 사용되는 산의 종류 및 농도 등에 대한 실험을 실시하였다. 락색소의 전처리법은 Chiba 등[15], Oka 등[16] 및 Nishzawa 등[17]의 방법을 비교하고 이를 응용하여 적용하였다. 락색소 분석법 확립을 위해 분석용 컬럼 C18 column (Capcellpak C18, 4.6 mm×250 mm, 5 μm, Shiseido), C8 column (Unison UK C8, 4.6 mm×250 mm, 3 μm, Imtakt, Kyoto, Japan) 그리고 ADME column (Capcellpak ADME, 4.6 mm ×250 mm, 5 μm, Shiseido)와 이동상은 여러 논문과 문헌을 검토하여 분석법을 확립하였다.

선택성 및 특이성

국내의 유통되고 있는 식품유형 중 분석결과 락색소가 검출되지 않은 식품유형 중 3가지를 선택하였다. 공시료로 선택된 시료는 고체시료인 햄과 액상시료인 토마토주스 그리고 페이스트형태의 고추장을 blank 시료로 적용하였다. 확보된 3가지 시료를 대상으로 시료 전처리법을 적용하여 확인한 결과 3가지 시료에서 분석물질과의 간섭피크가 없는 것을 확인하였다.

직선성

확립된 시료 전처리법을 이용하여 락색소가 검출되지 않은 시료에 락색소를 100 μg/mL의 농도가 되도록 첨가하고 확립된 시료 전처리법을 적용하여 전처리한 후 HPLC를 이용하여 3회 반복 분석한 결과 r^2=0.999이상의 직선성을 나타내었으며, 정밀도는 0.3-13.3%로 확인되었고, 정확도는 90.3-122.2%로 나타났다. 그 결과 3가지 분석물질 각각의 결정계수(r^2) 0.999 이상의 직선성을 확인하였다 (Table 6).

일내, 일간 정밀성 및 정확성

검량선 내 서로 다른 농도 3가지 10, 50, 100 μg/mL의

Table 6. Linearity result of laccaic acid A, B, C and E in 3 matrices

Matrices	Laccaic acid	Range (μg/mL)	Day	Superscript	Slope	Intercept
Ham	E	0.05-9.2	1 day	0.9996	19315.9	436.0
			2 day	0.9956	19308.8	-2219.9
			3 day	0.9998	19410.0	119.8
	C	0.2-34.7	1 day	0.9995	20849.7	2147.7
			2 day	0.9992	20769.5	-2648.1
			3 day	0.9996	21095.1	13.5
	B	0.2-48.9	1 day	0.9996	19826.3	-3000.0
			2 day	0.9998	20125.8	-4802.7
			3 day	0.9993	19854.1	-185.5
	A	0.5-107.2	1 day	0.9994	19633.9	1936.6
			2 day	0.9995	19544.0	-2384.0
			3 day	0.9994	19461.5	-1094.1
Tomato juice	E	0.05-9.2	1 day	0.9993	19852.3	782.1
			2 day	0.9999	18796.0	279.5
			3 day	0.9999	19188.3	148.2
	C	0.2-34.7	1 day	0.9944	21577.8	7398.1
			2 day	0.9954	21135.2	7003.1
			3 day	0.9967	21159.1	4096.8
	B	0.2-48.9	1 day	0.9997	19729.9	96.8
			2 day	0.9999	19942.6	-2111.5
			3 day	0.9998	19512.5	2914.0
	A	0.5-107.2	1 day	0.9989	19382.2	9368.8
			2 day	0.9996	19415.1	2411.0
			3 day	0.9992	19283.2	6847.2

Table 6. (Continued) Linearity result of laccaic acid A, B, C and E in 3 matrices

Matrices	Laccaic acid	Range (μg/mL)	Day	Superscript	Slope	Intercept
Red pepper	E	0.05-9.2	1 day	0.9988	19512.9	771.3
			2 day	0.9990	18407.2	1130.4
			3 day	0.9985	18086.2	1083.9
	C	0.2-34.7	1 day	0.9956	19207.8	11427.9
			2 day	0.9944	18196.5	10858.9
			3 day	0.9933	17873.4	10789.0
	B	0.2-48.9	1 day	0.9997	20323.8	-299.1
			2 day	0.9996	20616.5	-214.7
			3 day	0.9997	20412.1	-4481.6
	A	0.5-107.2	1 day	0.9989	19528.0	12415.3
			2 day	0.9993	19803.3	4106.2
			3 day	0.9995	19646.9	-78.5

농도를 이용하여 3회 반복 분석하여 일내, 일간 정밀도와 정확도를 측정하였다. 일내 측정결과 정밀도는 고체의 경우 0.4-12.3%, 정확도는 96.5-108.7 로 확인되었다. 일간은 정밀도는 0.3-13.3%, 정확도는 95.6-122.2로 확인되었다. 액체의 경우 일내 정밀도는 0.2-5.4%, 정확도는 93.9-112.7로 확인되었고, 일간의 정밀도는 0.5-9.3%, 정확도는 93.0-113.0로 확인되었다. 페이스트의 경우 일내 정밀도는 0.7-6.7%, 정확도는 90.6-108.5로 확인되었으며, 일간 정밀도는 0.8-5.4%, 정확도는 90.3-110.2로 확인되었다(Table 7).

Table 7. Result of accuracy and precision in Intra and Inter-day

Matrix	Laccaic acid	Type	Intra-day (Conc.ug/mL)			Inter-day (Conc.ug/mL)		
			Low	Middle	High	Low	Middle	High
Ham	E	Mean (n=3)	0.6	2.3	4.7	0.5	2.3	4.6
		Precision	13.3	5.6	0.3	12.3	4.6	1.8
		Accuracy	122.2	101.3	103.1	108.7	100.3	100.9
	C	Mean (n=3)	1.8	8.4	17.9	1.8	8.3	17.8
		Precision	4.0	0.9	1.0	3.9	1.0	0.6
		Accuracy	103.7	96.7	103.1	102.3	96.1	102.6
	B	Mean (n=3)	2.4	12.6	24.6	2.5	12.6	25.0
		Precision	5.4	1.0	0.7	9.7	0.4	2.4
		Accuracy	97.1	103.2	100.4	100.9	102.7	102.3
	A	Mean (n=3)	5.1	27.7	55.0	5.2	27.4	54.6
		Precision	2.8	0.3	0.6	2.7	1.3	0.9
		Accuracy	95.6	103.5	102.6	96.5	102.3	102.0
Tomato juice	E	Mean (n=3)	0.5	2.4	5.0	0.5	2.3	4.8
		Precision	9.3	0.5	1.0	4.4	5.2	3.0
		Accuracy	111.2	104.5	109.0	99.3	100.1	105.4
	C	Mean (n=3)	1.8	8.3	19.6	1.7	8.4	19.6
		Precision	2.3	1.0	0.5	2.6	0.2	0.5
		Accuracy	101.0	96.0	113.0	96.0	96.9	112.7
	B	Mean (n=3)	2.6	12.2	25.1	2.6	12.3	25.1
		Precision	1.2	1.7	2.2	5.4	2.6	2.0
		Accuracy	104.5	100.1	102.8	104.5	100.2	102.5

Table 7. (Continued) Result of accuracy and precision in Intra and Inter-day

Matrix	Laccaic acid	Type	Intra-day (Conc.ug/mL)			Inter-day (Conc.ug/mL)		
			Low	Middle	High	Low	Middle	High
Tomato juice	A	Mean (n=3)	5.0	27.1	56.6	5.0	27.0	56.4
		Precision	2.1	2.4	1.4	1.5	1.0	1.5
		Accuracy	93.0	101.2	105.6	93.9	100.7	105.2
Red pepper paste	E	Mean (n=3)	0.4	2.4	4.7	0.4	2.4	4.7
		Precision	4.6	2.8	0.8	6.5	6.7	0.9
		Accuracy	92.3	102.4	102.7	92.6	102.8	102.7
	C	Mean (n=3)	1.6	9.3	19.1	1.6	9.4	18.8
		Precision	2.6	0.8	1.6	1.7	2.6	0.7
		Accuracy	90.3	106.9	110.2	90.6	108.5	108.1
	B	Mean (n=3)	2.3	12.0	24.4	2.5	12.3	24.6
		Precision	5.4	2.2	0.8	3.9	0.8	1.6
		Accuracy	95.5	98.3	99.8	100.4	100.3	100.5
	A	Mean (n=3)	5.1	26.8	55.5	4.9	27.0	55.5
		Precision	1.2	2.0	0.9	5.1	2.6	1.0
		Accuracy	94.4	100.0	103.5	92.3	100.6	103.5

회수율, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

확립된 분석법에 대한 분석법의 검증시료의 물리적 특성 및 matrix의 특성을 고려하여 햄, 토마토주스, 고추장을 선정하고 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성, 검출한계 및 정확성에 대해 실시하였다. 또한 식품첨가물공전 상의 사용금지식품인 천연식품, 식초, 고추장, 김치류, 커피, 다류, 고춧가루 및 실고추, 고춧가루를 포함한 향신료가공품에 대해서는 회수율을 측정하였으며, 사용가능식품 유형 중 시장조사를 통하여 락색소를 사용하는 것으로 확인된 음료류, 캔디류, 어육가공품, 젤리, 식육가공품, 과채음료 등과 수입신고목록 및 품목제조보고 조사 결과 사용 빈도가 높았던 떡류에 대해서도 회수율을 측정하여 시험법을 검증하였다. 검량선 내 100 μg/mL의 농도를 이용하여 사용 가능 식품과 사용 금지 식품의 회수율을 각각 측정 하였다. 사용 금지 식품 유형에서 회수율은 92.5%-113.5%, 사용 가능 식품 유형에서의 회수율은 91.6%-114.9%로 나타났으며, 그 결과는 아래 표와 같다(Table 8). 공시료에 표준 물질을 첨가한 5, 10, 50 μg/mL 농도를 이용하여 3회 분석한 결과를 이용하여 직선성을 구한 뒤 중간 농도인 10 μg/mL을 7회 반복 분석하여 농도에 대한 표준편차를 구하였다. 직선성의 기울기와 7회 분석한 농도의 표준편차를 이용하여 검출 한계와 정량 한계를 산출하였다. 그 결과 햄의 경우 검출한계 0.01-0.15 μg/mL, 정량한계 0.02-0.47 μg/mL, 토마토주수의 경우 검출한계 0.01-0.08 μg/mL, 정량한계 0.04-0.20 μg/mL, 고추장의 경우 검출한계 0.02-0.07 μg/mL, 정량한계 0.05-0.22 μg/mL로 확인되었다(Table 9).

Table 8. Result of recovery in foods (100 μg/mL)

Unavailable food type		Available food type	
Food type	Recovery (%)	Food type	Recovery (%)
Natrural food	100.2	Beverage	114.9
Vinergar	113.5	Candys	92.5
Red pepper paste	104.1	Fish processing products	109.4
Kimchi	92.5	Jelly	95.7
Coffee	112.0	Meat processing products	91.6
Red pepper and red pepper powder	100.5	Fruit and vegetable beverage	105.9
Spice processing products	96.9	Rice cakes	98.4
Tea	97.7		

Table 9. Result of LOD&LOQ in 3 matrix

Matrix	Laccaic acid	LOD	LOQ
Ham	E	0.01	0.02
	C	0.06	0.17
	B	0.04	0.12
	A	0.15	0.47
Tomato juice	E	0.01	0.04
	C	0.05	0.15
	B	0.05	0.14
	A	0.08	0.26
Red pepper paste	E	0.02	0.05
	C	0.07	0.22
	B	0.05	0.16
	A	0.05	0.15

측정불확도 산출결과

락색소의 4가지 성분중 laccaic acid A와 C의 측정 불확도를 산출하기 위해 설정된 불확도 요인은 총 6가지로 표준품의 순도, 표준품의 제조, 검량선 3가지 농도, 검량선(회귀분석), 시료의 반복 측정으로 불확도 요인을 설정하였다. 설정 된 불확도 요인과 자유도를 이용하여 합성상대표준불확도, 합성표준불확도, 포함인자 및 시료 측정결과로 확장 불확도를 산출하였다. 그 결과 laccaic acid A의 측정 불확도는 13.65±0.39 mg/kg(신뢰수준 95%, K=2), laccaic acid C의 측정 불확도는 4.19±0.39 mg/kg(신뢰수준 95%, K=2)로 비교적 낮은 측정불확도 값을 산출하였다(Table 10).

시료분석 결과

사용금지 식품을 대상으로 락색소의 4가지 성분들을 확립된 분석방법을 이용하여 천연식품[식육류, 어패류(고래고기 포함), 과실류, 채소류, 해조류, 콩류 등 및 단순가공품(탈피, 절단 등)], 다류, 커피, 고춧가루 및 실고추, 김치류, 고추장 및 조미고추장, 식초, 향신료가공품(고추 및 고춧가루 함유 제품에 한함) 등 락색소의 사용기준이 설정되어 락색소의 사용이 금지된 식품을 대상으로 락색소 분석을 통한 분석법에 대한 검증을 실시하였다. 또한, 락색소가 검출이 되는 경우 즉시 해당 부서에 통보하여 안전관리에 도움이 되고자 하였다. 확립된 분석방법을 이용하여 수집한 시료에 대해 락색소 함유여부에 대한 분석 결과는 Table 10과 같다.

또한 사용가능 식품을 대상으로 락색소의 4가지 성분을 분석한 결과 수집된 시료 분석한 결과 모두 63건의 시료에서 락색소가 검출되었다. 검출된 63건의 시료는 모두 한글표시사항에 락색소를 함유하고 있는 것으로 표시되어 있었으며, 한글표시사항에 락색소 함유에 대한 표시가 없는 제품 중 락색소가 검출된 시료는 한건도 없어 한글표시사항에 대한 규정을 잘 지키고 있는 것으로 확인되었다. 검출량이 가장 높은 시료에서는 16.67 mg/kg이 검출되었으며, 가장 검출량이 적은 시료에서는 0.19 mg/kg이었다. 식품첨가물공전상의 락색소의 정의에는 색가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 및 용제 등을 첨가할 수 있

Table 10. Expanded uncertainty of laccaric acid A and C

Analyte	Parameters of uncertainty	Result	Unit
Laccaic acid A	Certified concentration	13.65	mg/kg
	The result of uncertainty	13.65±0.39 (k=2, 95% confidence level)	mg/kg
	Expanded uncertainty (U)	0.39	mg/kg
	Coverage factor (k)	2	Dimensionless unit
	Degrees of freedom (veff)	11488	Dimensionless unit
	Combined standard uncertainty (uc)	0.2	mg/kg
	Combined relative standard uncertainty (ur/r)	0.014	Dimensionless unit
Laccaic acid C	Certified Concentration	4.19	mg/kg
	The result of uncertainty	4.19±0.39 (k=2, 95% confidence level)	mg/kg
	Expanded uncertainty (U)	0.39	mg/kg
	Coverage factor (k)	2	Dimensionless unit
	Degrees of freedom (veff)	1275485	Dimensionless unit
	Combined standard uncertainty (uc)	0.2	mg/kg
	Combined relative standard uncertainty (ur/r)	0.046	Dimensionless unit

Table 11. Result of laccaic acids in foods

	Food type	Detection/Sample	Detection range (μg/mL)
Available food type	Meat processing products	40/45	0.09 – 7.03
	Fish processing products	4/11	0.19 – 0.31
	Beverage	13/26	0.73 - 16.67
	Seasoned dried fish	3/3	1.64 – 2.36
	Candys	2/19	1.26 – 1.53
	Other processing products	1/1	8.81
	Total	63/105	0.08 – 16.67
Prohibited food types	Natrural food (frozen strawberries, Tomato paste)	12	Not detection
	Tea	19	
	Coffee	15	
	Chili powder/ Red-pepper threads	20/2	
	Kimchi	17	
	Red pepper paste	16/1	
	Vinegar	14	
	Spice processing products	1	
	Total	117	

으며, 식품제조사와의 인터뷰 결과 일반적으로 식품에 대해 락색소의 사용량은 0.01-0.02%의 범위로 사용 대상이 되는 식품의 특성에 따라 그 사용량을 조절함으로 실제 식품에서의 락색소의 함량이 적은 것으로 판단된다(Table 11).

국문요약

본 연구에서는 기존 식품첨가물 분석법에서 합으로써 분석되는 락색소를 laccaic acid A, B, C, E 4가지 성분으로 분류하고 개별적으로 정량 할 수 있는 분석법을 확립하였다. Natural red 25를 사용하여 구조적으로 비슷한 laccaic acid A와 B를 1차적으로 분취한 후 2차로 A와 B를 분리했다. 같은 방식으로 C와 D를 1차, 2차에 걸쳐 각각의 개별 표준품으로 사용하였다. 락색소 불검출 시료 3가지 시료(햄, 토마토 주스, 고추장)를 확보하여 0.05-107.2 μg/mL 범위에서 결정계수(r^2) 0.995 이상의 직선성을 확인하였다. 3가지 시료에서 정밀도와 정확성을 측정한 결과, 일내 정밀도는 0.2-12.3%, 정확도는 90.6-112.7% 범위 내에서 확인되었으며 일간 정밀도는 0.3-13.3%, 정확도는 90.3-113.0% 범위내로 확인 되었다. 락색소를 사용하는 식품과 사용 금지 식품에 대해 회수율을 측정한 결과, 사용 가능 식품에서는 91.6-114.9% 범위의 회수율을 보였으며, 사용 불가 식품의 경우 92.5-113.5% 범위의 회수율을 보였다. 락색소의 검출 한계는 3가지 시료에서 검출한계 0.01-0.15 μg/mL, 정량한계 0.02-0.47 μg/mL로 확인되었다. 락색소의 4가지 성분중 laccaic acid A와 C에 대한 측정 불확도를 산출한 결과, laccaic acid A의 측정 불확도는 13.65±0.39 mg/kg(신뢰수준 95%, K=2), laccaic acid C의 측정 불확도는 4.19±0.39 mg/kg(신뢰수준 95%, K=2)로 비교적 낮은 측정불확도 값을 산출하였다. 따라서 본 연구에서는 식품 중 락색소의 개별 분석과 정성 및 정량분석을 위해 유효성이 검증된 분석법을 확립으로 식품 중 잔류물질 기준규격 설정 및 관리에 참고 자료가 될 수 있고, 향후 매트릭스 효과에 따른 laccaic acid 개별 분석과 개별 활성 및 독성시험 연구의 근거 지표가 될 수 있다고 판단된다.

Acknowledgement

본 연구 결과(논문)는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학연협력 선도전문대학 육성사업(LINC 3.0)의 연구결과 입니다.

Conflict of intersts

The authors declare no potential confrict of interest

ORCID

Shin Jae Wook https://orcid.org/0000-0002-3092-4867
Kim Jung Bok https://orcid.org/0009-0007-8738-3970
Hyun Ju Lee https://orcid.org/0009-0002-1472-271x
Eunjoo Lim https://orcid.org/0009-0006-7104-8281

References

1. Ministry of Food and Drug safety (MFDS), 2021. Food Additives Code. No. 2016-32, Cheongju, Korea, pp. 432-435.
2. Ministry of Food and Drug safety (MFDS), 2021. Food Additives Code. No. 2016-32, Cheongju, Korea, pp. 433.
3. Hirata, K., Uematsu, Y., Suzuki, K., Lida, K., Yasuda, K., Saito, K., Analysis of main pigments and other ingredients in Lac color product. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, **42**, 109-113 (2001).
4. Rucl Institutional Repository, (2023, August 21). Investigation on Bangladeshi lac dye. Retrieved from http://rulrepository.ru.ac.bd/handle/123456789/995
5. Hong, Z., Guigan, F., Hua, Z., Kun, L., Determination of anthraquinone content in lac dye through combined spectrophotometry and HPCE. *Procedia Eng.*, **18**, 86-94 (2011).
6. Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K.I., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K., Tanaka, T., Mizuno, M., Identification of lac dye components by electrospray high performance liquid chromatography-tamdem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 63-68 (1998).
7. Oka, H., Lto, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K.I., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K., Nakazawa, H., Ito, Y., Separation of lac dye components by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **813,** 71-77 (1998).
8. Wouters, J., Verhecken, A., The coccid insect dyes : HPLC and computerized diode-array analysis of dyed yarns. *Stud. Conserv.*, **34**, 189-200 (1989).
9. Santos, R., Hallett, J., Oliveira, M.C., Sousa, M.M., Sarraguca, J., Simmonds, M.S.J., HPLC-DAD-MS analysis of colorant and resinous components of lac-dye: A comparison between Kerria and Paratachardina genera. *Dyes Pigm.*, **118**, 129-136 (2015).
10. Rafaëlly, L., Héron, S., Nowik, W., Tchapla, A., Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. *Dyes Pigm.,* **77**, 191-203 (2008).
11. Szostek, B., Orska-Gawrys, J., Surowiec, I., Trojanowicz, M., Investigation of natural dyes occuring in historical Coptic textiles by high-performance liquid chromatography with UV-Vis and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.*, **1012**, 179-192 (2003).
12. Novotná, P., Pacáková, V., Bosáková, Z., Stulík, K., High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *J. Chromatogr. A.*, **863**, 235-241 (1999).
13. Dube, D.K., Loch-Caruso, R., Trosko, J.E., Chakravarty, I., Ghosh, A., Loeb, L.A., Assessment of the carcinogenic potential of a proposed food coloring additive, laccaic acid, using short-term assays. *Cell Biol. Toxicol.*, **1**, 111-125 (1984).
14. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2021, A Study on the Safety Evaluation of Natural Pigments (Lak Pigments), Cheongju, Korea.
15. Chiba, Y., Yamaguchi, Y., Hiramto, K., Yangi, S., Saito, Y., Hamana, T., Studies on qualitative analysis of natural food colors in foods. *Annual report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment*., **28**, 50-54 (2010).
16. Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K.I., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K., Tanaka, T., Mizuno, M., Identification of lac dye components by electrospray high performance liquid chromatography-Tandem Mass spectrometry. *J.Mass Spectrum. Soc. Jpn.,* **46**, 63-68 (1998).
17. Nishizawa, M., China, T., Hori, Y., Studies on the Analysis of natural dyes (part 3) analysis of cochineal dye and lac dye in foods and dye preparations. *Doe Kensho-bo*., **35**, 7-11 (1985).