pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 6, pp. 466~473 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.6.466

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

Size-exclusion Chromatography를 활용한 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 분석법 확립

정은정[1] · 최유정[1] · 이근영[2] · 윤상순[2] · 임호수[2] · 김미경[2] · 김용석[1]*
[1]전북대학교 식품공학과, [2]식품의약품안전평가원 첨가물포장과

Analytical Method for Sodium Polyacrylate in Processed Food Products by Using Size-exclusion Chromatography

Eun-Jeong Jeong[1], Yoo-Jeong Choi[1], Gunyoung Lee[2], Sang Soon Yun[2], Ho Soo Lim[2], MeeKyung Kim[2], and Yong-Suk Kim[1]*
[1]*Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Jeonju, Korea*
[2]*Food Additives and Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Korea*
(Received July 31, 2018/Revised August 18, 2018/Accepted September 21, 2018)

ABSTRACT - An analytical method of sodium polyacrylate in processed food products was developed and monitored by using size-exclusion chromatography. GF-7M HQ column and UV/VIS detector were selected based on peak shape and linearity. Flow rate, column oven temperature, and mobile phase were selected as 0.6 mL/min, 45°C, and 50 mM sodium phosphate buffer of pH 9.0, respectively. Samples for analysis of sodium polyacrylate were extracted with 50 mM sodium phosphate buffer of pH 7.0 for 3 hr at 20°C and 150 rpm. Analytical method validation revealed proper selectivity and calibration curve was selected in the range of 50-500 mg/L, and correlation coefficient of calibration curve was more than 0.9985. Limit of detection of sodium polyacrylate was 10.95 mg/kg and limit of quantification was 33.19 mg/kg. Accuracy and coefficient of variation for sodium polyacrylate analysis was 99.6-127.6%, 3.0-8.3% for intra-day and 94.3-121.9%, 1.3-2.6% for inter-day, respectively. Sodium polyacrylate was detected in 40 samples among monitored 125 processed food products. Detected contents were less than 0.2%, limited by the Food Additives Code. Results suggest the established size-exclusion chromatography method could be used to analyze sodium polyacrylate in processed food products.

Key words : Sodium polyacrylate, Size-exclusion chromatography, Food additives, Analytical method, Method validation

식품 산업의 발달로 다양한 특성을 갖는 가공식품이 개발되었으며, 이에 따른 식품첨가물의 종류와 사용량도 증가하였다. 최근 극대화된 정보화로 단순히 식품의 기호성뿐만 아니라 안전하고 기능성을 가진 식품의 소비가 증가하고 있으며, 이에 따라 식품첨가물의 안전성과 첨가에 따른 확인 시험이 필요한 실정이다.

다양한 식품첨가물 중 증점제(thickeners)는 식품에 대하여 점착성을 증가시키고 유화안정성을 좋게 하며, 식품 가공에서 가열이나 보존 중에 선도를 유지하고 형체를 보존하기 위하여 사용한다. 또한 식품에 사용하면 점성을 줄 뿐만 아니라 유산균음료, 아이스크림, 마요네즈에 분산안정제로, 햄과 소시지에 결착보수제로, 김의 피복제로, 또 점도의 증대를 이용하여 유화보조제적 용도로 사용할 수 있다[1].

가공식품의 제조 시 증점제로 많이 사용되고 있는 폴리아크릴산나트륨(sodium polyacrylate, SPA)은 백색의 분말로서 냄새와 맛이 없고 유기용매에 녹지 않으며, 열에 강하여 300°C에서도 분해되지 않는 특성이 있으며[2], 화학식은 $(CH_3 \cdot CH \cdot COONa)_n$으로 화학구조는 Fig. 1과 같다. 현행 식품첨가물공전[3]에 따라 폴리아크릴산나트륨의 사용기준은 식품의 0.2%이하 이어야 하며, 가공식품에 안정제, 습윤제, 응고제, 유화분산제 및 조직개량제 등으로 널리 이용되며, 다른 증점제와 병용이 가능하다. 식품에 사용 시 원료 소맥분 중 단백질의 점착력을 강화하고 생지에 치밀한 조직을 형성하고 표면에 광택을 주며, 수분을 균일하게 보유하므로 건조를 방지하는 효과가 있다[4]. 주로

*Correspondence to: Yong-Suk Kim, Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Korea
Tel: 82-63-270-2567, Fax: 82-63-270-2572
E-mail: kimys08@jbnu.ac.kr

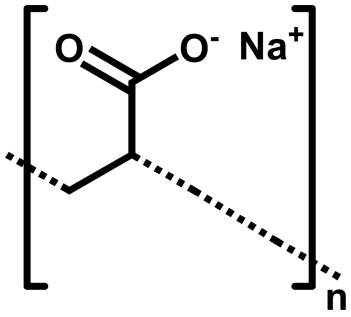

Fig. 1. The chemical structure of sodium polyacrylate.

사용되는 식품은 빵, 케이크, 마카로니, 스파게티, 국수 등이며, 소스, 케첩, 마요네즈, 주스 및 주류의 분산제 또는 안정제로서 사용된다. 또한 아이스크림, 캐러멜의 안정효과와 맛의 향상을 목적으로 사용된다[5]. Pan 등[6]의 연구에 따르면 냉동국수에 잔탄검, 폴리아크릴산나트륨, 알긴산나트륨과 같은 hydrocolloid 첨가시 품질이 개선되는 것을 확인하였으며, 폴리아크릴산나트륨은 0.13% 첨가가 최적의 조건으로 선정되었다. 그러나 최근 증점제나 안정제가 비만이나 당뇨 발생을 촉진할 가능성이 있다는 연구 결과[7]가 발표되어 가공식품에 함유된 증점제 및 안정제의 함량을 분석할 필요성이 제기되었다.

이처럼 다양한 가공식품에 사용되는 폴리아크릴산나트륨은 미국, EU, Codex에서는 식품첨가물로 지정되어 있지 않고, 일본에서만 우리나라와 같이 모든 식품에 0.2% 이하로 사용하도록 사용기준으로 정해져 있으나[8], 가공식품 중 그 함량을 분석하는 시험법은 확립되어 있지 않다. 또한 폴리아크릴산나트륨에 대한 연구는 혼합증점제로써 폴리아크릴산나트륨을 0.06% 첨가하여 제조한 쌀국수의 품질 특성[9], pyrolysis-gas chromatography를 이용한 sodium polyacrylate의 분석법 연구[10] 등이 보고되었으나 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 함량의 분석을 위한 전처리 방법이나 추출법, 분석법에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 증점제 중 사용량을 규제하고 있는 폴리아크릴산나트륨에 대하여 가공식품 중 함유량을 확인할 수 있는 분석법을 확립하고자 하였다. 이를 위하여 폴리아크릴산나트륨을 직접 분석할 수 있는 기기분석법을 확립하였고, 시료 중 함유되어 있는 성분을 추출할 수 있는 전처리 방법을 확립하였으며 이에 대한 분석법 검증을 실시하였다. 또한 확립된 분석법을 적용하여 가공식품 125품목에 대하여 모니터링을 실시하였다.

Materials and Methods

시약

증점제 표준물질은 sodium polyacrylate (average M.W. 2,000,000~6,000,000, NIPPON SHOKUBAI Co., LTD., Osaka, Japan)을 사용하였다. Sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, polyacrylic acid (sodium salt) solution (average M.W.~1,200, 45wt% in H_2O), polyacrylic acid (sodium salt) solution (average M.W.~8,000, 45wt% in H_2O), polyacrylic acid (sodium salt) solution (average M.W.~15,000, 35wt% in H_2O)은 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, high performance liquid chromatography (HPLC) grade water는 Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 이외의 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였다.

장비

본 연구에서 검토한 분석기기는 HPLC (LC-20A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 검출기(detector)는 RI (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan), UV/VIS (SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan), LT-ELSD (SEDEX 80, SEDERE, Olivet, France)를 사용하였다. Column의 오븐 온도는 45°C, 이동상의 유속은 0.6 mL/min, injection volume은 20 μL의 조건에서 분석하였다. UV/VIS 검출기의 경우에는 210 nm에서, LT-ELSD의 경우는 evaporation tube temp. 45°C, 3.5 bar (N_2 gas)의 조건에서 분석을 실시하였다.

Column 및 분석법 확립

Column 선정을 위해서 size-exclusion column 중 exclusion 제한 분자량(limit M.W.)에 따라 GF-7M HQ (9 μm, 7.5 mm i.d. × 300 mm, exclusion limit M.W.: 10,000,000, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan), OHpak SB-804 HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm, exclusion limit M.W.: 1,000,000, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan), OHpak SB-806 HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm, exclusion limit M.W.: 20,000,000, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)을 대상으로 검토하였다. 폴리아크릴산나트륨의 분석법 확립을 위하여 검출기 선정 후 이동상의 유속을 0.6 및 0.8 mL/min에 대하여 비교하였으며, 이동상으로 사용한 sodium phosphate buffer의 pH를 7.0과 9.0으로 제조하여 비교하였다. 또한 column 오븐 온도에 대하여 30, 35, 40, 45, 50°C의 조건에서 실험하여 피크를 확인하였다.

시료 전처리법 확립

가공식품 시료 자체에 포함된 지방성분 및 단백질 성분 제거에 따른 폴리아크릴산나트륨 피크의 분리능을 확인하고자 시료에 *n*-hexane 처리와 0.5% trichloroacetic acid 및 2 M trifluoroacetic acid 처리를 하여 GF-7M HQ column에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0)를 이동상으로 사용하여 UV/VIS 검출기(210 nm)로 분석하였다. 가공

식품 중 함유되어 있는 폴리아크릴산나트륨의 추출을 위해 분쇄한 라면시료에 폴리아크릴산나트륨을 0.2% 첨가한 후 온도에 따른 추출 실험을 진행하였다. 폴리아크릴산나트륨은 열에 비교적 안정한 특징을 가지고 있어, 121°C에서 15분간 추출하는 조건과 20, 40, 60°C의 온도에서 추출하는 조건에 대해 실험을 진행하였다. 추출에 따른 전처리 시험은 폴리아크릴산나트륨이 첨가된 시료 10 g을 250-mL 삼각플라스크에 취하고 증류수 90 mL를 넣어 혼합한 후 각 온도에 따른 incubator에서 150 rpm으로 3시간 추출하였으며, 이를 8,260 × g으로 30분간 원심분리하여 이를 분석하였다.

추출용매 및 pH에 따른 추출조건을 확립하기 위하여 분쇄한 라면시료에 폴리아크릴산나트륨을 0.2% 첨가한 후 추출용매의 pH에 대한 추출 실험을 진행하였다. 추출 용매는 D.W.와 50 mM sodium phosphate buffer의 pH 4.5, 7.0, 9.0으로 선정하여 실험하였으며, 추출조건은 위에서 선정된 20°C incubator에서 150 rpm으로 3시간 추출하여 HPLC 분석을 진행하였다.

분석법 검증

본 연구에서 설정된 분석법 검증은 ICH 가이드라인[11]에 근거하여 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정밀도 및 정확도를 산출하여 실시하였다.

폴리아크릴산나트륨의 표준용액 제조는 95%이상의 폴리아크릴산나트륨을 100-mL 정용플라스크에 105.3 mg을 취하여 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 녹인 후 충분히 용해되도록 실온에서 overnight하여 1,000 mg/L가 되도록 하였다. 이를 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하여 표준물질의 농도가 50, 100, 200, 300, 500 mg/L가 되도록 하였다. 폴리아크릴산나트륨 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램의 농도를 X축으로 하고, 시험용액의 면적비를 Y축에 대입하여 폴리아크릴산나트륨의 검량선을 작성하였다.

직선성은 표준용액을 가지고 시험방법에 따라 각 3회 반복 실험하여 검량선을 작성하여 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 확인하였다.

검출한계와 정량한계를 구하기 위해 저농도를 선택하여 검량선을 작성한 후 중간농도 7회 분석을 통하여 얻은 표준편차(SD, σ)를 이용하여, $3.3 \times \sigma/S$ (σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)를 검출한계로, $10 \times \sigma/S$를 정량한계로 산출하였다.

정확성을 산출하기 위하여 라면시료에 폴리아크릴산나트륨 표준품을 3 농도(50, 200, 500 mg/kg)로 첨가하여 각각 3회 반복하여 분석하였다. 정밀성 확인하기 위한 intra-day 정밀도는 1일간 반복하여 얻은 변동계수(coefficient of variation, CV, %)로 나타내었다.

표준용액의 제조

식품용으로 사용되는 폴리아크릴산나트륨(순도 95% 이상)을 100-mL 정용플라스크에 105.3 mg을 정밀히 달아 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 혼합하고 실온에서 자석교반기(MS-300HS, Misung Scientific Co., LTD, Daejeon, Korea)를 이용하여 5시간 동안 녹인 후 정용하여 1,000 mg/L이 되도록 한다. 검량선 작성용 표준용액은 위에서 제조한 표준용액을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하여 50~500 mg/L의 농도가 되도록 제조하였다.

가공식품 시료 제조

국내 유통 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨이 사용되고 있는 것으로 알려진 절임식품, 발효음료류, 과자류, 드레싱류, 과채가공품, 치즈, 케찹, 주류, 면류, 밀가루류 등으로 구분하여 125품목의 시료를 구입하여 폴리아크릴산나트륨의 함량을 확인하였다. 분쇄한 시료 10 g을 250-mL 삼각플라스크에 넣고 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 90 mL를 혼합한 후 20°C 진탕항온기에서(VS-8480, Vision scientific Co., LTD, Bucheon, Korea) 150 rpm으로 3시간 추출하였다. 이를 전량 원심분리용 셀에 옮겨 8,260 × g에서 30분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 100-mL 정용플라스크에 옮기고 추출용매로 정용하였다. 이 중 일부를 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

통계처리

통계분석은 SAS (Statistical analysis system, SAS version 9.4, SAS institute INC., Cary, NC, USA)를 이용하여 실시하였으며, 실험값에 대한 평균과 표준편차를 계산하였다[12].

Results and Discussion

표준물질 용매 선정

폴리아크릴산나트륨은 백색의 분말로 유기용매에 녹지 않고, 물에서 팽창하여 투명한 젤상의 점조한 액이 된다[2]. 폴리아크릴산나트륨의 표준물질은 gel permeation chromatography (GPC)용을 분자량에 따라 구입하여 사용하였다. 식품용으로 사용되는 폴리아크릴산나트륨은 Nippon Shokubai Co., LTD. (Osaka, Japan)에서 제조된 제품을 사용하였으며, 제품규격에 제시된 분자량이 2,000,000~6,000,000으로 GPC용 표준품에 비해 분자량이 큰 것으로 확인되었다. GPC용 표준품 폴리아크릴산나트륨과 식품용 폴리아크릴산나트륨을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 다른 retention time을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서는 분석조건에 대한 표준물질로서 식품용 폴리아크릴산나트륨(95%)을 사용하였다.

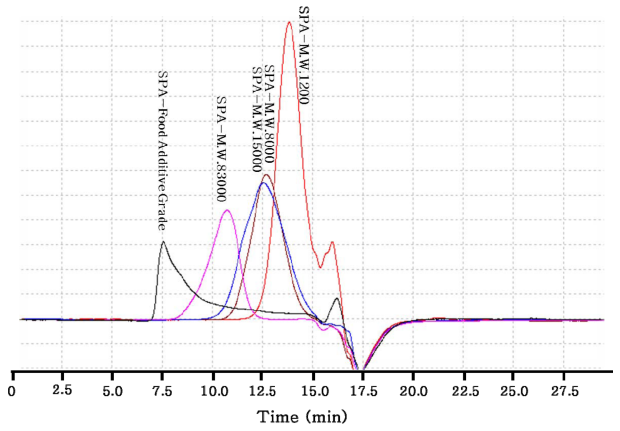

Fig. 2. Comparison of sodium polyacrylate (SPA) standard reagent.

분석에 사용하는 표준물질을 용해할 수 있는 용매를 선정하고자 물, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 질산나트륨($NaNO_3$), 황산나트륨(Na_2SO_4), 인산나트륨(Na_2HPO_4)에 대하여 농도별로 제조하여 폴리아크릴산나트륨 0.2%를 첨가하여 용해성을 확인하였다. 폴리아크릴산나트륨은 물에 용해되었으며, 유기용매의 농도에 관계없이 용해되지 않고 침전되었다. 용해도를 높일 수 있는 질산나트륨($NaNO_3$), 황산나트륨(Na_2SO_4), 인산나트륨(Na_2HPO_4) buffer 용액에 대하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 M 농도에 따라 확인한 결과 농도에 상관없이 모든 buffer용액에서 용해되는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 표준물질 용해 용매로써 물 또는 sodium phosphate buffer가 적합할 것으로 판단되었다(Data not shown).

HPLC를 이용한 폴리아크릴산나트륨 분석조건 확립

가공식품에 함유되어 있는 폴리아크릴산나트륨의 분석을 위하여 size-exclusion column을 이용한 HPLC 분석법을 확립하기 위하여 3 종류의 column 및 검출기를 비교하여 실험하였다. Column은 GF-7M HQ (9 μm, 7.5 mm i.d. × 300 mm), OHpak SB-806 HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm), OHpak SB-804 HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm), 를 사용하였으며, 검출기는 RI, UV/VIS, ELSD를 사용하였다. 각 column 및 검출기에 대하여 표준물질의 농도 312.5, 625, 1,250, 2,500 ppm에서 분석하였으며, RI와 UV/VIS 검출기의 경우 이동상으로 50 mM sodium phosphate buffer를 사용하였고, ELSD의 경우 HPLC grade water로 isocratic 조건과 water와 30% methanol을 사용하여 gradient 조건으로 비교하였다.

Column의 경우(Fig. 3) SB-804 HQ가 3가지 검출기에 대하여 피크모양이 모두 적합하지 않았으며, SB-806 HQ는 RI에서 피크모양이나 직선성에 따라 적합성을 나타내었다. GF-7M HQ column의 경우 RI와 UV/VIS 검출기에 대하여 피크모양 및 직선성에 따라 적합성을 나타내었다.

검출기의 경우(Fig. 3) GF-7M HQ column으로 분석시 RI와 UV/VIS 검출기에서 직선성을 나타내었으나, RI 검출기의 경우 용매피크로 추정되는 피크가 높게 검출되었다. ELSD 검출기의 경우 분석시 3 종류의 column 모두 농도에 따른 직선성이 나타나지 않아 폴리아크릴산나트륨 분석에 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 분석을 위한 검출기로 UV/VIS 검출기를 선정하였다. UV/VIS 검출기에 대한 적정 파장을 선정하기 위하여 190~600 nm의 범위에서 흡수파장을 분석한 결과(data not shown) 200 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었으나, 용매의 cut off 등을 고려하여 210 nm로 선정하였다.

Deshmukh 등[13]의 연구에 의하면 methylcellulose food gums을 분석하기 위하여 size exclusion column을 사용하여 RI 검출기로 분석하였으며, 본 연구에서 RI 검출기로 분석한 chromatogram과 유사한 결과를 확인 할 수 있었다.

폴리아크릴산나트륨 분석을 위한 HPLC 조건 중 이동상 유속을 비교하기 위하여 앞에서 선정된 GF-7M HQ column에 대하여 UV/VIS 검출기로 분석하여 비교하였다. 이동상의 유속을 0.6 mL/min과 0.8 mL/min에 대하여 비교한 결과, 0.8 mL/min보다 0.6 mL/min의 조건에서 피크모양이 더 적합한 것을 확인하였다(data not shown).

폴리아크릴산나트륨 분석을 위한 HPLC 조건 중 이동상의 pH에 따른 특성을 확인하기 위하여 50 mM sodium phosphate buffer의 pH를 7.0과 9.0으로 제조하여 분석하였다(data not shown). 그 결과, 피크모양에는 pH에 따른 큰 영향이 나타나지 않았으나, 표준용액의 농도에 따른 직선성을 확인한 결과 pH 9.0의 조건에서 상관계수(R^2)의 값이 0.9993으로 pH 7.0의 상관계수(R^2 = 0.9897)보다 높게 나타났다. 따라서 폴리아크릴산나트륨분석을 위한 이동상의 조건으로 50 mM sodium phosphate buffer pH 9.0으로 선정하였다.

폴리아크릴산나트륨 분석을 위한 HPLC 조건 중 column oven 온도에 따른 특성을 확인하기 위하여 30, 35, 40, 45, 50°C의 조건으로 분석하여 폴리아크릴산나트륨피크를 확인하였다(data not shown). 그 결과 오븐 온도에 따라 피크의 높이가 높아지는 것을 확인 할 수 있었으며, 피크 모양과 높이에 따라 45°C의 조건에서 분석하는 것이 적합할 것으로 생각되었다.

시료 전처리 및 추출

가공식품 시료 중 폴리아크릴산나트륨의 추출을 위해 분쇄한 라면시료에 폴리아크릴산나트륨을 0.2% 첨가한 후 온도에 따른 추출 실험을 진행하였다. 폴리아크릴산나트륨은 열에 비교적 안정한 특징을 가지고 있어[2,4], 121°C와 20, 40, 60°C 조건에서 추출하여 실험을 진행하였다. 121°C 처리의 경우 autoclave를 이용하여 15분간 처리하고 원심

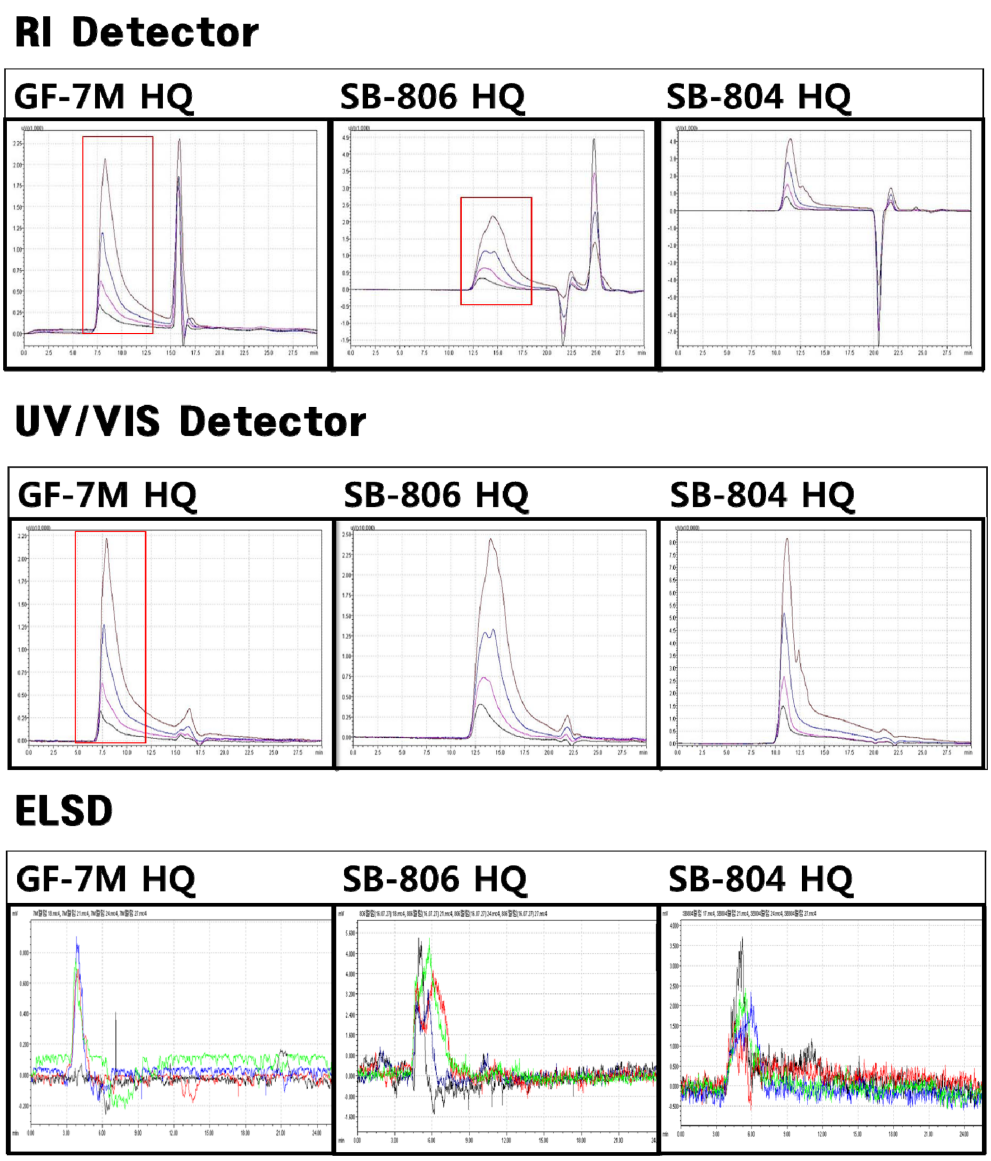

Fig. 3. Chromatogram of sodium polyacrylate according to column and detector.

분리한 후 HPLC 분석을 하였으며, 20, 40, 60°C 조건의 경우 150 rpm에서 3시간 동안 incubation 추출하여 원심분리한 후 HPLC 분석을 하였다. 추출온도에 따른 실험결과(data not shown) 20°C에서 3시간 추출한 경우 폴리아크릴산나트륨 peak의 형태가 40, 60°C에서 추출한 경우보다 좋게 나타났으며, 추출온도가 높을수록 peak 형태가 나빠지는 것을 확인하였다. 또한 121°C에서 15분 추출한 경우 폴리아크릴산나트륨의 peak 높이가 낮아지며 시료의 peak 패턴에 영향을 나타냈다. 이는 시료내의 성분들이 추출 온도에 따라 영향을 받는 것으로 추측된다. 따라서 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 성분을 추출하는 조건으로 20°C, 150 rpm에서 3시간 추출하는 것이 적합한 것으로 판단되었다. Cohen 등[14]의 연구에 따르면 carboxymethylcellulose를 분석하기 위하여 효소로 가수분해하여 size-exclusion chromatography 통해 분석한 결과, RI detector를 사용한 크로마토그램은 본 연구와 유사하게 나타났으나, 효소 가수분해에 의하여 다양한 size의 산물이 생성되어 단일 peak로 분석하기엔 적합하지 않을 것으로 생각되며, 본 연구의 추출방법이 식품에 적용하기에 더 적합할 것으로 생각된다.

가공식품 시료 중 폴리아크릴산나트륨의 추출을 위해 분쇄한 라면시료에 폴리아크릴산나트륨을 0.2% 첨가한 후 추출용매 pH에 대한 추출 실험을 진행하였다. 추출 용매는 D.W.와 50 mM sodium phosphate buffer pH 4.5, 7.0, 9.0으로 선정하여 실험하였으며, 추출조건은 위에서 선정된 20°C incubator에서 150 rpm으로 3시간 추출하여 HPLC 분석을 진행하였다. 가공식품 시료 중 폴리아크릴산나트륨의 추출을 위해 추출 용매의 pH에 따른 실험을 진행한

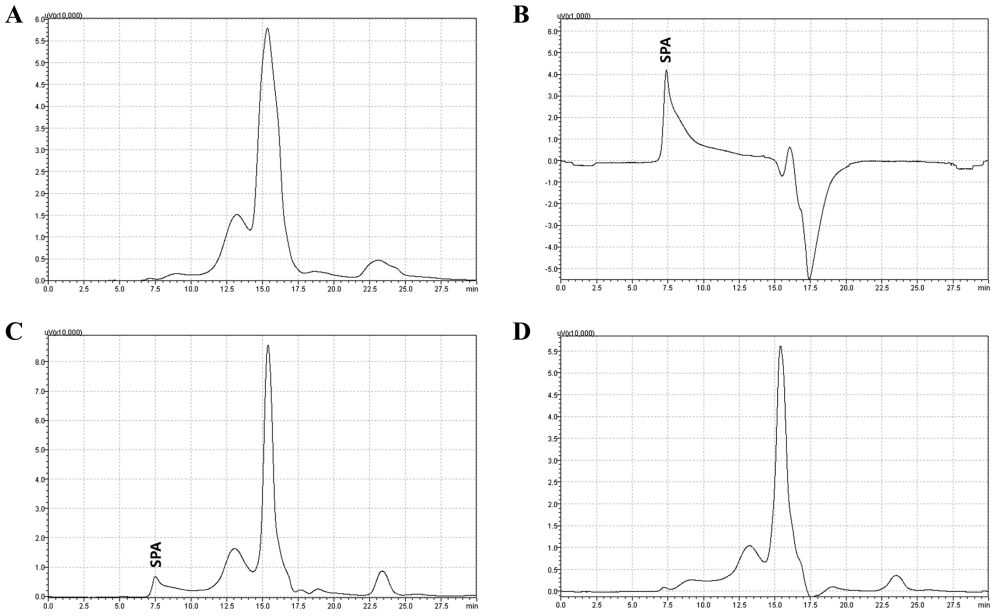

Fig. 4. Specificity of sodium polyacrylate (SPA) by HPLC-SEC method. (A) Chromatogram of sample blank. (B) Chromatogram of standard sodium polyacrylate. (C) Chromatogram of standard sodium polyacrylate spiked sample (ramen). (D) Chromatogram of processed food product sample.

결과(data not shown) buffer pH 7.0의 경우 peak 높이나 분리능이 가장 좋은 것을 확인 하였으며, D.W.로 추출한 경우 peak 높이나 모양이 우수하였으나 분리능이 적합하지 않은 것을 확인하였다. 따라서 식품 중 폴리아크릴산나트륨을 추출하는 용매로 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0을 선정하였다. Elyashevich 등[15]의 연구에 따르면 용매의 pH에 따라 폴리아크릴산나트륨의 팽윤정도가 다르게 나타나 pH 6의 조건에서 팽윤정도가 가장 높게 나타남을 볼 수 있으며, pH 4와 pH 10에서 낮아짐을 확인하여, 본 추출조건으로 선정된 pH 결과와도 유사한 것을 확인하였다.

폴리아크릴산나트륨 분석법 검증

가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 분석을 위해 확립된 전처리 방법과 HPLC 분석방법에 대하여 시료 blank와 spiked 시료에 대하여 비교한 결과(Fig. 4) 시료 blank에서 폴리아크릴산나트륨과 유사한 시간의 peak가 검출되지 않았으며, 폴리아크릴산나트륨 첨가에 따라 시료 blank의 영향 없이 폴리아크릴산나트륨 peak가 검출되는 것을 확인하였다. 탄수화물, 지방, 단백질 등 다양한 성분이 함유되어 있는 라면을 대상으로 한 실험에서도 좋은 peak가 검출되었으므로 확립된 분석법에 의하여 폴리아크릴산나트륨을 시료 matrix에 영향을 받지 않고 검출할 수 있을 것으로 판단되었다.

폴리아크릴산나트륨의 표준용액 제조는 95%이상의 폴리아크릴산나트륨을 100-mL 정용플라스크에 105.3 mg을 취하여 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 녹인 후 충분히 용해되도록 실온에 overnight 하여 1,000 mg/L가 되도록 하였다. 이를 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하여 표준품의 농도가 50, 100, 200, 300, 500 mg/L가 되도록 하였다. 폴리아크릴산나트륨 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램의 농도를 X축으로 하고, 시험용액의 면적비를 Y축에 대입하여 폴리아크릴산나트륨의 검량선을 작성하였다.

폴리아크릴산나트륨 표준용액으로 작성된 검량선의 상관계수(R^2)값은 0.9985로 우수한 직선성을 나타내었다(Table 1). 해조류의 polysaccharide에 대하여 size-exclusion chromatography 방법을 이용하여 분석한 경우 pullullan 표준품은 0.9966, dextran 표준품은 0.9933의 상관계수를 나타내었는데[16], 본 연구의 경우 분자량 및 검출기의 차이는 있으나 더 높은 직선성을 나타내었다.

검출한계와 정량한계를 구하기 위해 저농도를 선택하여 검량선을 작성한 후 중간농도 7회 분석을 통하여 얻은 표준편차(SD, σ)를 사용하여, $3.3 \times \sigma/S$ (검량선의 기울기)를 검출한계(LOD)로 $10 \times \sigma/S$를 정량한계(LOQ)로 산출하였다. Size-exclusion column을 이용한 HPLC 분석법을 통하여 폴리아크릴산나트륨의 검출한계와 정량한계를 측정한 결과(Table 1) 검출한계는 10.95 mg/kg을 나타내었으며, 정량한계는 33.19 mg/kg을 나타내었다.

정확도를 확인하기 위하여 동일조건하에서 같은 검체를 하루에 3번 반복 실험하는 일내 분석(intra-day assay) 및 3일 동안 같은 검체를 반복 실험하는 일간 분석(inter-day

Table 1. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of sodium polyacrylate analysis by HPLC-SEC method

Compound	Concentration range (mg/kg)	R^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Sodium polyacrylate	50~500	0.9985	10.95	33.19

Table 2. Accuracy and precision of sodium polyacrylate at three different concentration (n = 3) by HPLC-SEC method

Analytes	Concentration (mg/kg)	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (%)	CV[1] (%)	Accuracy (%)	CV (%)
Sodium polyacrylate	50	127.6	4.0	121.9	2.6
	200	99.6	8.3	94.3	1.3
	500	102.2	3.0	101.2	1.7

[1]CV, coefficient of variation.

Table 3. Monitoring of sodium polyacrylate by processed food types

Samples	No. of samples	Sodium polyacrylate contents (%)[1]	
		Range	Average
Bread	10	ND[2]	ND
Noodles	30	ND~0.04±0.01	0.00 ± 0.01
Beverage	12	ND~0.01±0.00	0.00 ± 0.00
Confectionery	10	ND~0.02±0.00	0.01 ± 0.01
Dressing	15	ND~0.10±0.00	0.03 ± 0.03
Ketchup	10	ND~0.03±0.00	0.01 ± 0.01
Fermented soybean product	10	ND~0.03±0.00	0.00 ± 0.01
Jam	12	ND~0.12±0.00	0.02 ± 0.03
Flour	16	ND~0.05±0.00	0.00 ± 0.01
Total	125		

[1] Data are mean ± SD (n = 3).
[2] ND, not detected and/or less than LOD.

assay)을 시행하였다. Size-exclusion column을 이용한 HPLC 분석을 통해 50, 200, 500 mg/kg의 농도로 3회 반복하여 분석한 결과(Table 2) intra-day의 경우 99.6~127.6%의 정확도를 나타내었으며, inter-day의 경우 94.3~121.9%의 정확도를 나타내었다. 정밀도(Table 2)는 intra-day의 경우 3.0~8.3%의 CV를 나타내었으며, inter-day의 경우 1.3~2.6%의 CV를 나타내었다.

가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 함량 분석

확립된 HPLC-SEC 분석법을 이용하여 국내 유통 가공식품 125품목을 대상으로 폴리아크릴산나트륨 함량을 조사하였다. 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨이 검출된 시료는 총 125건 중 40건이었으며(Table 3), 식품 유형에 따라 면류 7건(검체수 30건), 음료류 4건(검체수 12건), 과자류 5건(검체수 10건), 드레싱류 10건(검체수 15건), 토마토케찹 3건(검체수 10건), 장류 1건(검체수 10건), 잼류 8건(검체수 12건), 밀가루류 2건(검체수 16건)으로 확인되었다. 본 연구에서 시험에 사용한 가공식품 중 폴리아크릴산나트륨 함량은 빵류에서는 불검출(검체수 10건)로 확인되었으며, 면류(불검출-0.04%), 음료류(불검출-0.01%), 과자류(불검출-0.02%), 드레싱류(불검출-0.10%), 토마토케찹(불검출-0.03%), 장류(불검출-0.03%), 잼류(불검출-0.12%), 밀가루류(불검출-0.05%)에서 확인되었으며, 시험에 사용한 가공식품 125품목 모두 식품첨가물공전[3]에서 제시한 폴리아크릴산나트륨 사용기준인 0.2% 이하로 함유되어 있는 것이 확인되었다.

국문요약

가공식품에서 폴리아크릴산나트륨에 대한 분석 방법을 size-exclusion chromatography를 사용하여 개발하고 유통 중인 가공식품에 대해 모니터링 하였다. 분석조건에 대하여 GF-7M HQ column과 UV / VIS 검출기를 피크 모양과 선형성을 기준으로 선택하였으며, 유속, column oven 온도 및 이동상은 각각 0.6 mL/min, 45°C 및 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0)으로 선정되었다. 시료의 전처리를 위하여 pH 7.0의 50 mM sodium phosphate buffer로 20°C, 150 rpm에서 3 시간 동안 추출하였다. 확립된 분석법을 검증한 결과 적절한 선택성을 나타내었으며, 검량선은 50~500 mg/L의 범위에서 선정되었고, 이때 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9985로 나타났다. 폴리아크릴산나트륨의 검출한계(LOD)는 10.95 mg/kg으로 정량한계(LOQ)는 33.19 mg/kg의 값을 얻었으며, 정밀도는 intra-day의 경우 3.0~8.3%를, inter day의 경우 1.3~2.6%로 확인되었다. 정확도는 intra-day의 경우 99.6~127.6%를 나타내었으며, inter-day의 경우 94.3~121.9%로 확인되었다. 유통 중인 가공식품 125품목을 대상으로 폴리아크릴산나트륨의 함유량을 분석한 결과 40품목에서 검출되었으며, 검출량은 식품첨가물공전의 규격인 0.2% 미만으로 검출되었다. 본 연구

결과는 size-exclusion chromatography에 의한 분석방법이 가공식품에서 폴리아크릴산나트륨을 분석하는데 적용할 수 있는 적합한 방법이라는 것을 나타내었다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처의 연구개발비(14162MFDS008)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Shin D.H., Kim D.S., Kim Y.S.: Well Defined Food Additives. Public Health Edu, Seoul, Korea. p.160 (2014).
2. Woo, S.H., Chung, D.O., Hwang, S.Y., Lee, K.Y., Lee, H.S., Geum, B.Y.: Food Additives 7th. Shin Gwang Munhwasa. Korea. p.249 (2012).
3. KFDA. Food Additives Code. Korea Food and Drug Administration. Cheongju, Korea p.1744 (2017).
4. Chee, S.K.: New food additives theory and experiment. The Food Journal, Seoul, Korea. p.287-288 (2000).
5. Shin D.H., Kim D.S., Kim Y.S.: Well Defined Food Additives. Public Health Edu, Seoul, Korea. p.165 (2014).
6. Pan Z.L., Ai Z.L., Wang T., Wang Y.H., Zhang Z.L.: Effect of hydrocolloids on the energy consumption and quality of frozen noodles. *J. Food Sci. Technol*., **53**, 2414-2421 (2016).
7. New Scientist: Surge in obesity and diabetes could be linked to food additive. https://www.newscientist.com/article/2076906-surge-in-obesity-and-diabetes-could-be-linked-to-food-additives/#. Assessed February 9 (2016).
8. Ministry of Health, Labour and Welfare. The Specifications and Standards of Foods and Food Additives. http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/980837ba5d9b0d28492575d6000785e6?OpenDocument (2015).
9. Kim, K.S., Han, C.W., Joung, K.H., Lee, S.K.: Quality characteristics of rice noodles with organic acid and thickening agents. *J. Korea Acad. Ind. Coop. Soc.,* **10**, 1148-1156 (2009).
10. Buzanowski, W.C., Cutie, S.S., Howell, R., Papenfuss, R., Smith, C.G.: Determination of sodium polyacrylate by pyrolysis-gas chromatography. *J. Chromatog. A,* **677**, 355-364 (1994).
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International. Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, San Diego, CA, USA. pp. 1-13. (2005).
12. SAS Institute, Inc.: SAS User Guide. ver. 6. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990).
13. Deshmukh, B., Harfmann, R.G., Conklin, J., Turowski, M., Lynch, S.: Validation of a size exclusion liquid chromatographic method for determination of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose food gums as soluble dietary fiber in food and food product. *Food Chem*., **104**, 852-857 (2007).
14. Cohen A., Schagerlöf H., Nilsson C., Melander C., Tjerneld F., Gorton L.: Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of enzyme-hydrolysed carboxymethylcellulse for investigation of enzyme selectivity and substituent pattern. *J. Chromatog. A*, **1029**, 87-95 (2004).
15. Elyashevich G.K., Bel'nikevich N.G., Vesnebolotskaya S.A.: Swelling-contraction of sodium polyacrylate hydrogels in media with various pH values. *Polymer Sci*., **51**, 550-553 (2009).
16. Gomez-Ordonez, E., Jimenex-Escrig, A., Ruperez, P.: Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Talanta,* **93**, 153-159 (2012).