pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 5, pp. 404~410 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.5.404

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

Size-exclusion chromatography법에 의한 식품 중 알긴산프로필렌글리콜 분석법 확립

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

Establishment of Analytical Method for Propylene Glycol Alginate in Food Products by Size-exclusion Chromatography

Eun-Jeong Jeong, Yoo-Jeong Choi, Gunyoung Lee[1], Sang Soon Yun[1], Ho Soo Lim[1], and Yong-Suk Kim*
Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Jeonju, Korea
[1]Food Additives and Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Korea
(Received August 17, 2017/Revised September 2, 2017/Accepted September 5, 2017)

ABSTRACT - An analytical method for determination of propylene glycol alginate (PGA) in food products was developed by HPLC-size-exclusion chromatography. The GF-7M HQ column and LT-ELSD detector were determined by considering the instrumental analysis conditions for PGA analysis. The pretreatment method for the analysis of PGA was suitable for 3 hr extraction at 20°C and 150 rpm according to the extraction temperature. Linearity (R^2) for the analysis of PGA was 0.9873 at calibration curve range of 300, 500, 700, 1,000, and 1,500 mg/kg (5 points). The limit of detection and limit of quantification of PGA on HPLC system was 171.43 and 519.50 mg/kg, respectively. The accuracy and coefficient of variation obtained by size-exclusion chromatography were 86.1~110.4% and 4.1~13.5%, respectively. By applying the HPLC-size-exclusion chromatography system, it was possible to analyze the contents of PGA in 134 different types of food products.

Key words : Propylene Glycol Alginate, Size-exclusion Chromatography, Food Additives, Analytical Method, Method Validation

식품 산업의 발전과 식품원료의 글로벌화, 식생활문화의 변화로 인하여 소비자의 기호도가 다양해짐에 따라 가공식품의 종류도 많아졌다. 이에 따라 더욱 새롭고 다양한 형태 및 종류의 가공식품에 대한 수요가 증가되고 있다. 이를 해소하기 위하여 다양한 식품의 기능(영양, 기호도, 편리성 등)을 얻을 수 있는 제품 개발의 필요성에 따라 여러 식품첨가물이 사용되고 있다[1].

증점제(thickeners)는 식물섬유로 여러 물리 · 화학적 성질을 가지고 있어 체내에서 장관의 연동촉진, 음식의 장관 통과시간 단축, 변 용적의 증가 등의 정장작용 이외에 생리작용에도 관여한다[2]. 증점제는 점착과 점도를 필요로 하는 식품에 첨가하는 것으로 식품성분간의 결착을 요구하는 것과 점도만을 증가시켜 식품에 안정성을 주기 위한 것이 있는데, 최근 친수성 고분자와 유화제를 이용하여 식품의 안정화를 유도하기 위해 사용하고 있다[3].

알긴산프로필렌글리콜(propylene glycol alginate, PGA)은 알긴산의 프로필렌글리콜 에스테르이며, D-mannuronic acid와 L-guluronic acid 단위의 혼합된 polymer로, 그 비율은 추출된 특정 해조류에 따라 다르게 나타난다[4]. 알긴산프로필렌글리콜의 화학식은$(C_9H_{14}O_7)_n$이며, 화학구조는 Fig. 1과 같다. 성질은 백~황색을 띠는 백색의 약간 굵은 또는 미세한 분말로서 냄새가 없으며 거의 맛이 없다. 분자량은 $(243)_n$으로 n은 100~800이며, 알코올, 클로로포름, 벤젠, 석유에테르에 녹지 않고, 냉수 및 온수에서 점조한 콜로이드용액이 되며, pH 3~4에서 안정하다[5].

알긴산프로필렌글리콜의 사용기준은 알긴산프로필렌글리콜로서 식품의 1% 이하로 설정되어 있으며[6], 다양한 식품에 사용이 가능하다. 국내에서는 1975년 이전에 지정된 식품첨가물로서, 일본, 미국, EU, Codex에 규격이 마련되어 있다. 그러나 식품첨가물로서 사용기준은 있으나 식품 중 시험법이 확립되어 있지 않아 식품첨가물의 사용기준

*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

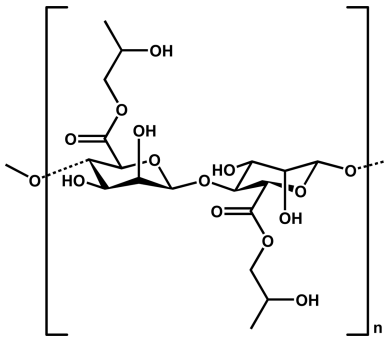

Fig. 1. The chemical structure of propylene glycol alginate.

을 초과하였는지에 대한 검사의 어려움이 있다.

알긴산프로필렌글리콜의 식품 적용에 관한 연구는 음료에 대한 적용실험[7]과 우유단백질에 대한 적용실험[8]이 진행되었으며, 알긴산프로필렌글리콜에 대한 안전성 연구[9], HPLC에 의한 propylene glycol alginate sodium sulfate의 mannuronic acid와 guluronic acid의 비율에 대한 연구[10]가 이루어졌으나, 식품 중 알긴산프로필렌글리콜의 함량을 직접 분석한 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 식품 중 분석법이 확립되어 있지 않은 알긴산프로필렌글리콜의 분석법을 개발하고자 HPLC-size-exclusion chromatography를 이용하여 알긴산프로필렌글리콜에 대하여 직접분석법을 개발하였다. 식품 중 함유량을 확인하기 위한 시료 전처리방법을 확립하였으며, 분석법에 대한 검증을 실시하여 확립된 분석법에 대한 신뢰성과 유용성을 확보하였고, 이 분석법을 적용하여 유통 중 식품 134 품목에 대하여 모니터링을 실시하였다.

Materials and Methods

시약 및 장비

연구에 사용한 증점제 표준품은 propylene glycol alginate (KIMICA Corporation, Chiba, Japan)을 사용하였다. 시험에 사용된 sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic은 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, HPLC grade water는 Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 이외의 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에서 검토한 기기는 HPLC (LC-20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하였으며, detector는 RI (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan), UV/VIS detector (SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan), LT-ELSD (SEDEX 80, SEDERE, Olivet, France)를 사용하였다. Column 오븐 온도는 35°C, 이동상의 유속은 0.8 mL/min이었으며, injection volume 10 μL로 분석하였다. UV/VIS detector의 경우 210 nm에서 분석하였으며, LT-ELSD는 evaporation tube 온도 45°C, 3.5 bar (N_2 gas)의 조건에서 분석하였다.

Column 및 분석법 확립

PGA 분석조건 설정을 위한 column 선정을 위해 size-exclusion column 중 종류 및 제한 분자량(exclusion 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-804HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm, exclusion limit M.W.: 1,000,000, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan), OHpak SB-806HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm, exclusion limit M.W.: 20,000,000, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)에 대하여 검토하였다. 또한 분리능 개선을 위해 단일 column과 2개의 column을 연결하여 분리정도를 비교실험 하였다. PGA분석을 위한 이동상을 선정하기 위해 water 및 sodium phosphate buffer를 isocratic 방법으로, water와 30% methanol을 gradient 방법으로 하여 비교하였다. 또한 이동상의 유속 설정을 위해 0.6 및 0.8 mL/min으로 분석하여 표준품의 분리능 및 피크모양을 비교하였다.

시료 전처리법 확립

PGA 분석을 위한 시료 전처리 방법을 확립하기 위하여 지방제거, 지방 및 단백질제거, 추출온도에 따른 실험을 진행하였다. 시료의 지방성분 제거를 위하여 PGA가 첨가된 시료 10 g을 250-mL 삼각플라스크에 넣고 증류수 90 mL를 가하여 30분 동안 초음파 추출하였다. 이를 원심분리하여 100 mL로 정용한 후 분액깔대기에 넣고 *n*-hexane 20 mL를 넣어 혼합한 후 물층을 회수하여 이를 분석하였다. 지방 및 단백질 저거를 위하여 지방제거 실험과 동일하게 추출하고 이에 5% TCA (trichloroacetic acid) 또는 2 M TFA (trifluroacetic acid)를 1:1의 비율로 처리한 후 원심분리하고 이를 분석하였다. 추출 온도에 따른 전처리 시험은 PGA가 첨가된 시료 10 g을 250-mL 삼각플라스크에 취하고 증류수 90 mL를 넣어 혼합한 후 20, 40, 60°C의 incubator에서 150 rpm으로 3시간 추출하였으며, 이를 8,260 × g으로 30분간 원심분리하고 이를 분석하였다.

분석법 검증

본 연구에서 분석법 검증을 위하여 ICH 가이드라인[11]에 따라 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정밀도, 정확도를 산출하였다. 표준용액을 가지고 시험방법에 따라 각 3회 반복 실험하여 검량선을 작성하여 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 확인하였다. 범위는 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질 양(또는 농도)의 하한 및 상한 값 사이의 영역을 말한다. 표준용액 조제 이후 3일간 검량선을 작성하여 검량

선의 변동 추이를 확인하였다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 구하기 위해 저농도를 선택하여 검량선을 작성하고, 중간농도를 7회 분석하여 얻은 표준편차(SD, σ)를 사용하여, $3.3 \times \sigma/S$ (σ: 반응의 표준편차, *S*: 검량선의 기울기)를 검출한계(LOD)로, $10 \times \sigma/S$를 정량한계(LOQ)로 산출하였다. 정확성을 위하여 라면시료에 알긴산프로필렌글리콜 표준품을 3가지 농도(300, 700, 1,500 mg/kg)로 첨가하여 3회 반복하여 분석하였다. 정밀성을 확인하기 위한 intra-day 정밀도는 1일간 반복하여 얻은 변동계수(coefficient of variation, CV, %)로 표현하였다.

표준용액

PGA의 검량선 작성을 위한 표준용액제조는 PGA가 첨가되지 않은 음성 시료 분말에 PGA 표준품을 3,000, 5,000, 7,000, 10,000, 15,000 mg/kg이 되도록 첨가하고, 이 중 10 g을 정량하여 시료 전처리 방법과 동일하게 처리 한 후 100 mL로 정용하여 이 용액을 10배 희석된 표준용액으로 사용하였다. 이때 작성된 검량선 표준용액의 범위는 300, 500, 700, 1,000, 1,500 mg/kg이었다.

시료 전처리

국내에서 유통하는 식품을 절임식품, 발효음료류, 과자류, 드레싱류, 과채가공품, 치즈, 케찹, 주류, 면류, 밀가루류 등으로 구분하여 134품목의 시료를 구입하여 알긴산프로필렌글리콜의 함량을 확인하였다. 분쇄한 시료 10 g을 250-mL 삼각플라스크에 넣고 D.W. 90 mL를 혼합한 후 20°C 진탕항온기(VS-8480, Vision scientific Co., LTD, Bucheon, Korea)에서 150 rpm으로 3시간 추출하였다. 이를 전량 원심분리용 셀에 옮겨 8,260 × g에서 30분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 100 mL 정용플라스크에 옮기고 추출용매로 정용하였다. 이 중 일부를 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

통계처리

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

Results and Discussion

표준품 용해 용매선정

알긴산프로필렌글리콜(propylene glycol alginate, PGA)은 백~황색을 띠는 백색의 약간 굵은 또는 미세한 분말로서 냄새가 없으며 거의 맛이 없고, 알코올, 클로로포름, 벤젠, 석유에테르에 녹지 않고 냉수 및 온수에서 점조한 콜로이드 용액이 된다[5]. 본 연구에서는 식품에 사용되는 알긴산프로필렌글리콜(함량 100%)을 표준품으로서 사용하여 이를 용해하고자 용매선정 실험을 실시하였다(data not shown). 물, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 질산나트륨($NaNO_3$), 황산나트륨(Na_2SO_4), 인산나트륨(Na_2HPO_4)에 대하여 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 M 농도별로 제조하고 알긴산프로필렌글리콜 1%를 첨가하여 용해정도를 확인하였다. 알긴산프로필렌글리콜은 물에서 완전히 용해되었으며, 유기용매에서 농도에 관계없이 용해되지 않고 침전되었다. 확인한 3가지 buffer 용액 중 인산나트륨 buffer에서 농도에 상관없이 알긴산프로필렌글리콜이 용해되는 것을 확인하였으며, 질산나트륨 buffer의 경우 농도에 상관없이 알긴산프로필렌글리콜이 투명한 콜로이드 형태로 용해되어 적합하지 않았으며, 황산나트륨 buffer의 경우 0.1 M 이상의 농도에서 용해되었다. 따라서 알긴산프로필렌글리콜 용해 용매로써 물 또는 인산나트륨 buffer가 적합할 것으로 판단하였다.

HPLC를 이용한 알긴산프로필렌글리콜 분석조건 확립

식품에 첨가하는 알긴산프로필렌글리콜의 분석을 위하여 size-exclusion column을 활용한 HPLC 분석법을 확립하고자 3 종류의 column 및 detector를 비교하였다(Fig. 2). Column은 GF-7M HQ (9 μm, 7.5 mm i.d. × 300 mm), OHpak SB-804HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm), OHpak SB-806HQ (8 μm, 8.0 mm i.d. × 300 mm)를 사용하였으며, detector는 RI, UV/VIS, ELSD를 사용하였다. 각 column 및 detector에 대하여 표준품의 농도 312.5, 625, 1,250, 2,500 ppm으로 분석하였으며, RI와 UV/VIS detector의 경우 이동상으로 50 mM sodium phosphate buffer를 사용하였고, ELSD의 경우 HPLC grade water로 isocratic 조건과 water와 30% methanol을 사용하여 gradient 조건으로 비교하였다.

Column의 경우 SB-804 HQ가 3 종류의 detector에 대하여 피크모양이 모두 적합하지 않았으며, SB-806 HQ는 RI와 UV/VIS detector에 대해 피크모양이나 직선성에 따라 적합성을 나타내었다. GF-7M HQ column의 경우 3 종류의 detector에 대하여 모두 피크모양 및 직선성을 기준으로 적합성을 나타내었다. 따라서 PGA 분석을 위한 column으로 detector에 따라 SB-806 HQ와 GF-7M HQ가 적합할 것으로 판단하였다.

Detector의 경우 GF-7M HQ로 분석할 때 RI, UV/VIS, ELSD 모두 직선성을 나타내었으나, RI와 UV/VIS detector의 경우 용매피크로 추정되는 피크가 검출되었으며, ELSD detector의 경우 피크 높이나 모양이 우수하여 PGA 분석을 위한 detector로 ELSD를 선정하였다. ELSD detector로 분석할 때 이동상으로 water와 30% methanol을 gradient로 분석하여 시료의 분리능을 개선하고자 하였으나, 표준품의 피크모양이 적합하지 않은 결과를 나타내었다. 따라서 ELSD detector 분석을 위한 이동상으로 water를 단일

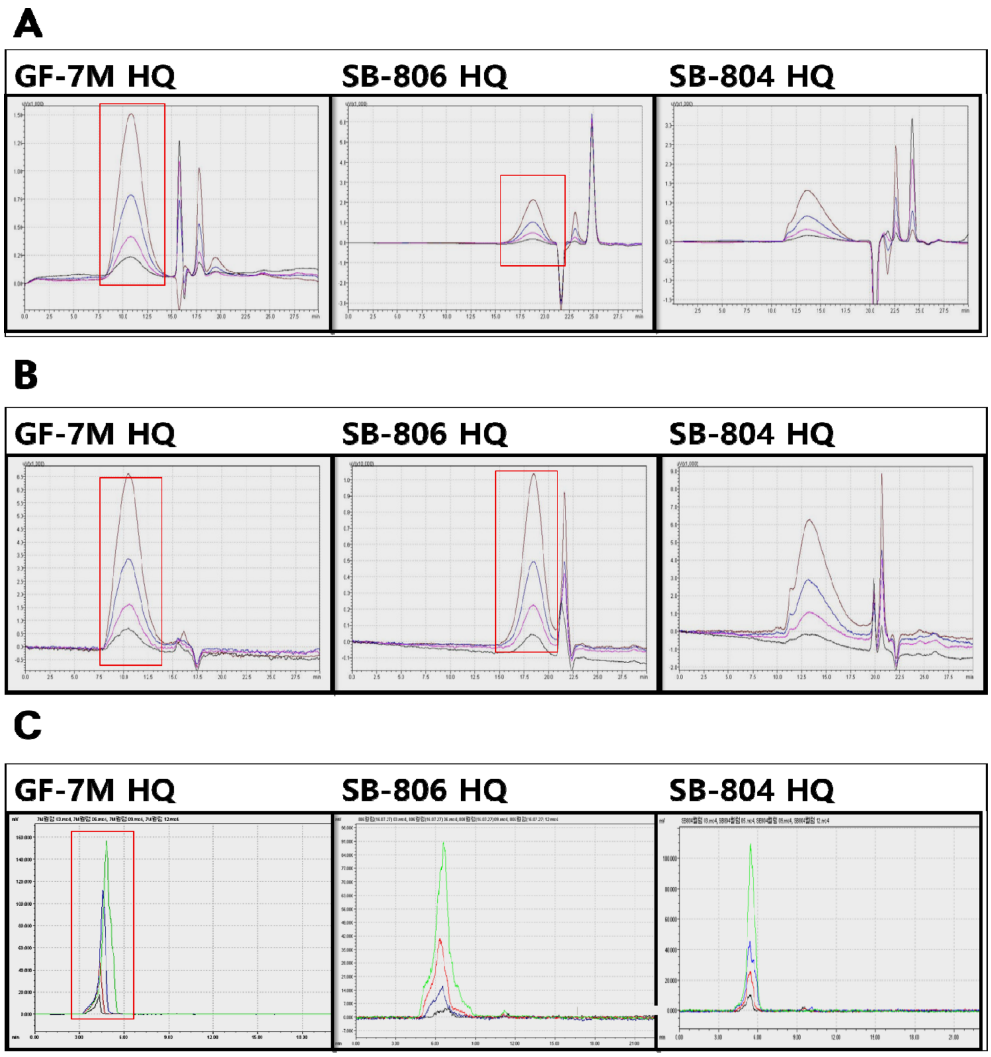

Fig. 2. Chromatogram of propylene glycol alginate according to column and detector. A, RI detector; B, UV/VIS detector; C, ELSD.

로 사용하는 것이 적합할 것으로 판단하였다. Ci 등[13]의 연구에서 alginate를 PDA와 RI의 조건에서 분석하였는데, PDA 조건의 경우 본 연구와 동일하게 210 nm에서 분석하였다. 또한 피크모양은 본 연구와 유사하게 나타났으나 피크 넓이가 alginate의 경우 더 넓게 나타났는데, 이는 본 연구에서 사용한 PGA 표준품의 분자량 범위 분포보다 넓은 범위의 alginate를 사용했기 때문으로 생각된다.

표준품 피크 이외 다른 피크가 검출되는 SB-806 HQ column을 활용하여 동일 column 두 개를 연결하여 분석하였을 경우 분리능이 개선되는지 여부를 확인하고자 표준품 농도에 따라 RI와 UV/VIS detector를 이용하여 비교하였다(data not shown). 동일 column 두 개를 연결하여 PGA를 분석한 결과 분리능이나 피크 모양이 단일 column으로 분석한 경우와 큰 차이를 나타내지 않았으며, column이 길어져 분석시간 역시 길어지는 문제점이 있었다. 따라서 PGA 분석을 위해 단일 column을 사용하는 것이 적합할 것으로 판단하였다. Size-exclusion chromatography를 통하여 유청단백질을 분리한 연구[14]에서 동일한 column 3개를 연결하여 분리한 결과가 있으나, 분석시간이 70 min으로 본 연구와 유사하게 길게 나타났다.

PGA 분석을 위한 HPLC 조건 중 이동상 유속을 비교하기 위하여 위에서 선정된 GF-7M HQ column에 대하여 ELSD로 분석하여 비교하였다(data not shown). 이동상의 유속을 0.6 mL/min과 0.8 mL/min에 대하여 비교한 결과, 0.6 mL/min보다 0.8 mL/min의 조건에서 피크모양이 더 적합한 것을 확인하였다. 따라서 PGA 분석하기 위한 HPLC 방법은 GF-7M HQ (9 μm, 7.5 mm I.D. × 300 mm) column을 사용하여 water를 0.8 mL/min의 유속으로 하는 이동상 조건에서 ELSD로 분석하는 것이 적합할 것으로 판단되었다.

시료 전처리 방법

식품에 함유된 지방 및 단백질 성분의 제거가 PGA 피

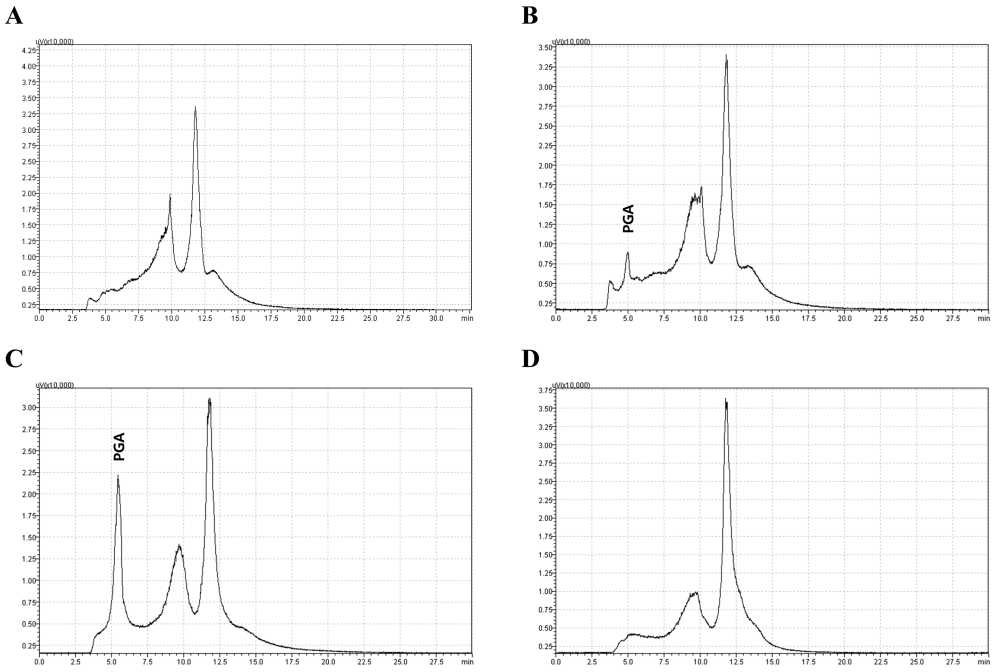

Fig. 3. Specificity of propylene glycol alginate by SEC-ELSD method. (A) Chromatogram of sample blank (undetected sample). (B) Chromatogram of standard PGA (100 mg/kg). (C) Chromatogram of standard PGA spiked sample (ramen). (D) Chromatogram of sample (ramen).

크의 분리능에 영향을 주는지 확인하고자 시료에 *n*-hexane, trichloroacetic acid (TCA) 및 trifluoroacetic acid (TFA) 처리를 하여 GF-7M HQ column에 물을 이동상으로 하여 ELSD로 분석하였다(data not shown). 시료의 지방제거를 위해 *n*-hexane 처리 후 분석해 본 결과 시료 및 시료에 PGA를 spike한 경우 모두 *n*-hexane 처리에 따른 피크의 변화가 나타나지 않았다. 따라서 시료에 있는 PGA와 유사한 시간에 나타나는 피크의 경우 지방성분이 아닌 것으로 판단되며, 분석을 위한 전처리로 적합하지 않는 것으로 생각되었다.

시료의 지방 및 단백질 성분의 제거를 위해 *n*-hexane처리 후 TCA 또는 TFA를 처리한 결과 시료뿐만 아니라 PGA를 spike한 시료에서도 PGA 피크가 검출되지 않았다. 또한 처리 전보다 저분자 물질이 검출되는 시간대의 피크가 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 TCA나 TFA 처리에 의해 시료의 고분자 물질이 분해되는 것을 알 수 있었으며, PGA 역시 TCA나 TFA 처리에 의해 영향이 있음을 확인하였다. 또한 이들 처리는 시료 전처리 방법으로 적합하지 않은 것으로 확인하였다.

식품 시료 중 PGA의 추출을 위해 분쇄한 라면에 PGA를 1%(w/w) 첨가한 후 온도에 따른 추출 실험을 진행하였다(data not shown). PGA는 60°C까지는 비교적 안정하나 끓이면 급격히 점도가 저하되는 성질이 있어, 추출 온도를 20, 40, 60°C에서 진행하였으며, 150 rpm에서 3시간 동안 incubation 추출하여 원심분리한 후 HPLC 분석을 하였다. 추출온도에 따른 실험 결과 20°C에서 3시간 추출한 경우 PGA 피크와 시료의 분리도가 40 및 60°C에서 추출한 경우 보다 좋게 나타났으며, 추출온도가 높을수록 분리도가 나빠지는 것을 확인하였다. 이는 시료내의 성분들이 추출 온도에 따라 영향을 나타내는 것으로 추측된다. 따라서 식품 중 PGA 성분을 추출하는 조건으로 20°C, 150 rpm에서 3시간 추출하는 것이 적합할 것으로 판단되었다.

분석법 검증

PGA의 경우 다양한 식품에 사용이 가능하며, 식품의 matrix에 따라 표준품과 비슷한 시간대에 base line이 뜨는 현상이 발상할 수 있다. 따라서 식품 중 PGA 분석의 경우 대상 식품과 유사한 조성으로 이루어진 음성(blank) 시료를 선택하여 그 시료에 표준품을 혼합하고 시료 전처리 방법과 동일하게 추출하여 검량선을 작성하였다. 또한 식품 시료에 따라 base line이 안정적으로 유지되는 경우는 표준품을 검량선 농도에 맞게 D.W.에 용해하여 검량선을 작성하여 이를 시료정량 시 사용하였다.

식품 중 PGA 분석을 위해 확립된 전처리 방법과 HPLC 분석방법에 대하여 시료 blank와 PGA 첨가시료에 대하여 비교해본 결과 시료 blank에서 PGA와 유사한 시간의 피크가 검출되지 않았으며, PGA 첨가에 따라 시료 blank의 영향 없이 PGA 피크가 검출되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

PGA의 검량선 작성을 위한 표준용액 제조는 시료 분말에 PGA 표준품을 3,000, 5,000, 7,000, 10,000, 15,000 mg/

Table 1. Linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) of PGA analysis by SEC-ELSD method

Compound	Concentration range (mg/kg)	R^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Propylene glycol alginate	300~1,500	0.9873	171.43	519.50

kg이 되도록 첨가하고 이 중 10 g을 취하여 시료 전처리 방법과 동일하게 처리 한 후 100 mL로 정용하여 이 용액을 10배 희석된 표준용액으로 사용하였다.

검량선 작성에 사용한 표준용액의 범위는 300, 500, 700, 1,000, 1,500 mg/kg이었으며, 검량선의 범위는 PGA의 식품 중 사용기준인 1% 이하[6]에 적합할 것으로 생각되었다. PGA 표준용액으로 작성된 검량선의 상관계수(R^2)값은 0.9873으로 우수한 직선성을 나타내었다(Table 1).

Size-exclusion column을 이용한 HPLC 분석법을 통하여 PGA의 검출한계와 정량한계를 측정한 결과 검출한계(LOD)는 171.43 mg/kg을 나타내었으며, 정량한계(LOQ)는 519.50 mg/kg을 나타내었다(Table 1). 해조류의 polysaccharide를 분석한 연구[15]에서 alginate의 LOD와 LOQ는 각각 0.07 mg/mL과 0.16 mg/mL으로 본 연구의 결과보다 낮게 확인되었는데, 이는 분석대상 물질의 분자량 범위, 검출기 및 사용 column 등 분석조건의 차이에서 비롯된 것이라 생각된다.

정확도를 확인하기 위하여 동일조건하에서 같은 검체를 하루에 3번 반복 실험하는 일내 분석(intra-day assay) 및 3일동안 같은 검체를 반복 실험하는 일간 분석(inter-day assay)을 시행하였다(Table 2). Size-exclusion column을 이용한 HPLC 분석을 통해 300, 700, 1,500 mg/kg의 농도로 3회 반복하여 분석한 결과 intra-day의 경우 86.1~110.4%의 회수율을 나타내었으며, inter-day의 경우 98.1~105.8%의 회수율을 나타내어 일내와 일간 분석에서 우수한 결과를 나타내었다. 정밀도를 분석한 결과 intra-day의 경우 4.1~13.5%의 CV를 나타내었으며, inter-day의 경우 4.5~10.7%의 CV를 나타내었다. Gomez-Ordonez 등[15]은 alginate의 회수율 및 정밀도는 각각 101.1 ± 0.4%와 1.1%로 본 연구의 결과보다 낮게 확인되었는데, 이는 alginate 표준품을 대상으로 분석한 것이며, 본 연구에서는 PGA를 matrix가 복잡한 라면에 spike하여 분석한 것으로 분석방법의 차이에서 비롯된 것이라 판단된다.

식품 중 알긴산프로필렌글리콜 함량 분석

확립된 HPLC-SEC 분석법을 이용하여 국내 유통 식품 134 품목을 대상으로 알긴산프로필렌글리콜 함량을 조사하였다(Table 3). 식품 중 알긴산프로필렌글리콜이 검출된

Table 2. Accuracy and precision of propylene glycol alginate at three different concentration (n = 3) by SEC-ELSD method

Analytes	Concentration (mg/kg)	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (%)	CV[1] (%)	Accuracy (%)	CV (%)
Propylene glycol alginate	300	110.4	4.1	105.8	6.4
	700	86.1	13.5	99.2	4.5
	1,500	96.5	5.0	98.1	10.7

[1]CV, coefficient of variation.

Table 3. Monitoring of propylene glycol alginate by food types

Samples	No. of samples	No. of detected samples	Propylene glycol alginate contents (%)[1]	
			Range	Average
Pickled food	10	1	ND[2]~0.31 ± 0.01	0.03 ± 0.09
Fermented beverage	15	0	ND	ND
Confectionery	15	3	ND~0.27 ± 0.01	0.05 ± 0.11
Dressings	15	2	ND~0.39 ± 0.01	0.04 ± 0.12
Fruit and vegetables products	14	4	ND~0.33 ± 0.01	0.08 ± 0.13
Cheese	15	6	ND~0.31 ± 0.01	0.10 ± 0.13
Ketchup	10	6	ND~0.28 ± 0.00	0.17 ± 0.14
Alcoholic beverages	10	0	ND	ND
Noodles	30	15	ND~0.24	0.09 ± 0.12
Total	134	37		

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

시료는 40품목이었으며, 식품유형별로 분류하면 절임식품 1품목(검체수 10품목), 과자류 5품목(검체수 15품목), 드레싱류 2품목(검체수 15품목), 과・채가공품 3품목(검체수 14품목), 치즈 8품목(검체수15품목), 토마토케찹 7품목(검체수 10품목), 면류 14품목(검체수 30품목)으로 확인되었다. 발효음료류와 주류의 경우 각각 15품목, 10품목의 검체에서 불검출로 확인되었다.

본 연구에서 분석한 식품 중 알긴산프로필렌글리콜은 절임식품(불검출-0.31%), 과자류(불검출-0.27%), 드레싱류(불검출-0.39%), 과・채가공품(불검출-0.33%), 치즈(불검출-0.22%), 토마토케찹(불검출-0.28%), 면류(불검출-0.24%)에서 확인되었으며, 분석대상 시료 모두 식품첨가물공전[6]에서 제시한 알긴산프로필렌글리콜의 사용기준인 1% 이내로 확인되었다.

Acknowledgement

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

국문요약

HPLC-size-exclusion chromatography에 의해 가공식품에서 알긴산프로필렌글리콜의 함량을 분석하는 방법이 개발되었다. 알긴산프로필렌글리콜을 분석하기 위해 GF-7M HQ column과 LT-ELSD detector가 선정되었다. 알긴산프로필렌글리콜 분석을 위한 전처리 조건으로는 20°C에서 150 rpm으로 3시간 동안 추출하는 방법이 선정되었다. 알긴산프로필렌글리콜을 5 농도(300, 500, 700, 1,000, and 1,500 mg/kg) 범위에서 검량선을 작성한 결과 직선성(R^2)은 0.9873으로 측정되었다. HPLC system에 의한 알긴산프로필렌글리콜 분석시 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 각각 171.43 mg/kg 및 519.50 mg/kg이었다. Size-exclusion chromatography에 의해 얻은 회수율 및 변동 계수(coefficient of variation)는 각각 86.1~110.4% 및 4.1~13.5% 이었다. 본 연구에서 개발된 HPLC-size-exclusion chromatography system을 적용하여 134 품목의 가공식품에서 알긴산프로필렌글리콜 함량을 분석하였다. 이 결과들은 이 방법이 가공식품에서 알긴산프로필렌글리콜 함량을 분석하는데 적용할 수 있는 방법이라는 것을 나타낸다.

References

1. Jeong E.J., Lee S.H., Kim B.T., Lee G.Y., Yun S.S., Kim H.S., Kim Y.S.: An analysis method for determining residual hexane in health functional food products using static headspace gas chromatography. *Food Sci. Biotechnol*. **26**, 363-368 (2017).
2. Kim M.Y., Yun M.S., Lee J.H., Lee S.K.: Effects of HPMC, MC, and sodium alginate on rheological properties of flour dough. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**, 474-478 (2008).
3. Chee S.K.: New food additives theory and experiment. The Food Journal, Seoul, Korea. pp. 263-264 (2000).
4. Sharratt M., Dearn P.: An autoradiographic study of popylene glycol alginate in the mouse. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **10**, 35-40 (1972).
5. 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. pp. 246 (2012).
6. Cheong K.W., Mirhosseini H., Hamid N.S.A., Osman A., Basri M., Tan C.P.: Effects of propylene glycol alginate and sucrose esters on the physicochemical properties of modified starch-stabilized beverage emulsions. *Molecules*. **19**, 8691-8706 (2014).
7. Chen Y.C., Chen C.C., Hsieh J.F.: Propylene glycol alginate-induced coacervation of milk proteins: A proteomics approach. *Food Hydrocolloid.* **53**, 233-238 (2016).
8. Anderson D.M.W., Brydon W.G., Eastwood M.A., Sedgwick D.M.: Dietary effects of propylene glycol alginate in humans. *Food Additiv. Contam*. **8**, 225-236 (1991).
9. KFDA. Food Additives Code. Korea Food and Drug Administration. Cheongju, Korea pp. 1392 (2016).
10. Wu J., Zhao X., Ren L., Xue Y., Li C., Yu G., Guan H.: Determination of M/G ratio of propylene glycol alginate sodium sulfate by HPLC with pre-column derivatization. *Carbohyr. Polym.* **104**, 23-28 (2014).
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. Ci S.X., Huynh T.H., Louie L.W., Yang A., Beals B.J., Ron N., Tsang W.G., Soon-Shiong P., Desai N.P.: Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatog. A*. **864**, 199-210 (1999).
14. Kang D.Y., Moon J.M., Lee S.H.: Comparison of size-exclusion chromatography and flow field-flow fractionation for separation of whey proteins. *Bull. Korean Chem. Soc.* **32**, 1315-1320 (2011).
15. 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).