pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 2, pp. 148~157 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.2.148

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

식품 중 철클로로필린나트륨의 HPLC 및 LC/MS 최적 분석법과 타당성 검증

정희선[1] · 박영주[1] · 김은겸[1] · 박예림[1] · 김진미[1] · 야마구치토쿠타로[1] · 이찬[2] · 서희재[1]*

[1]선문대학교 식품바이오 융합연구소
[2]중앙대학교 식품공학부

The Optimization and Verification of an Analytical Method for Sodium Iron Chlorophyllin in Foods Using HPLC and LC/MS

Hee Sun Chong[1], Yeong Ju Park[1], Eun Gyeom Kim[1], Yea Lim Park[1], Jin Mi Kim[1], Tokutaro Yamaguchi[1], Chan Lee[2], and Hee-Jae Suh[1]*

[1]*Research Center for Food and Bio Convergence, Department of Food Science, Sun Moon University, Ansan, Korea*
[2]*Advanced Food Safety Research Group, BrainKorea21 Plus, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Korea*

(Received March 11, 2019/Revised April 2, 2019/Accepted April 3, 2019)

ABSTRACT - An optimized analytical method for sodium iron chloriphyllin in foods was established and verified by using high performance liquid chromatography with attached diode array detection. An Inertsil ODS-2 column and methanol-water (80:20 containing 1% acetate) as a mobile phase were employed. The limit of detection and quantitation of sodium iron chloriphyllin were 0.1 and 0.3 mg/kg, respectively, and the linearity of calibration curve was excellent ($R^2 = 0.9999$). The accuracy and precision were 93.9~104.95% and 2.0~7.7% in both inter-day and intra-day tests. Recoveries for candy and salad dressing were ranged between 93 and 104% (relative standard deviation, (RSD) 0.3~4.3%), and between 83 and 115% (RSD 1.2~2.0%), respectively. Liquid chromatography mass spectrometry was used to verify the main components of sodium iron chlorophyllin which were Fe-isochlorin e4 and Fe-chlorin e4.

Key words : Sodium iron chlorophyllin, Colorant, HPLC, LC/MS

착색료는 식품의 제조·가공 중에 발생하는 품질 저하를 방지하고 식품에 색을 부여하여 외관을 향상시킬 목적으로 사용되고 있으며, 주로 음료류, 빙과류, 과자류, 젤리류, 통조림, 유제품, 식육제품 등에 사용되고 있다[1].

철클로로필린나트륨(sodium iron chlorophyllin)은 녹색 식물의 클로로필에 수산화나트륨을 첨가하여 클로로필나트륨 형태로 제조한 후 4개의 피롤고리 중심에 위치한 마그네슘이온(Mg^{++})을 철이온(Fe^{++})으로 치환하여 제조한다[2]. 철클로로필린나트륨은 기본 구조에 결합하는 관능기에 따라 몇 가지 유도체로 분류될 수 있으며, 철페오포르바이드 a(Iron(III) pheophorbide a), 철클로린 e6(Iron(III) chlorin e6), 철클로린 e4(Iron(III) chlorin e4), 철아이소클로린 e4(Iron(III) isochlorin e4) 등의 예가 있다[3](Fig. 1). 밝은 녹갈색을 띠는 철클로로필린나트륨은 물, 알코올, 아세톤에 잘 용해되고, 에테르에는 용해되지 않는 특성을 갖고 있다[4]. 현재 국제식품규격(CODEX), 유럽연합(EU), 미국 등 서방 국가에서는 철클로로필린나트륨이 착색료로 지정되어 있지 않은데, 이는 철클로로필린나트륨 보다 진한 색을 띠는 동클로로필린나트륨을 주로 사용하고 있기 때문으로 추정된다. 한편, 우리나라에서는 철클로로필린나트륨을 식품 착색료로서 천연식품(식육류, 어패류(고래고기포함), 과실류, 채소류, 해조류, 콩류 및 그 단순가공품, 다류, 커피, 고춧가루/ 실고추, 김치류, 고추장/조미고추장, 식초 등을 제외한 모든 식품에 사용할 수 있도록 허용되어 있으며, 일본에서는 신선한 생선 및 조개류(고래고기 포함), 다시마, 미역, 콩과식물, 김, 차잎을 제외한 모든 식품에 사용할 수 있는 것으로 규정되어 있다[4,5]. 또한 우리나라와 일본 모두 사용량은 별도로 규정하지 않고 있다. Toyoda 등이 연구한 철클로로필린나트륨의 독성실험 결과, 쥐의 최대무작용량이 수컷과 암컷에서 각각 608 mg/kg bw/day, 678 mg/kg bw/day 라고 보고하여 국제식품규격이 보고한 동클로로필린

*Correspondence to: Hee-Jae Suh, Department of Food Science, Sun Moon University, Chungchengnam-do 31460, Korea
Tel: +82-41-530-2267, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: suhhj@sunmoon.ac.kr

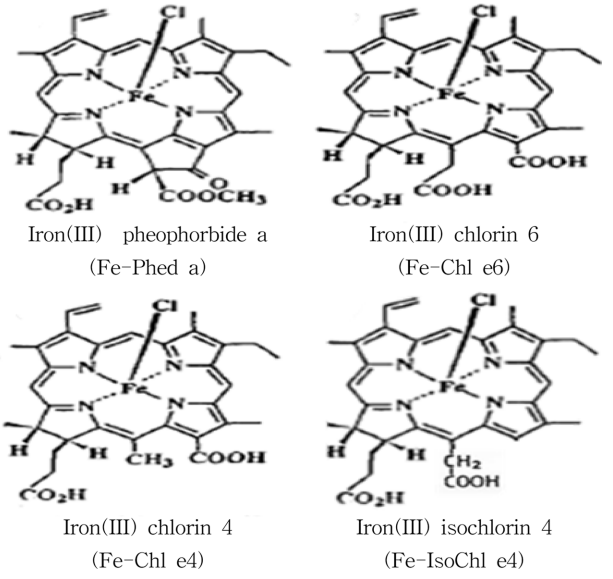


Fig. 1. Structure of iron chlorins

나트륨의 최대무작용량 1500 mg/kg bw/day 보다 낮은 수준인 것을 알 수 있다[6,7].

식품 중에 함유되어 있는 철클로로필린나트륨 분석방법에 대한 연구는 Nonomura 등[2]과 Zhan 등[8]에 의해 보고된 바 있으나, 이들 연구에서는 HPLC 기기분석 조건만 주로 보고되었고, 실제로 철클로로필린나트륨이 함유된 수용성 및 지용성 식품으로부터 철클로로필린나트륨을 추출하고, 그 분석법에 대한 타당성을 평가한 연구는 현재까지 보고된 사례가 없다.

이에 본 연구에서는 철클로로필린나트륨 분석법에 대한 선행 연구를 토대로 기기분석 조건과 전처리법 등을 검토하여 최적의 HPLC 기기분석 조건 및 전처리 방법을 확립할 뿐만 아니라, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성, 회수율 등을 수행하여 확립된 분석법의 타당성을 평가하고자 하였다. 또한, 철클로로필린나트륨을 구성하는 주요 유도체를 분석하기 위해 LC/MS 분석법을 확립하고자 하였다. 본 연구의 결과는 향후 철클로로필린나트륨의 공인 분석 방법으로 활용되거나 식품첨가물의 효율적인 안전관리에 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

Materials and Methods

시약 및 시액

철클로로필린나트륨은 Wako(Osaka, Japan)에서 구입하였으며, 표준품으로 사용하기 위해 식품첨가물 공전의 순도 시험법에 따라 순도를 확인한 후, 국제식품첨가물 전문가 위원회(JECFA)에서 권고한 방법으로 농도 표준화를 하여 실험에 사용하였다[9,10]. 순도 시험용 인산버퍼(Phosphate buffer)는 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, Mo, USA)에서 구매하였고, HPLC 용매 제조용 물(water), 메탄올(methanol), 아세톤(aceton), 아세토나이트릴(acetonitrile)은 Samchun Chemical Co. (Seoul, Korea)에서 구매하였으며, 초산(acetic acid)은 Avantor (Center Valley. PA, USA) 제품을 사용하였다. 철클로로필린나트륨의 전처리에 사용된 에틸아세테이트(ethyl acetate)와 0.1 N 염산(hydrochloric acid)은 Samchun Chemical Co. (Seoul, Korea), 헥산(hexane), 에틸 에테르(Ethyl ether), 석유 에테르(petroleum ether)는 Daejung Chemical Inc. (Goryeong, Korea)로부터 구매하여 사용하였다. 또한, 전처리 과정에서 Oasis HLB 6 cc(200 mg) cartridge (Waters, Santry. Dublin, Ireland)와 0.2 μm PVDF membrane Filter (Whatman, Maidstone, England)를 사용하였다.

표준품 순도 결정 및 표준용액 제조

철클로로필린나트륨은 일반시약(commercial grade)으로만 판매되고 있기 때문에, 철클로로필린나트륨(commercial grade) 시약을 구매한 후(Wako, Osaka, Japan), 식품첨가물 공전 방법에 따라 순도를 측정하였다. 철클로로필린나트륨 1 g을 정밀히 달아 1 M 인산버퍼(pH 7.5)를 이용하여 100,000배 희석하고, 분광광도계(vision, Seoul, Korea)를 이용하여 398 nm에서 흡광도를 측정하였다. 식(1)의 방법으로 철클로로필린나트륨의 순도를 산출 한 후 이를 적용하여 10, 25, 50, 100, 300, 500 μg/mL 농도로 제조한 시액을 표준시액으로 사용하였다[3,9,10].

$$\text{함량 (\%)} = \frac{\text{흡광도} \times \text{희석배수}}{400 \times \text{검체의 채추량(g)}} \quad \cdots\cdots (1)$$

(철클로로필린나트륨 비 흡광도 400 : $E_{1cm}^{\%}$)

분석 장비 및 기기

식품 중에 함유된 철클로로필린나트륨을 정량하기 위해서 HPLC Agilent Technologies 1260 infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA), Agilent 1260 photodiode-array (PDA) (Agilent, Santa Clara, CA, USA), Inertsil ODS-2 column(5 μm, 4.6 × 250 mm, GL Sciences, Shinjuku, Japan)을 사용하였다. 철클로로필린나트륨의 유도체 분석을 위한 장비로는 UPLC-MS (Waters Synapt G2-S, Acquity UPLC, Milford, MA, USA), UPLC BEH C_{18} column (1.7 μm, 2.1 i.d. × 100 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다.

HPLC 및 LC-MS 분석

철클로로필린나트륨 분석에 관한 선행연구[2,3,8]를 검토하여 예비실험을 한 후, 본 연구에 사용할 분석 기기와 컬럼을 HPLC-PDA (Agilent, Santa Clara, CA, USA)와 Inertsil ODS-2 컬럼(4.6 mm × 250, GL Science, Shinjuku, Japan)으로 선정하였다. 이동상으로는 메탄올, 물, 초산 등을 이용하여 각 이동상 조성을 달리한 예비실험 결과를

토대로 메탄올과 물(80:20, v/v, 1% 초산)로 결정하였다. 또한 철클로로필린나트륨의 최대 흡수파장을 확인하기 위하여 HPLC-PDA를 이용하여 전 파장 스캔을 수행한 후 390-396 nm가 최대 흡수부 임을 확인하였다. 철클로로필린나트륨 분석 조건은 Table 1과 같다.

철클로로필린나트륨을 구성하는 유도체와 구조 확인을 위해 UPLC-MS (Waters, USA)와 UPLC BEH C_{18} column (2.1 i.d. × 100 mm, Waters, USA)을 이용하여 Table 2의 조건으로 분석하였다.

시료 전처리

수용성과 지용성 식품 중에 함유된 철클로로필린나트륨 추출에 대한 연구는 현재까지 보고된 사례가 없으며, 동클로로필린류의 추출에 관한 연구만이 일부 보고되었다[11,13]. 식품 중에 함유된 철클로로필린나트륨의 최적 전처리법을 확립하기 위하여 동클로로필린류 추출법을 일부 수정한 방법을 이용하여 각 전처리법을 비교해 보았다[14].

수용성 식품에 함유된 철클로로필린나트륨 추출을 위해서는 변형된 Scotter 등[11]의 방법(전처리법 1), 변형된 Yasuda 등[12]의 방법(전처리법 2), Chong 등[14]의 방법(전처리법 3)을 비교하였다. 각 전처리법의 과정은 Fig. 2에 제시하였다[15]. 샐러드드레싱 등 지용성 식품에 함유된 철클로로필린나트륨을 추출하기 위해서는 먼저 유기 용매를 이용하여 유지를 제거한 후 철클로로필린나트륨을 추출하였다. 코티티시험연구원에서 보고된 방법[13]을 참고하여 변형 전처리법 4, 변형 전처리법 5와 Chong 등[14]의 방법인 전처리법 6을 비교하였다(Fig. 2). 기기분석용 최종 추출액이 연하게 착색된 경우에는 질소농축을 한 후 HPLC용 시험용액으로 사용하였다.

Table 1. HPLC analytical conditions for sodium iron chlorophyllin

Instrument	Agilent 1260 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
Column	Inertsil ODS-2 (4.6 mm × 250 mm, GL science, Shinjuku, Japan)
Mobile phase	Methanol : Water(80:20) including 1% acetic acid
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	35°C
Detector	Agilent 1260 Diode array detector (390 nm)
Injection volume	10 μl
Running time	20 min

1) modified method by chong et al.[3]

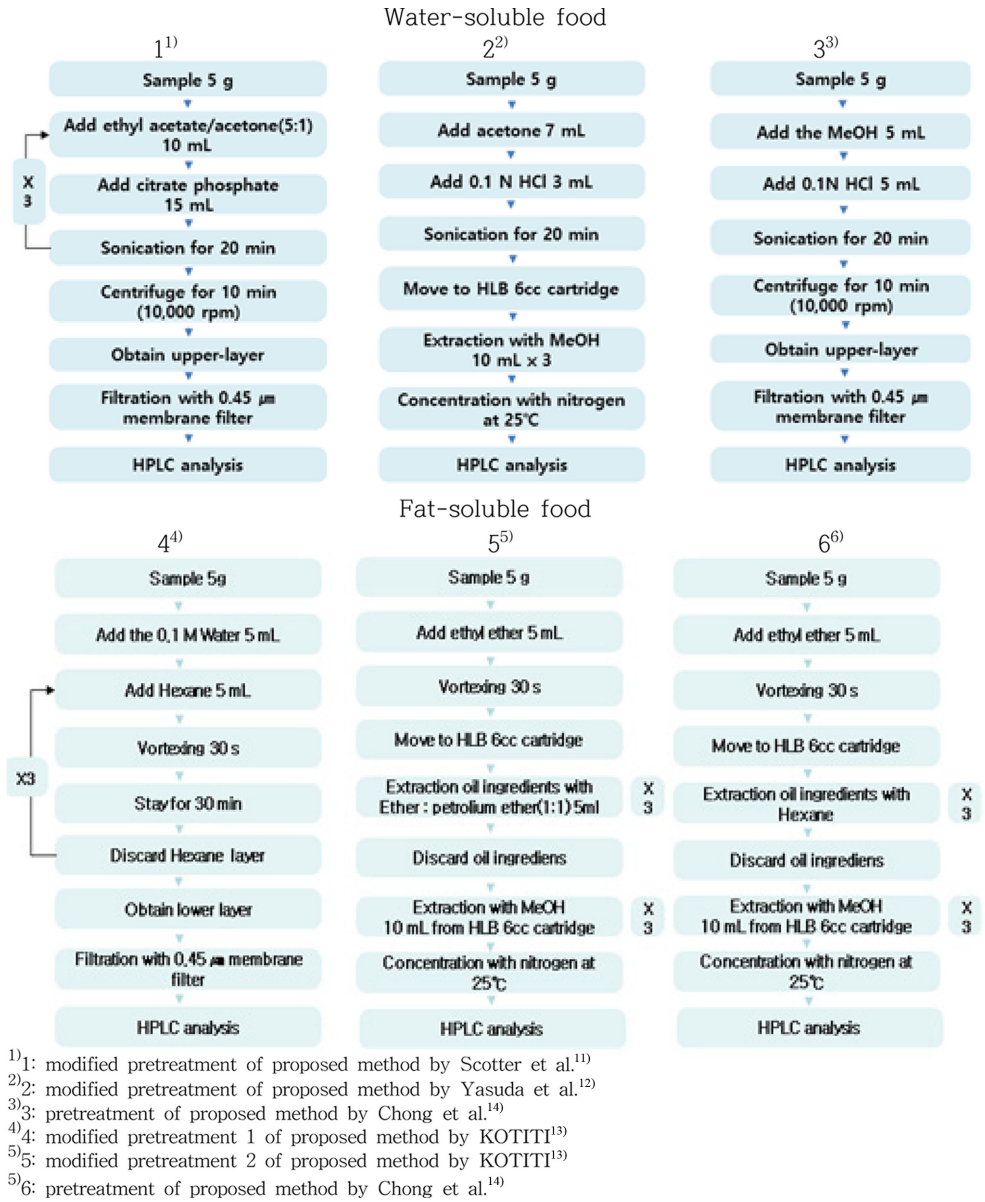
최적 분석법 타당성 검증(method validation)

직선성, 검출한계, 정량한계

시판 철클로로필린나트륨(Wako, Japan)에 순도 실험 결과를 적용하여 10, 25, 50, 100, 300, 500 μg/mL 농도로 제조한 후 표준용액으로 사용하였다. Table 1의 조건으로 HPLC 분석을 수행한 후 각 농도별 피크면적을 이용하여 검량선을 작성하고 직선의 기울기(R^2)를 구하여 직선성을 검토하였다. 또한 5, 10, 25 μg/mL로 제조된 표준용액으로부터 구한 검량선의 기울기와 중간농도(10 μg/mL)를 7회

Table 2. The LC-MS analytical conditions for sodium iron chlorophyllin

Instrument	LC-MS (liquid chromatograph-mass spectrometer, Waters SYNAPT G2-S, Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, USA)			
Column	Acquity UPLC ® BEH C 18 (1.7 μm, 2.1 i.d. × 100 mm)			
Ionization mode	ESI-LC-MS			
Detection mode	TOF(Time of Flight)			
Mobile phase	A: Water B: Acetonitrile, A : B = 62.5 : 37.5			
	Time(min)	%A	%B	Curve
	Initial	62.5	37.5	7
	4.00	10.0	90.0	5
	7.00	0.0	100.0	6
	9.50	0.0	100.0	6
	9.60	62.5	37.5	6
	12.00	62.5	37.5	6
Column Temp.	35°C			
Flow rate	0.35 mL/min			
Injection volume	5.0 μL			
Run time	12 min			



[1)]1: modified pretreatment of proposed method by Scotter et al.[11)]
[2)]2: modified pretreatment of proposed method by Yasuda et al.[12)]
[3)]3: pretreatment of proposed method by Chong et al.[14)]
[4)]4: modified pretreatment 1 of proposed method by KOTITI[13)]
[5)]5: modified pretreatment 2 of proposed method by KOTITI[13)]
[5)]6: pretreatment of proposed method by Chong et al.[14)]

Fig. 2. Pre-treatment methods of sodium iron chlorophyllin in water-soluble food and fat-soluble food[15)].

분석하여 얻은 표준편차를 이용하여 식(2)의 방법으로 검출한계(LOD)와 정량한계 (LOQ)를 산출하였다[16)].

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S \quad \cdots\cdots (2)$$

$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$ (σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

정확도, 정밀도, 회수율

최적 분석법의 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 측정을 위해 다양한 농도로 조제한 시험용액으로 일내분석과 일간분석을 수행하였다. 30, 60, 120, 180 μg/mL 4가지 농도의 시험용액을 하루에 5반복 측정하고(일내분석), 한편으로는 10, 25, 50, 100, 300, 500 μg/mL 6가지 농도의 시험용액을 하루에 1회씩 3일 동안 측정하여(일간분석), 이 결과들의 평균과 표준편차를 산출하였다. 회수율(recovery)은 수용성 식품과 지용성 식품 매트릭스(캔디, 샐러드드레싱)에 철클로로필린나트륨 표준용액을 3가지 농도(10, 50, 100 μg/mL)로 각각 첨가한 후 분석한 측정값과 이론값을 비교하여 산출하였다.

통계분석

본 연구에서 수행한 철클로로필린나트륨의 모든 분석 결과는 엑셀(Excel 2010, Microsoft, USA)을 이용하여 산술평균, 표준오차, 표준편차, 상대 표준편차(RSD %) 등을 산출하였다.

시판 식품 중의 철클로로필린나트륨 분석

철클로로필린나트륨을 함유하는 식품에 본 연구에서 개발한 분석법의 적용 가능 여부를 확인하기 위하여 철클로로필린나트륨 사용대상 식품 75건을 국내외에서 구매하고, HPLC 및 LC-MS를 사용하여 분석하였다.

Results and Discussion

철클로로필린나트륨 검량선 표준화

시판되고 있는 철클로로필린나트륨 시약을(sodium iron chlorophyllin , Wako, Osaka, Japan) 1 g 취하여 1 M 인산버퍼(pH 7.5)로 100,000 배 희석한 후 398 nm에서 흡광도를 측정하였다. 10회 반복 측정한 후 식(1)을 이용하여 철클로로필린나트륨 순도를 계산한 결과 88.7%이었다. 본 연구에서 수행한 모든 분석에서(검량선 및 회수율 측정 등) 철클로로필린나트륨 농도는 이 순도를 적용한 값으로 표준화(calibration)하여 사용하였다.

철클로로필린나트륨의 HPLC 분석법

철클로로필린나트륨의 기존분석법들[2,3,8]을 참고하여 다양한 칼럼, 이동상 조성, 최대흡수파장 등을 검토해본 결과 HPLC-PDA (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 Table 1의 조건으로 분석할 때, 가장 우수한 분리능과 머무름 시간을 나타내었다. 이동상으로 사용된 메탄올:물(80:20, v/v)에 초산의 함유량을 달리하여 비교해본 결과 초산을 1% 이상 첨가할 경우 피크가 너무 빨리 나오면서 다른 피크들과 겹치는 현상이 발생하였으며 1% 미만 넣을 경우에는 피크에 테일링이 나타나 선택성이 감소되었다. 초산을 1% 정도 함유할 때 분리능과 선택성은 각각 6.5와 2.1을 나타내었으며, 적절한 머무름 시간을 확보할 수 있었다. 이는 염산을 첨가할 때 금속로로필린나트륨의 카르복실 그룹에 전자이탈을 방지하여 적절한 시간을 확보할 수 있었다는 선행연구[17]와 유사한 결과이다. 또한 철클로로필린나트륨을 200~700 nm의 범위에서 측정해본 결과 390~396 nm에서 최대 흡수부를 나타내었다.

LC-MS 이용한 철클로로필린나트륨의 유도체 분석

LC-MS (Waters, Milford, MA, USA)로 분석하여 얻은 철클로로필린나트륨의 유도체는 Fig. 3과 같이 나타났다. Fig. 3의 크로마토그램에서 4분 이내에 검출되는 피크는 철과 결합되어 있는 클로로필린 이었고, 4분 이후의 피크는 철이 붙어있지 않은 클로로필린 형태인 것으로 나타났다. 2.6분에 검출되는 피크는 철클로린 e6(Fe-chlorin e6)로서 분자량은 650.18(최대 흡수 파장 393 nm)이었다. 3.26분에 검출되는 피크는 철클로린 e4(Fe-chlorin e4)로서 분자량은 604.17이고(최대 흡수 파장 396 nm), 3.46분에 검출되는 피크는 철이소클로린 e4(Fe-isochlorin e4)로서 분자량 606.19(최대 흡수 파장 392 nm)의 철클로로필린나트륨 유도체로 확인되었다. 그러나 철클로린 e6는 그 함량이 미량인 것으로 나타나, 철클로로필린나트륨의 주요 유도체는 철클로린 e4와 철이소클로린 e4의 두 종류이며, 392~396 nm에서 최대 흡수부를 갖는다는 것을 알 수 있었다.

철클로로필린나트륨의 전처리법 확립

수용성 식품 중 함유되어 있는 철클로로필린나트륨을 추출하기 위해서 색소를 함유하지 않은 백색의 캔디에 농도가 10, 50, 100 mg/kg이 되도록 철클로로필린나트륨을 첨가한 후 3가지 전처리법을 비교하였다. Table 3에서 보듯이 전처리법 1(변형된 Scotter 등의 방법)은 모든 농도에서 정량한계 이하로 나타났고, 전처리법 2(변형된 Yasuda 등[12]의 방법)는 10 mg/kg에서는 정량한계 이하이지만 50, 100 mg/kg에서는 29.0~37.6%의 회수율을 나타내었다(RSD 1.5~2.1%). 전처리법 3은 10~100 mg/kg 농도에서 회수율이 93.3~104.4%(RSD 0.3~4.3%)로 나타나 국제표준화 기구(ISO)의 권장 범위인 95~105%에 근접하였다[18,19]. 이상의 결과에서 수용성 식품에 함유된 철클로로필린나트륨을 추출하기 위해서는 시료를 0.1 N 염산과 메탄올 각 5 mL씩을 첨가하여 초음파 추출한 후 0.2 μm PVDF membrane filter로 여과하는 전처리법 3이 가장 좋은 방법임을 알 수 있었다.

또한 지용성 식품 중 함유되어 있는 철클로로필린나트륨을 추출하기 위해 철클로로필린나트륨이 첨가되지 않은 샐러드드레싱에 상기의 농도와 같이 철클로로필린나트륨을 첨가한 후 코티티의 전처리법을 변형한 전처리법 4와 전처리법 5 그리고 Chong 등[14]의 방법인 전처리법 6을 비교하였다. Table 3의 결과를 보면, 에테르:석유 에테르(1:1, v/v)로 유지 제거 후 색소를 추출하는 전처리법 4는 모든 농도에서 정량한계 이하로 나타났는데 이는 에테르가 유지뿐만 아니라 철클로로필린나트륨도 함께 용출하여 유지 제거 과정에서 색소를 모두 손실하기 때문에 나타난 결과이었다. 반면, 헥산으로 유지를 제거하는 전처리법 5와 전처리법 6은 회수율이 각각 63.9~74.3%(RSD 1.2~2.0%)와 82.6~114.9%(RSD 4.4~9.8%)로 나타났다. 전처리법 6에서는 전처리법 5에서 사용한 HLB 카트리지 대신 층 분리법을 이용하여 헥산층을 제거하고 착색된 물층의 철클로로필린나트륨을 추출함으로써 회수율을 향상시킬 수 있었다. 불필요한 카트리지의 사용을 줄인 것이 회수율을 향상시킨 주된 요인이었다.

최적 분석법의 타당성 평가 (Method Validation)

최적 분석법의 타당성을 검증하기 위하여 검량선의 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도, 회수율을 검토하였다. 검량선의 R^2는 0.9999, 검출한계는 0.1 mg/kg, 정량한계는 0.3 mg/kg, 분리능은 6.5, 선택성은 2.1로 매우 우수한 결과를 나타내었다(Table 4). 정확도와 정밀도는 일

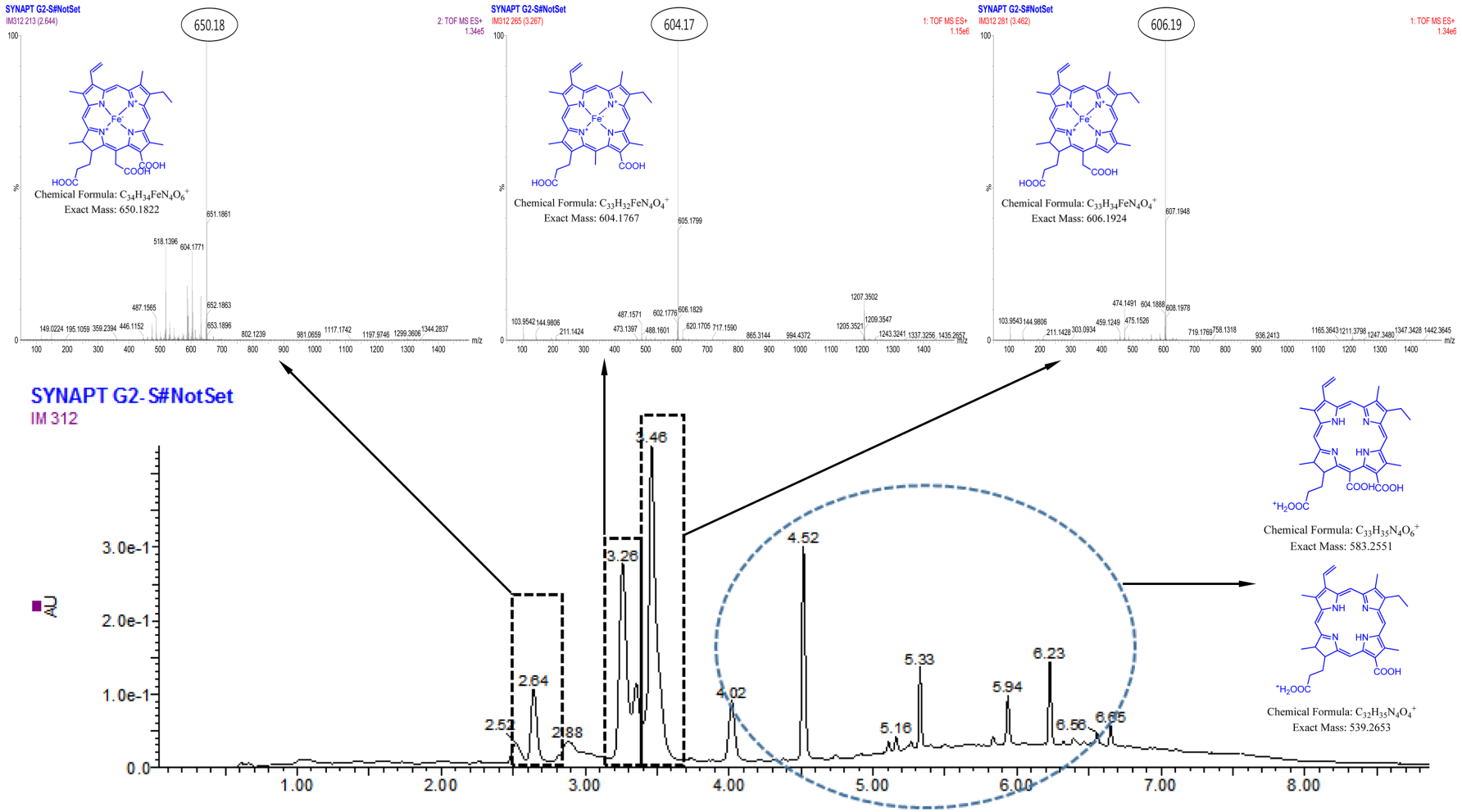


Fig. 3. LC-MS chromatogram of sodium iron chlorophyllin.

내 분석에서 각각 93.9~100.8%, 2.0~5.4%와 일간 분석에서 99.3~104.95%, 4.6~7.7%로 나타났다(Table 4). 국제표준화 기구[19]에서는 일내분석과 일간분석의 정밀도를 각각 20%이하, 30%이하로 권고하고 있으므로 본 연구 결과는 그 타당성이 검증되었다.

철클로로필린나트륨의 회수율을 측정하기 위해 수용성 식품(캔디)과 지용성 식품(샐러드드레싱)에 표준용액을 10, 50, 100 mg/kg의 농도로 첨가하여 Fig. 2의 전처리법 3으

Table 3. Comparison of various pretreatment methods of sodium iron chlorophyllin in foods

Water soluble food				Fat soluble food			
Method	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)	Method	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
1[1)]	10	<LOQ	-	4[4)]	10	<LOQ	-
	50	<LOQ	-		50	<LOQ	-
	100	<LOQ	-		100	<LOQ	-
2[2)]	10	<LOQ	-	5[5)]	10	65.3	1.4
	50	29.0	2.1		50	74.3	2.0
	100	37.6	1.5		100	63.9	1.2
3[3)]	10	93.3	0.3	6[6)]	10	82.6	5.9
	50	103.7	4.3		50	105.8	4.4
	100	104.4	2.2		100	114.9	9.8

[1)]1: modified pretreatment of proposed method by Scotter et al.[11)]
[2)]2: modified pretreatment of proposed method by Yasuda et al.[12)]
[3)]3: pretreatment of proposed method by Chong et al.[14)]
[4)]4: modified pretreatment 1 of proposed method by KOTITI[13)]
[5)]5: modified pretreatment 2 of proposed method by KOTITI[13)]
[6)]6: pretreatment of proposed method by Chong et al.[14)]

Table 4. Results of method validation of sodium iron chlorophyllin by HPLC analytical method

	R^2 (correlation coefficient)		Limit of detection (mg/kg)		Limit of quantification (mg/kg)		Resolution		Selectivity	
Calculation	0.9999		0.1		0.3		6.5		2.1	
	Inter-day test						Intra-day			
	Concentration (mg/kg, n=3)						Concentration (mg/kg, n=4)			
	10	25	50	100	300	500	30	60	120	240
Mean	10.49	25.21	50.41	101.21	297.90	500.11	28.2	59.0	118.3	241.48
Precision	7.66	5.01	5.29	5.57	4.55	6.24	5.4	4.3	3.3	2.0
Accuracy (%)	104.95	100.85	100.83	101.21	99.30	100.02	93.9	98.3	98.6	100.8

Table 5. Recoveries of sodium iron chlorophyllin in foods by optimal analytical method

	Food category					
	Water soluble food			Fat soluble food		
Conc. (mg/kg)	10	50	100	10	50	100
Mean	9.33	51.85	104.37	8.26	52.92	114.89
SD	0.03	2.15	2.22	0.60	2.18	9.79
Recovery (%)	93.3	103.7	104.4	82.6	105.8	114.9
RSD	0.3	4.3	2.2	5.9	4.4	9.8

로 실험한 결과는 Table 5와 같이 나타났다. 캔디의 회수율은 93.3~104.4%(RSD 0.3~4.3%), 샐러드드레싱의 회수율은 82.6~114.9%(RSD 1.2~2.0%)로 나타나 유럽연합(EU)의 권장 허용범위인 70~120%에 적합하였다[19].

시판 식품 중 철클로로필린나트륨 분석

국내·외 철클로로필린나트륨 사용대상 식품(과실 및 채소 저장품, 껌류, 캔디류, 완두콩 통조림, 음료류, 조미식품 등) 총 75종을 구매하여 철 클로로필린나트륨을 분석한 결과 국내 식품 72종에서는 철클로로필린나트륨이 검출되지 않아 우리나라에서는 철클로로필린나트륨이 거의 사용되지 않는 것으로 나타났다. 한편 일본에서 구입한 3종의 시료에서는 철클로로필린나트륨이 검출되었으며, 검출 시료의 HPLC 및 LC/MS 크로마토그램은 Fig. 4와 같이 나타났다. 이상의 결과로 본 연구에서 확립한 철클로로필린나트륨의 HPLC 방법과 LC/MS 방법이 실제로 시판 식품 중에 함유된 철클로로필린나트륨 분석에 적용 가능 하다는 것을 확인할 수 있었다.

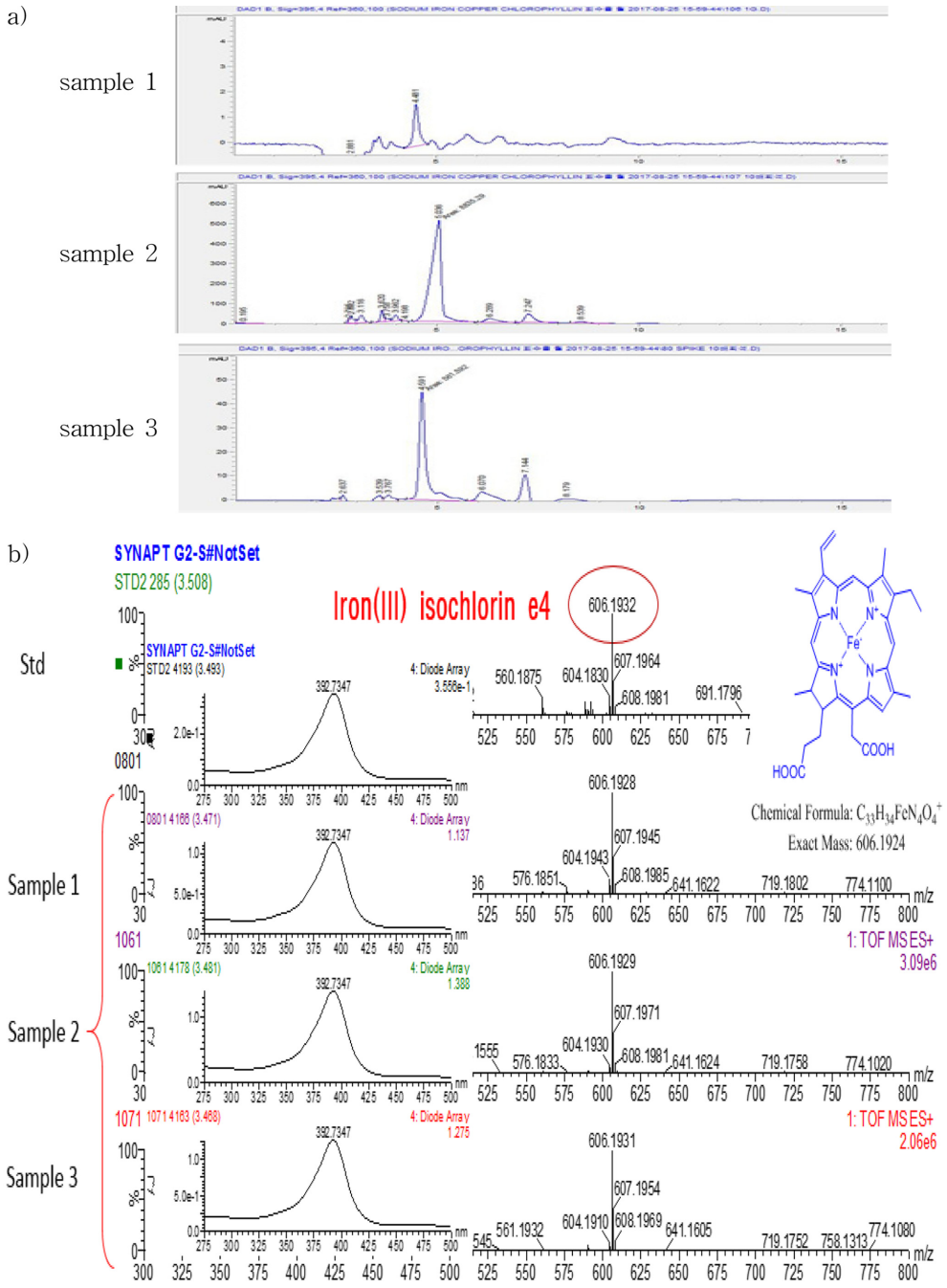


Fig. 4. HPLC and LC-MS chromatograms from positive sample of sodium iron chlorophyllin.

Acknowledgement

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처의 연구개발비(17162 MFDS021)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 현재 우리나라에서 착색료로 사용허가 되어 있지만 아직 분석법이 개발되지 않은 철클로로필린나트륨의 최적 분석법을 개발하기 위하여 진행되었다. 철클로로필린나트륨은 HPLC-PDA (390 nm), Inertsil ODS-2 column, 1% 초산을 함유한 메탄올-물(80:20, v/v)을 이동상으로 분석할 때 가장 우수한 분리능과 재현성을 나타내었다. UPLC/MS를 통하여 철클로로필린나트륨의 주유도체를 확인한 결과 철 클로린 e4(Fe-chlorin e4)와 철 이소클로린 e4(Fe-isochlorin e4)가 피크의 주요 구성성분임을 확인하였다. 최적 분석법의 타당성을 확보하기 위해 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도, 회수율 분석을 실시하였다. 검량선의 R^2은 0.9999, 검출한계는 0.1 mg/kg, 정량한계는 0.3 mg/kg로 나타나 직선성, 검출한계, 정량한계가 모두 우수하였다. 정확도는 일내분석 93.9~100.8%, 일간분석 99.3~104.95%로 나타났고, 정밀도는 일내분석 2.0~5.4%, 일간분석 4.6~7.7%로 나타났다. 회수율은 수용성 식품(캔디)과 지용성 식품(샐러드드레싱)에서 각각 93.3~104.4%(RSD 0.3~4.3%)과 82.6~114.9%(RSD 1.2~2.0%)로 나타나 국제표준화 기구(ISO)의 기준에 적합하였다. 본 연구는 식품 중 함유된 철클로로필린나트륨을 분석하고 그 유도체를 확인한 결과로 향후 공인분석 방법으로 활용 가치가 클 것으로 기대된다.

References

1. MFDS: Standards and specifications for food additives. *In Korea Food Additives Code.* Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Korea. No. 2017-100 (2017).
2. Nonomura, Y., Yamaguchi, M., Hara, T., Furuya, K., Yoshioka, N., Inoue, H.: High-performance liquid chromatographic separation of iron (III) chlorophyllin. *J. chromatography A*, **721**, 350-354 (1996).
3. Chong, H.S., Sim, S., Yamaguchi, T., Park, J., Lee, C., Kim, M., Suh, H. J.: Simultaneous determination of sodium iron chlorophyllin and sodium copper chlorophyllin in food using high-performance liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Food chemistry*, **276**, 390-396 (2019).
4. KFDA: Standards and specifications for food additives. *In Korea Food Additives Code*. Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea. No. 2013-2184 (2013).
5. Standards for Use, according to Use Categories Japan. Available from: https://www.ffcr.or.jp/en/tenka/standards-for-use/standards-for-use-of-food-additives.html. Accessed 10 Jul 2017.
6. Toyoda, T., Cho, Y.M., Mizuta, Y., Akagi, J.I., Nishikawa, A., Ogawa, K.: A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J. Toxicol. Sci*., **39**, 109-119 (2014).
7. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS): Scientific Opinion on re-evaluation of copper complexes of chlorophylls (E 141 (i)) and chlorophyllins (E 141 (ii)) as food additives. *EFSA J.*, **13**, 4151 (2015).
8. Zhan, R., Wu, J., Ouyang, J.: In vitro Antioxidant Activities of Sodium Zinc and Sodium Iron Chlorophyllins from Pine Needles. *Food Technol. Biotechnol.,* **52**, 505-510 (2014).
9. MFDS: *Korea Food Additives Code.* Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Korea. pp. 504 (2015).
10. JECFA: Purity specifications for chlorophyllins, copper complexes sodium and potassium salts. (1987) Available from: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-127.pdf. Accessed 10 Nov. 2017.
11. Scotter, M.J., Castle, L., Roberts, D.: Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141 [i]) and chlorophyllin (E141 [ii]) food colouring materials. *Food Add. Contam.*, **22**, 1163-1175 (2005).
12. Yasuda, K., Tadano, K., Ushiyama, H., Ogawa, H., Kawai, Y., Nishima, T.: Investigation to find an indicator substance for the analysis of sodium copper chlorophyllin in foods. *Food Hyg. Safety Sci.,* (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **36**, 710-716_1 (1995).
13. Ann, J.H., Lee, J.W., Kim, J.S., Koo, H.M., Yoo, Y.J., Jung, K.S., So, B.H.: Developing of the direct analytical method and monitoring for copper chlorophyll in foods. (2015). Available from: http://www.ndsl.kr/ndsl/commons/util/ndslOriginalView.do?dbt=TRKO&cn=TRKO201600010309&rn=&url=&pageCode=PG18. Accessed 14 Jul 2017.
14. Chong, H.S., Park, H.I., Cho, S.R., Lee, O.K., Park J.H., Lee, C., Suh, H.J.: Establishment and Validation of an Optimized Analytical Method for Sodium Copper Chlorophyllin in Food Using HPLC and LC/MS. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.,* **47**, 550-558 (2018).
15. Chong, H.S.: Development of the analytical methods for Sodium Copper Chlorophyllin and Sodium Iron Chlorophyllin, food additives by using HPLC and LC/MS. (2018). Available from: http://sunmoon.dcollection.net/public_resource/pdf/200000117182_20190226040927.pdf. Accessed 26 Feb 2019.
16. EMEA: *Validation of analytical procedures. Text and methodology.* European Medicines Agency, London, UK. pp. 8-15 (2006).
17. Mortensen, A., Geppel, A.: HPLC–MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. *Innovative food science & emerging technologies*, **8**, 419-425 (2007).
18. ISO: Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement

Methods and Results-Part 1. Introduction and basic principles. (2011). Available from: https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en:en. Accessed 10 Jul 2017.
19. European Commission: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed (Document No. SANCO/2007/3131). (2007). Available from: http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/Aqc-Guidance_Sanco_2007_3131.pdf. Accessed 10 Mar 2018.