

Research Note

식품 중 아스코르빈산 유래 산화방지제의 HPLC 분석법 검증 및 개선

정민규 · 박찬익 · 박민희 · 여주동 · 박성관¹ · 김소희¹ · 신태선² · 백형희³ · 이재환*
서울과학기술대학교 식품공학과, ¹식품의약품안전평가원, ²전남대학교, ³단국대학교 식품공학과

Validation of HPLC Methods for Ascorbic Acid and Its Derivatives in Foods

Min Kyu Jeong, Chan Uk Park, Min Hee Park, JuDong Yeo, SeungKwan Park¹,
SoHee Kim¹, Tae-Sun Shin², Hyung Hee Baek³, and JaeHwan Lee*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

¹National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

²Chonnam National University, Yeosu

³Department of Food Engineering, Dankook University

Abstract

Analytical methods for food antioxidants including ascorbic acid, erythorbic acid, ascorbyl palmitate (AP), and ascorbyl stearate (AS), were validated using high performance liquid chromatography. Validation parameters such as linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and recovery were tested using lard and cider as food model systems. Linearity of ascorbic acid and erythorbic acid were both higher than ($R^2 > 0.99$), LOD of these compounds were 0.46 and 0.48 $\mu\text{g/mL}$, respectively and LOQ were 1.39 and 1.45 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The recovery rates of these compounds were 86.35-94.78% and 84.76-95.02%, respectively. However, the concentration of AP and AS decreased in methanol stock solution. Four other solvents including ethanol, acetonitrile, mixture of methanol and acetonitrile, and mixture of ethanol and acetonitrile were tested to increase the stability of AP and AS under room temperature and refrigerated temperature. Ethanol provided better stability of AP and AS under both room and refrigerated temperature. This study can help to accurately analyze the content of ascorbic acid and its derivatives in processed foods.

Key words: Validation, ascorbic acid, ascorbic acid derivatives, HPLC analysis

서 론

식품제조기술 및 가공기술 발달, 식생활 변화에 따라 다양한 가공식품이 개발되고 있으며 가공식품의 맛, 향, 외형적 가치, 식욕증진, 영양보존 등의 이유로 식품첨가물이 사용되고 있다. 식품첨가물은 식품을 가공, 유통 중 발생 가능한 식품 성분 변화 방지, 가치 향상 등의 목적으로 사용되고 있으나 그 유익성에도 불구하고 오용 및 남용으로 인한 위해 가능성이 있어 각 나라마다 식품에 사용되는 식품첨가물의 종류 및 함량을 제한하고 있다(KFDA, 2009).

대한민국에서 허용된 식품첨가물의 총 품목 수에 비해

일부 첨가물만이 식품공전 분석법에 고시되어 있다. 이 외의 품목 중 산화방지제, 착색제, 표백제, 고결방지제, 허용외 첨가물 등의 분석법은 '식품 중 식품첨가물 분석법'에 기재되어 있다(KFDA, 2007).

산화방지제는 지방을 함유한 다양한 가공식품에 첨가되는 식품첨가물로서 지방산화의 효율적 조절을 첨가 목적으로 한다. 에리쓰르빈산(erythorbic acid, isoAA)은 아스코르빈산(ascorbic acid, AA)의 이성질체이고, 아스코르빌팔미테이트(ascorbyl palmitate, AP)와 아스코르빌스테아레이트(ascorbyl stearate, AS)는 각각 AA와 포화지방산인 palmitic acid, stearic acid의 ester 형태이다. 식품첨가물공전(KFDA, 2009)에 의하면 AP와 AS사용기준은 일부 식용유지류에서는 0.5 g/kg 이하, 기타식품에서는 1.0 g/kg이하로 정해져 있으며 병용 시에는 사용량의 합계로 결정된다. AP는 산화방지 이외의 용도로 유향액 및 encapsulation 제조를 위한 계면활성제로 활용되어 왔다(Palma et al., 2002; Špiclin et al., 2003; Teeranachaideekul et al., 2007).

Corresponding author: JaeHwan Lee, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology, 172 Gongneung-2 dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
Tel: +82-2-970-6739; Fax: +82-2-976-6460
E-mail: jhlee@snut.ac.kr

Received October 20, 2010; revised December 24, 2010; accepted December 24, 2010

Table 1. Operating conditions for determination of ascorbic acid (AA), erythorbic acid (isoAA), ascorbyl palmitate (AP), and ascorbyl stearate (AS) by HPLC-UV

	Ascorbic acid, Erythorbic acid	Ascorbyl palmitate, Ascorbyl stearate
Column	Kromasil 100-5NH ₂ (4.6 mm ID × 250 mm, 5 μm)	Symmetry C ₁₈ (3.6 mm × 150 mm, 4 μm)
Wavelength	265 nm	245 nm
Flow rate	1.0 mL/min	1.2 mL/min
Injection volume	20 μL	20 μL
Column temperature	40°C	40°C
Mobile phase	Acetonitrile 70% : 25 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ buffer(pH 6.2) 30%	A; Acetonitrile 70% B; 0.05M KH ₂ PO ₄ buffer (pH2.2) 30% (B solvent in water bath at 50°C)

이들 산화방지제의 분석은 주로 역상 고속액체크로마토그래피(reverse phase-high liquid performance chromatography, RP-HPLC)-자외선검출기(an ultraviolet detector)를 이용하여 분석되며, AA와 isoAA는 265 nm(Fontannaz et al., 2006)와 220 nm, 240 nm(Sottofattori et al., 1998)등의 파장에서, AP는 245 nm(Špiclin et al. 2003) 파장에서 검출된 바 있다. 또한 '식품 중 식품첨가물 분석법'에서도 이들 산화방지제의 분석법에 대해 기재가 되어 있다.

가공식품의 식품첨가물을 분석하여 현행 식품첨가물 공전 또는 식품공전의 규격 기준에 대한 적합여부를 판정하는 것은 소비자의 건강과 밀접한 연관이 있다. 식품 첨가물의 안전한 관리 및 소비자의 건강을 위해 '식품 중 식품첨가물 분석법'에 기재된 항산화물질 분석법의 검증 및 개선을 통한 분석법 확립 및 공정 시험법으로의 도입 여부를 결정 하는 것이 필요하다.

본 연구의 목적은 산화방지제인 AA, isoAA, AP와 AS의 '식품 중 식품첨가물 분석법'에 기재된 HPLC에 의한 분석법을 검증하고 AP와 AS의 경우, 사용용매에 따른 산화방지제의 안정성을 확인하는 데 있다.

재료 및 방법

실험재료

IsoAA와 AP는 Sigma-Aldrich(St. Louis, Mo., U.S.A)에서 구입하였고, AA와 AS 표준물질은 각각 KANTO Chemical (Tokyo, Japan)사와 TCI(Tokyo, Japan)사 제품을 사용하였다. 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 에탄올은 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)사의 HPLC급 제품을 사용하였으며, 인산암모늄과 meta-phosphoric acid는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하였다.

아스코르빈산 및 에리쓰르빈산 분석

시료제조 및 회수법

AA와 isoAA를 각각 5.0 mg씩 2% meta-phosphoric acid

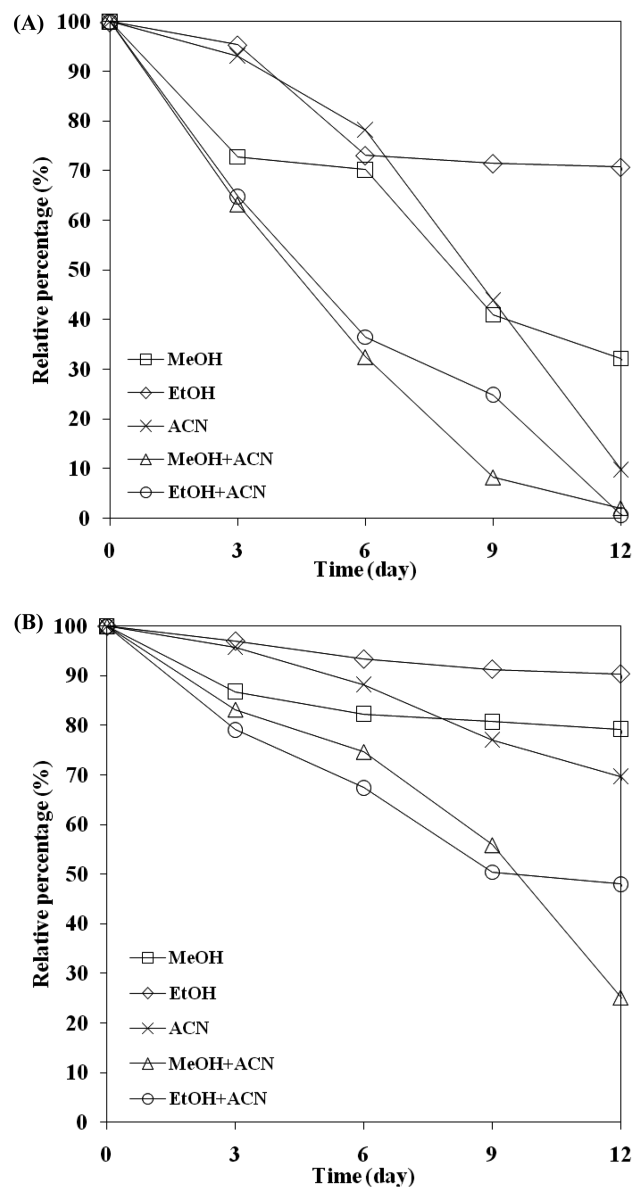


Fig. 1. HPLC chromatograms of ascorbic acid and erythorbic acid (A) and ascorbyl palmitate and ascorbyl stearate (B).

용액 50 mL에 용해시키고 멤브레인 필터로 여과하여 표준 용액을 제조하였다. 표준용액을 2% *meta*-phosphoric acid 용액에 희석하여 0, 2, 5, 10, 20 µg/mL의 농도로 제조하였다. 식품에서 회수율 측정하기 위해 돼지기름(lard)과 사이다를 대표적인 지용성 및 수용성 모델시스템으로 선정하여 사용하였다. 시료에 AA와 isoAA의 농도가 각각 0, 12.5, 25.0, 50.0 µg/mL이 되도록 표준용액을 첨가하였다.

검체로부터 AA와 isoAA를 회수하기 위해 검체와 2% *meta*-phosphoric acid 용액을 섞고 1 시간 후 2% *meta*-phosphoric acid과 메탄올의 비율을 80:20이 되도록 정용하였다. 이 중 일부를 원심분리하여 상등액을 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

HPLC 분석 조건

AA와 isoAA의 HPLC 분석은 Hitachi L-2000 시리즈(Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였으며, 고정상은 Kromasil 100-5 NH₂(250×4.6 mm)을 사용하였다. 구체적인 시료분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

기기검증 및 방법검증

기기검증은 표준용액으로 작성된 표준곡선을 이용하여 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 및 상관계수(R²)를 산출하였다. 방법검증을 위한 회수율 및 재현성은 표준용액이 첨

가된 lard와 사이다를 전처리 한 후, HPLC 분석에 의해 생성된 peak area로부터 AA와 isoAA의 함량을 산출하였다(KFDA, 2008).

아스코르빌파르미테이트 및 아스코르빌스테아레이트 분석 시료제조

AP와 AS를 각각 5.0 mg씩 메탄올 50 mL에 용해시킨 뒤, 멤브레인 필터로 여과하여 표준용액을 제조 후 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL의 농도로 표준곡선을 제조하였다.

HPLC 분석 조건

AP와 AS의 HPLC 분석은 Hitachi L-2000 시리즈(Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였으며 구체적인 시료분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

용매 및 보관온도에 따른 안정성

AP와 AS의 표준물질을 메탄올, 에탄올, ACN, 메탄올:ACN (1:1, v/v), 에탄올:ACN (1:1, v/v)의 용매를 이용하여 100 µg/mL의 농도로 제조하였다. 냉장(4°C) 및 상온 암실조건에서 12 일 동안 보관하면서 3 일 간격으로 시료를 즉시 HPLC 분석하여 용매와 저장온도에 따른 안정성을 측정하였다.

Table 2. Linearity, limit of detection, limit of quantification, and recovery rates of ascorbic acid (AA) and erythorbic acid (isoAA) using HPLC method

	R ²	LOD ¹ (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Recovery (%)	%RSD
Ascorbic acid					
Calibration curve (n=5)	0.999	0.46	1.39		
In lard (n=3)					
12.5 µg/mL				93.3±4.3	4.3
25.0 µg/mL				94.7±2.3	2.3
50.0 µg/mL				92.7±0.7	0.7
In cyder (n=3)					
12.5 µg/mL				88.5±3.5	3.5
25.0 µg/mL				86.3±1.3	1.5
50.0 µg/mL				88.3±2.9	3.3
Erythorbic acid					
Calibration curve (n=5)	0.999	0.48	1.45		
In lard (n=3)					
12.5 µg/mL				95.0±5.3	5.6
25.0 µg/mL				93.2±2.6	2.8
50.0 µg/mL				97.6±0.8	0.9
In lard (n=3)					
12.5 µg/mL				91.3±3.6	4.0
25.0 µg/mL				84.8±1.8	2.1
50.0 µg/mL				84.7±3.2	3.8

¹LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification, %RSD: relative standard deviation

통계처리

측정된 항산화제의 결과는 평균값±표준편차로 표시하였고 SPSS program(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석 후 유의차가 있는 경우에는 다중비교법인 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

아스코르빈산 및 에리소르빈산 분석

AA 및 isoAA의 HPLC chromatograms은 Fig. 1(A)에 나타내었고 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 회수율 등의 분석법 밸리데이션 지표는 Table 2에 나타내었다. 현재의 분석 조건에서 AA 및 isoAA은 각각 7.87, 6.98분에 검출되었다. AA 및 isoAA의 검출한계는 각각 0.46, 0.48 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며 상관계수는 모두 0.999이상을 보였다. 회수율은 사이다의 경우 각각 86.3-88.5%, 84.7-91.3%이고, lard의 경우 각각 92.7-94.7%, 87.6-91.3%로 수용성 극성 액상시료보다 비극성 고상시료에서 상대적으로 높은 회수율을 나타내었다(Table 2).

Fontannaz et al.(2006)는 다양한 가공식품군에서 AA 및 isoAA을 HPLC 자외선검출기를 이용하여 265 nm에서 분석하였으며, 검출한계와 회수율은 각각 0.1 mg/100 g, 93-105%로 보고하였다. Sottofattori et al.(1998)은 화장품에서 AA 및 그 유도체를 HPLC-diode-array자외선검출기로 220, 240 nm에서 분석하였다. Odriozola-Serrano et al.(2007)은 과일에서 DL-1,4-dithiotreitol을 환원제로 사용하여 dehydroascorbic acid를 AA로 환원시킴으로써 거의 100%에 가까운 회수율을 보였다.

‘식품 중 식품첨가물 분석법’ 기재된 본 추출 및 분석법을 활용한 경우, 아스코르빈산과 에리소르빈산은 소시지 시료에서 96.4% 회수되었다. 본 연구 결과와 기존보고를 고려 시 ‘식품 중 식품첨가물 분석법’에 기재된 방법은 회수율의 보정을 통해 공식적인 분석법으로 사용가능 할 것으로 사료된다.

아스코르빌파르미테이트 및 아스코르빌스테아레이트 분석

AP 및 AS의 HPLC chromatograms은 Fig. 1(B)에 나타내었다. 본 연구에 사용된 분석조건에서 AP 및 AS는 각각 7.07, 15.01분에 검출되었다. 메탄올 용매의 AP 및 AS는 정치 시간이 증가 할수록 안정성이 감소하였다. 이는 메탄올 용매가 표준시약의 안정성을 저해하여 표준용매로서 사용하기가 적절치 않음을 의미한다.

Perrin & Meyer(2003)은 채종유, 옥수수유 및 지방에서 AP를 포함한 산화방지제를 분석한 결과 97-103%의 회수율을 보고하였으며, 이들의 연구에서도 메탄올에서의 AP 불안정성이 관찰되어 2 시간 만에 20% 감소함을 보고하였

다. 이들은 AP의 불안정성을 감소시키기 위해 산소제거제로 1 mg/mL의 isoAA를, 금속 chelating agent로 1 mg/mL 구연산을 첨가하여 3.6 시간 동안 1.6%만의 AP를 감소시켰다. 본 연구에서는 산화방지제를 첨가하는 대신 메탄올을 대체 가능한 용매 선정에 시도하였고 처리온도의 영향을 확인하였다.

용매 및 보존온도에 따른 아스코르빌파르미테이트 및 아스코르빌스테아레이트 안정성

용매 종류 및 보존온도에 의한 12 일간의 AP변화는 Fig. 2에 나타내었다. AS는 AP와 거의 유사한 변화를 보여 대표적으로 AP 결과만 나타내었다. 상온에서 보관 시 메탄올의 경우 AP 및 AS는 12 일 동안 각각 최초 농도대비 68, 69%가 감소하였으며, 에탄올의 경우 각각 29, 29%, ACN의 경우 각각 90, 91%, 메탄올:ACN 혼합용매의 경우 각각 98, 99%, 에탄올:ACN 혼합용매의 경우 각각 98,

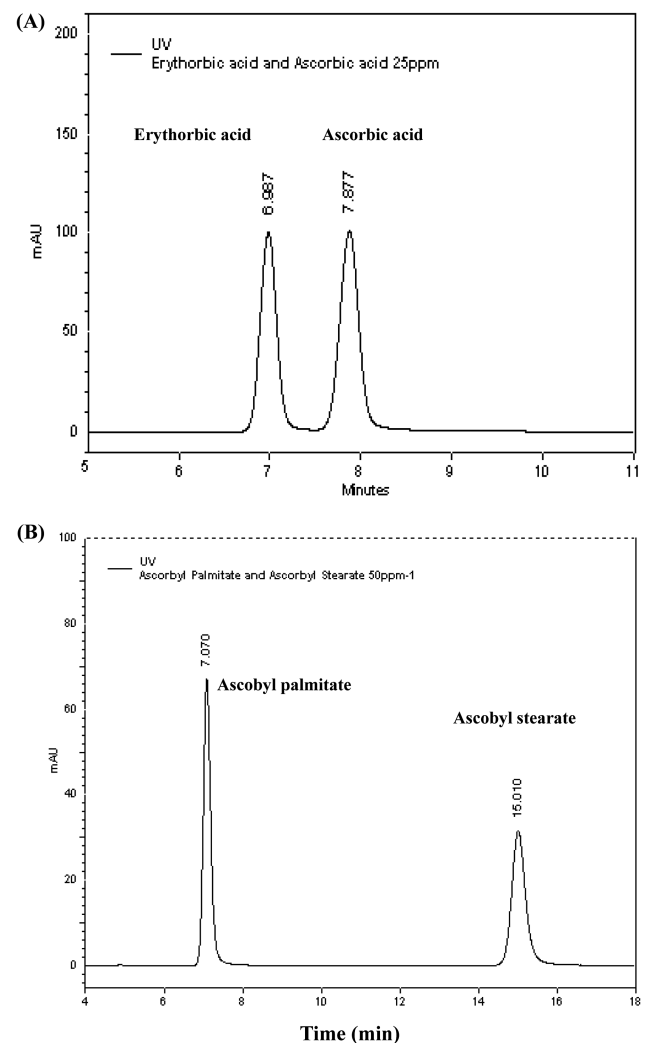


Fig. 2. Relative stability of ascorbyl palmitate in various stock solutions for 12 days at room temperature (A) and at refrigerated temperature (B).

99%가 감소하였다. 저온(4°C) 보관 시 메탄올의 경우 AP 및 AS는 12 일 동안 각각 21, 25%, 에탄올의 경우 각각 10, 9%, ACN의 경우 각각 30, 31%, 메탄올:ACN 혼합용매의 경우 각각 75, 75%, 에탄올:ACN 혼합용매의 경우 각각 52, 52%가 감소하였다. 이는 모든 용매조건에서 상온 보관보다 저온 보관할 경우, AP 및 AS의 안정성이 높았으며, 다섯 가지 용매조건 중 메탄올 보다 에탄올의 안정성이 높게 나타났다. 특히 AP 및 AS는 에탄올에 용해 후 4°C 암실 보관 시 12 일 동안 각각 10, 9%가 감소하여 상대적으로 높은 안정성을 유지하였다.

결론적으로, 산화방지제 중 AA와 isoAA의 경우 상대적으로 짧은 분석시간을 통한 동시분석이 가능하였으며 수용성 극성 액상시료와 비극성 고상시료에서 84% 이상의 회수율을 보였다. 반면에, AP 및 AS의 분석법은 메탄올을 용매로 사용하여 시간경과에 따른 표준용액의 농도가 감소하여 검정법의 수정이 필요하였다. 본 연구결과, 에탄올을 용매로 사용하고 저온저장 시 메탄올, ACN, 및 혼합용매에 비해 AP 및 AS가 유의적으로 높은 안정성을 나타내어 기존표준용매가 불안정하다는 문제점을 개선할 수 있을 것을 기대된다.

요 약

산화방지제인 아스코르빈산(AA), 에리소르빈산(isoAA), 아스코르빌파르미테이트(AP), 아스코르빌스테아레이트(AS)에 대한 ‘식품 중 식품첨가물 분석법’을 검증하고 미비점을 개선하였다. 고속액체크로마토그래피 자외선검출기법을 이용하여 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 상관계수(R²) 등을 측정하였고 돼지기름(lard), 사이다를 이용한 모델식품에서의 회수율과 재현성을 측정하였다. AA와 isoAA의 검출한계는 각각 0.46, 0.48 µg/mL이었으며, 회수율은 각각 86.35-94.78, 84.76-95.02%를 나타내었고 상관계수는 모두 0.999이상을 보였다. AP와 AS의 현 분석법은 메탄올을 용매로 사용하지만 메탄올 용매에서 AP와 AS는 불안정하였

다. 냉장온도에서 에탄올을 용매로 사용 시 다른 용매에 비해 유의적으로 높은 안정성을 나타내어 기존 용매의 불 안정성을 개선할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 식품의약품안전청 용역연구개발(과제번호: 09082영기안087) 사업의 일환으로 시행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Fontannaz P, Kiliç T, Heudi O. 2006. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem.* 94: 626-631.
- KFDA, 2007. Analysis methods for food additives. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- KFDA, 2009. Food additive code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- KFDA, 2008. Guideline of validation methods for medicine analyses. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- Odrozola-Serrano I, Hernandez-Jover T, Martin-Belloso O. 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.* 105: 1151-1158.
- Palma S, Lo Nostro P, Manzo R, Allemanni D. 2002. Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt. *European J. Pharm. Sci.* 16: 37-43.
- Perrin C, Meyer L. 2003. Simultaneous determination of ascorbyl palmitate and nine phenolic antioxidants in vegetable oils and edible fats by HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 115-118.
- Sottofattori E, Anzaldi M, Balbi A, Tonello G. 1998. Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream. *J. Pharmaceut. Biomed.* 18: 213-217.
- Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V. 2001. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int. J. Pharm.* 222: 271-279.
- Teeranachaideekul V, Müller RH, Junyaprasert VB. 2007. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)-Effects of formulation parameters on physicochemical stability. *Int. J. Pharm.* 340: 198-206.