

## 식품 색소 Canthaxanthin의 HPLC 최적 분석법 확인 및 타당성과 측정불확도 평가

서희재<sup>1</sup> · 김경수<sup>2</sup> · 홍미나<sup>2</sup> · 이 찬<sup>2</sup>

<sup>1</sup>선문대학교 식품과학과

<sup>2</sup>중앙대학교 식품공학부

### Validation and Uncertainty Evaluation of an Optimized Analytical Method Using HPLC Applied to Canthaxanthin, a Food Colorant

Hee-Jae Suh<sup>1</sup>, Kyung-Su Kim<sup>2</sup>, Mi-Na Hong<sup>2</sup>, and Chan Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Sun Moon University

<sup>2</sup>School of Food Science & Technology, Chung-Ang University

**ABSTRACT** This study was carried out to develop an optimized analytical method using high-performance liquid chromatography (HPLC) applied to canthaxanthin, which is not yet designated as a food colorant in Korea, as well as to perform validation and uncertainty evaluation of this method. Official methods of AOAC, UK, and Japan with HPLC-UV detection were evaluated for the analysis of canthaxanthin by comparison of linearity, resolution, selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy, precision, recovery, inter-laboratory tests, and uncertainty measurement. The calibration curves showed high linearity with an  $R^2$  value of over 0.999 for canthaxanthin standard solutions in all three official methods. The official method of Japan exhibited the best results in terms of resolution and selectivity, including the lowest LOD and LOQ. The average coefficients of variation were calculated as less than five of three institutes with a precision value less than 1, accuracy near 100%, and recovery ratio between 100±10%. The expanded uncertainty for canthaxanthin was estimated to be 39.5±5.29 mg/kg (95% confidence level,  $k=2$ ), and the uncertainty of measurement was 13.4%. In this study, official methods of canthaxanthin were compared and the validities verified. The results will be further applied to establish an authorized analytical method for canthaxanthin in Korea.

**Key words:** canthaxanthin, food color, HPLC-UVD, uncertainty

## 서 론

Canthaxanthin은 지용성의 카로티노이드계 색소로 일부 다른 카로티노이드계 물질들과 함께 주로  $\beta$ -carotene-4,4'-dione으로 구성되어 있다(1). 자연계에 존재하는 canthaxanthin은 주로 trans 형태이며, 화학식은  $C_{40}H_{52}O_2$ , 분자량은 564.84 g/mol이다.

Canthaxanthin을 식품이나 화장품 등에 사용하기 위해서는 독성에 대한 안전성이 입증되어야 하므로 1974년부터 국제 식품첨가물 전문가 위원회(FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA)를 중심으로 독성 평가가 이루어졌으며(2), 1983년 이후에는 유럽 연합 식품 과학위원회(EU Scientific Committee on Food, SCF)에서도 canthaxanthin에 대한 독성 평가가 이루어졌다(3). WHO

에 의하면 80일 동안 1,000 mg/kg bw/d 농도로 canthaxanthin을 섭취한 생쥐에게 경구 발암 독성에 대한 특이점은 발견되지 않았고, 52주 동안 250 mg/kg bw/d로 canthaxanthin을 섭취한 개에서도 부작용이 발생하지 않았으며, 토끼를 이용한 안구독성 평가 및 쥐의 3세대 생식독성 평가에서도 특이점은 발견되지 않았다고 한다(4). 여러 연구자의 canthaxanthin 독성평가 결과를 토대로 JECFA는 1995년 canthaxanthin 독성에 대한 결론을 내리고, 원숭이와 사람에서 관찰된 망막 결정침전 형성에 기초하여 일일허용 섭취량(Acceptable Daily Intake, ADI)을 0~0.03 mg/kg bw/d로 설정하였다(2). 이에 따라 현재 canthaxanthin은 유럽과 미국에서 음료, 소시지, 수산물, 동물 사료 등에 착색의 용도로 사용되고 있고(E 161 g), 일본에서는 식품에는 사용할 수 없으나 개의 사료에 사용할 수 있도록 허용되어 있다. 또한 자외선(ultra-violet)을 조사한 피부에 6,680 mg/kg bw/d의 canthaxanthin이 발암 예방 효과를 지닌다는 연구 등에 따라(4) 미국에서는 canthaxanthin을 화장품에도 사용할하도록 허용하고 있다(5).

Received 11 October 2015; Accepted 6 January 2016

Corresponding author: Chan Lee, School of Food Science & Technology, Chung-Ang University, Anseong, Gyeonggi 17546, Korea  
E-mail: chanlee@cau.ac.kr, Phone: +82-31-670-3035

현재 우리나라에는 식품, 사료, 화장품 모두에서 canthaxanthin의 사용이 금지되어 있으므로 국내에서는 canthaxanthin의 생산 및 유통이 허용되지 않을 뿐만 아니라, 식품에 이 색소가 사용되었을 때 판별해낼 수 있는 분석법이 확립되어 있지 않다. 우리나라에서 사용이 허용된 착색료는 화학적 합성품 26개 품목, 천연첨가물 24개 품목이므로 (Table 1), 이 50품목의 착색료에 대한 분석방법만 확립되

어 있을 뿐 지정되지 않은 착색료에 대한 분석방법은 확립되어 있지 않다(6). 그러나 우리나라에는 미지정 착색료라 할 지라도 외국에서 허용된 착색료의 경우에는 그 지정현황 및 사용기준을 확인하여 수입식품 중 미지정 착색료의 혼입 가능성을 예측할 필요가 있으므로 외국에서 많이 사용되는 국내 미지정 착색료 canthaxanthin에 대한 분석법 확립은 절실히 요구되고 있다.

**Table 1.** The present status of food colors designated by major countries in line with those by Korea

	Food color	CAS NO.	Korea	Japan	USA	EU	CODEX
1	Copper chlorophyllin	—	○	○	—	○	○
2	Sodium copper chlorophyllin	—	○	○	○	○	○
3	Potassium copper chlorophyllin	—	○	—	—	○	○
4	Riboflavin	83-88-5	○	○	○	○	○
5	Riboflavin 5'-phosphate sodium	Anhydrous:103-40-5	○	○	○	○	○
6	Food red No.102	2611-82-7	○	○	—	○	○
7	Food red No.2	915-67-3	○	○	—	○	○
8	Food red No.2 aluminium lake	12227-62-2	○	○	—	○	○
9	Food red No.3	16423-68-0	○	○	○	○	○
10	Food red No.40	25956-17-6	○	○	○	○	○
11	Food red No.40 aluminium lake	68583-95-9	○	○	○	○	○
12	Food blue No.1	3844-45-9	○	○	○	○	○
13	Food blue No.1 aluminium lake	68921-42-6	○	○	○	○	○
14	Food blue No.2	16521-38-3	○	○	○	○	○
15	Food blue No.2 aluminium lake	16521-38-3	○	○	○	○	○
16	Food yellow No.4	1934-21-0	○	○	○	○	○
17	Food yellow No.4 aluminium lake	12225-21-7	○	○	○	○	○
18	Food yellow No.5	2783-94-0	○	○	○	○	○
19	Food yellow No.5 aluminium lake	15790-07-5	○	○	○	○	○
20	Titanium dioxide	13463-67-7	○	○	○	○	○
21	β-Carotene	7235-40-7	○	○	○	○	○
22	Carmine	1390-65-4	○	—	○	○	○
23	Calcium carbonate	471-34-1	○	○	○	○	○
24	Iron sesquioxide	1309-37-1	○	○	○	○	○
25	Food green No.3	2353-45-9	○	○	○	—	○
26	Food green No.3 aluminium lake	—	○	○	○	—	○
27	β-Apo-8'-carotenal	1107-26-2	○	—	○	○	○
28	Gold leaf	7440-57-5	○	○	—	○	○
29	Beet red	7659-95-2 (betanin)	○	○	○	○	○
30	Curcumin, turmeric oleoresin	458-37-7 (curcumin)	○	○	○	○	○
31	Annatto extract	1393-63-1 (annatto)	○	○	○	○	○
32	Alfalfa extract	127-40-2 (lutein)	○	—	○	○	—
33	Sandalwood red	1397-70-2 (santalin)	○	○	○	—	○
34	Purple sweet potato color	—	○	○	—	○	—
35	Maize morado color	—	○	○	—	○	○
36	Purple yam color	—	○	○	—	○	—
37	Red radish color	—	○	○	—	○	—
38	Red cabbage color	—	○	○	—	○	○
39	Perilla color	—	○	○	—	○	—
40	Gardenia blue	—	○	○	—	—	○
41	Gardenia yellow	42553-65-1 (crocin) 27876-94-4 (crocetin)	○	○	—	—	○
42	Caramel color	8028-89-5 (caramel)	○	○	○	○	○
43	Carotene	—	○	○	○	○	○
44	Cochineal extract	1343-78-8 (carminic acid)	○	○	○	○	○
45	Chlorophyll	1406-65-1	○	○	○	○	○
46	Tannic acid	1401-55-4	○	○	○	—	○
47	Tomato color	502-65-8 (lycopene)	○	○	○	○	○
48	Oleoresin paprika	68917-78-2	○	○	○	○	○
49	Grape juice color	—	○	○	○	○	—
50	Grape skin extract	—	○	○	○	○	○

식품 중 canthaxanthin을 분석하는 방법은 영국(7), AOAC (8), 일본(9), 유럽연합(3) 등에서 보고되었지만, 타당성 검증 및 측정불확도에 관한 보고는 매우 미흡한 형편이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 미지정인 착색료 canthaxanthin의 제 외국 공인 분석법을 검토하여 직선성(linearity), 분리능(resolution), 민감도(selectivity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ) 등을 비교하여 최적 분석법을 확보하고자 하였다. 그리고 확보된 최적 분석법의 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 회수율(recovery), 실험실 간 반복실험(inter-laboratory test), 측정불확도(uncertainty measurement) 산출을 통해 타당성(validation)을 검증하여 수입식품의 안전하고 신속한 관리를 위한 분석법으로 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 시액

Trans-canthaxanthin은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, cis-canthaxanthin은 Santa Cruz Biotechnology(Heidelberg, Germany) 제품을 사용하였다. 트립신(trypsin), 펩신(pepsin), 하이드록시톨루엔부틸(butylated hydroxytoluene, BHT), 트리플루오르아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)은 Sigma-Aldrich Co. 제품이며, HPLC용 메탄올(methanol), n-헥산(n-hexane), 아세토니트릴(acetonitrile), 물(water)은 Burdick & Jackson(Seoul, Korea)에서 공급되었다. 프로필알코올(n-propyl alcohol), 에탄올(ethanol), 무수황산나트륨(sodium sulfate anhydrous)은 Duksan Pure Chemical Co. Ltd.

(Gyeonggi, Korea)에서 구매하였으며, Samchun Chemical (Seoul, Korea)에서 디에틸에테르(diethyl ether)와 디클로로메탄(dichloromethane)을 구입하였다.

Canthaxanthin을 N,N-dimethyl formamide(Sigma-Aldrich Co.)에 용해하여 500 µg/mL 표준용액으로 조제한 후 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/mL 농도로 희석하여 분석에 사용하였다.

### 분석 장비

가공식품 중 canthaxanthin을 분석하기 위해 2개 펌프가 부착된 고속액체크로마토그래피(HPLC, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였고, 자외선검출기(UVD, Agilent)를 사용하여 475 nm, 470 nm, 460 nm, 415 nm의 파장에서 분석하였다. 분석 칼럼으로 Eclipse XDB C<sub>18</sub>(5 µm, 4.6×150 mm, Agilent), ZORBAX Eclipse DB-C18(4.6×150 mm, 5 µm, Agilent), YMC-Pack C30(4.6×250 mm, 5 µm, YMC, Tokyo, Japan), LiChrospher Si 60(4.6×250 mm, 5 µm, Merck, Kenilworth, NJ, USA)을 구입하여 사용하였다(3,7-9).

분석 신뢰성 확보를 위해 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry, Thermo LTQ velos, Accela HPLC)(Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)를 이용하여 canthaxanthin 분석 피크를 재확인하였다.

### HPLC를 이용한 canthaxanthin 분석

가공식품 중 canthaxanthin의 최적 분석법을 확보하기 위하여 AOAC법, 유럽연합, 영국, 일본의 공인분석방법으로 (Table 2) 기기분석 후(3,7-9) 결과를 비교하였다.

**Table 2.** HPLC conditions for analysis of canthaxanthin by various methods

Reference	AOAC <sup>1)</sup>	MLHW <sup>2)</sup>	FSA <sup>3)</sup>	EFSA <sup>4)</sup>
Column	4.6×250 mm, 5 µm	4.6×150 mm, 5 µm	4.6×150 mm, 5 µm	4.6×250 mm, 5 µm
Stationary phase	YMC-Pack C30 (YMC, Tokyo, Japan)	Eclipse XDB-C18 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	ZORBAX Eclipse DB-C18 (Agilent)	LiChrospher Si 60 (Merck, Kenilworth, NJ, USA)
Mobile phase	A; 0.2% vitamin C MTBE <sup>5)</sup> : methanol=1:10 (v/v) B; 100% MTBE Gradient 0~57 min: 100% A (0.9 mL/min) 57~60 min: 100% B (2.0 mL/min) 60~65 min: 100% A (0.9 mL/min)	0.05% TFA : methanol =3:97 (v/v)	acetonitrile : methanol =95:5 (v/v)	n-hexane : acetone =86:14 (v/v)
Column temp.	30°C	40°C	25°C	25°C
Flow rate	0.9 mL/min	1.2 mL/min	1.0 mL/min	1.3 mL/min
Injection vol.	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Wavelength	λ=415 nm	λ=475 nm	λ=470 nm	λ=446 nm
Retention time	17~18 min	about 6 min	about 8 min	low resolution and repeatability
Run time	65 min	30 min	30 min	30 min

<sup>1)</sup>AOAC (8). <sup>2)</sup>MLHW (9). <sup>3)</sup>FSA (7). <sup>4)</sup>EFSA (3).

<sup>5)</sup>Methyl tertiary butyl ether.

**HPLC 분석법 비교 및 최적 분석법 확인**

가공식품 중 canthaxanthin의 최적 분석법을 확인하기 위하여 표준용액을 5, 10, 20, 50, 100, 300 µg/mL의 6 point로 희석한 후 AOAC법, 유럽연합, 영국, 일본의 공인분석방법(3,7-9)에서 제시한 방법에 따라 HPLC 분석을 하여 검량선을 구하고 그 상관계수(R<sup>2</sup>) 값을 통해 직선성을 검토하였다. 또한 위의 공인분석방법으로부터 얻은 HPLC 크로마토그램의 분리능과 민감도를 계산하기 위하여 다음 식을 이용하였다(10).

$$\text{Resolution} = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

- t1: the retention time of the adjacent peak
- t2: the retention time of the peak
- w1: the width of the adjacent peak
- w2: the width of the peak

$$\text{Selectivity} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{(t_2 - t_0)/t_0}{(t_1 - t_0)/t_0} \quad (2)$$

- k1: retention factor of the peak
- k2: retention factor of 2nd peak
- t1: the retention time of the peak
- t2: the retention time of 2nd peak
- t0, t'0: void time

Canthaxanthin 기기분석의 검출한계와 정량한계를 산출하기 위하여 저농도로 제조된 canthaxanthin 표준용액 3 point 12.5, 25, 50 µg/mL의 검량선을 작성하였다. 기울기 값과 중간농도 25 µg/mL를 7회 분석하여 구한 표준편차 값을 이용하여 ICH Harmonised Tripartite Guideline(11)에서 제안한 다음과 같은 계산식을 이용하여 검출한계와 정량한계를 산출하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma / S \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / S$$

σ = standard deviation of the intermediate concentration

S = gradient of standard calibration curve at low concentration

**분석법 확인**

분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC-MS와 LC-MS/MS(liquid chromatograph-mass spectrophotometer, Thermo LTQ velos, Accela HPLC)를 이용하여 Table 3의 분석조건으로 canthaxanthin 피크를 재확인하였다.

**Canthaxanthin 전처리**

AOAC법, 일본과 유럽연합의 공인분석방법(3,8,9)에 따라 균질화된 시료 5 g을 취하여 전처리한 후 각 결과를 비교하였다. AOAC 분석법에서는 시료 5 g을 250 mL 용량플라스크에 칭량 후 BHT 250 mg, 디클로로메탄 120 mL, 에탄

**Table 3.** LC-MS conditions for the determination of canthaxanthin

Instrument	LC-MS (liquid chromatograph-mass spectrophotometer, Thermo LTQ velos, Accela HPLC) (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)
Mobile phase	A : B=30:70 (v/v) A: acetonitrile B: water with 0.1% formic acid (v/v)
Flow rate	300 µL/min
Injection vol.	10 µL
Ionization mode	ESI-LC-MS/MS
Run time	6.6 min

올 100 mL를 첨가하여 암실에서 2시간 반응시킨 다음 디클로로메탄을 가해 250 mL로 맞춘 후 격렬히 진탕하여 칸타잔틴을 추출하였다. 이 과정을 3 반복 진행하여 칸타잔틴이 추출되어 있는 디클로로메탄 층을 모두 모아 진공농축기(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축시킨 후 이동상에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과(Millipore, Milford, MA, USA)한 것을 HPLC 시험용액으로 하였다(8). 일본 후생노동성 분석법에서는 시료 5 g에 아세토니트릴 30 mL와 n-헥산 20 mL를 넣고 소량의 무수황산나트륨을 더해 균질화한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 canthaxanthin을 추출하였다. 3 반복으로 추출된 아세토니트릴 층을 모아 진공농축기(EYELA)로 농축한 후 메탄올에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과(Millipore)한 것을 HPLC 시험용액으로 하였다(9). 유럽연합 방법에서는 시료 5 g에 트립신과 펩신을 각각 50 mg씩 넣고 증류수 80 mL와 25% 암모니아수 1 mL를 첨가해 50°C에서 30분간 초음파 처리하였다. 증류수를 더해 100 mL를 맞춘 후 에탄올 40 mL와 디에틸에테르 60 mL를 넣어 canthaxanthin을 추출하고 진공농축기(EYELA)를 이용하여 농축한 후(50°C 이하) 이동상에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과(Millipore)한 것을 HPLC 시험용액으로 하였다(3). 이때 색소추출 과정은 3 반복으로 진행되었다.

**최적 분석법의 타당성 검증**

AOAC법, 유럽연합, 영국, 일본의 공인분석방법(3,7-9)에서 제시한 방법에 따라 가공식품 중 canthaxanthin을 분석해보고, 각 공인분석방법에 따른 분석 결과로부터 직선성, 분리능, 민감도, LOD, LOQ 등을 비교하여 최적의 canthaxanthin 분석방법을 확보하였다. 그리고 확보된 방법의 정밀성, 정확성, 회수율, 실험실 간 반복측정, 측정불확도 등을 산출하여 타당성을 검증하였다.

정밀성과 정확성은 일간 및 일내 반복실험을 통해 산출되었다. 일간분석을 위해 직선성에 해당하는 검량 농도 6 point(10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/mL)를 지정하여 하루에 1회 분석으로 3일간 측정 후 합산하여 정밀도와 정확도를 산출하였다. 일내분석에서는 검량 농도와는 다른 4 point

(30, 60, 120, 180 µg/mL)를 제조하여 하루에 5회 반복 분석한 결과로 정밀도와 정확도를 산출하였다. 정밀도를 일간 및 일내 반복 분석 결과의 표준편차로 산출하고, 정확도는 이론값과 실측값을 비교하여 산출하였다.

Canthaxanthin을 사용할 수 있는 서로 다른 3개의 식품 매트릭스(수산물, 음료, 유제품)에 최종농도가 5, 10, 50 µg/mL가 되도록 canthaxanthin 표준용액을 첨가하여 회수율을 측정하였다. 회수율은 3 반복 실험으로 진행되었다.

Canthaxanthin 최적 분석법의 타당성을 확보하기 위하여 서로 다른 3개의 실험실에서 같은 농도 조건으로 조제된 시료를 실험하여 실험실 간 교차검증을 하였다. 3개 실험실에서 직선성과 회수율을 3 반복 측정하고 그 결과값의 C.V(%)를 산출하여 교차검증의 우수성을 확인하였다. 6개 농도로 조제한 canthaxanthin 표준용액 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/mL를 3 반복 측정하여 검량선을 작성하고 그 R<sup>2</sup>값과 C.V(%)를 산출해 직선성을 확인하였다. 또한 한 가지 식품군에 최종농도가 10, 20, 50 µg/mL가 되도록 canthaxanthin 표준용액을 첨가한 후 회수되는 농도를 측정하여 이론값에 대비한 회수율을 산출하고, 실험실 간 C.V(%)값을 산출하였다.

**최적 분석법의 측정불확도 추정**

Canthaxanthin 최적 분석방법의 불확실성을 추정하기 위하여 GUM(Guide to the expression of uncertainty in measurement)에 근거하여 모델식을 설정하고(12), 시료전처리에 대한 불확도, 표준물질 순도에 대한 불확도, 표준용액 제조에 대한 불확도, 표준물질 검량선에 대한 불확도, 반복측정에 대한 불확도를 설정하여 Fig. 1과 같이 특성요인

도(Fish bone diagram)를 나타내었다. 식 (4)~(8)을 이용하여 각각의 불확도 요인에 대한 표준불확도, 상대표준불확도, 합성상대표준불확도, 합성표준불확도, 확장불확도를 산출하여 canthaxanthin 분석법의 측정불확도를 추정하였다(12-14).

위의 불확도 요인에 대한 표준불확도를 산출할 때 반복 측정값이 있는 경우는 A type 표준불확도 식 (4)를 이용하였고, 교정성적서 상의 불확도 또는 반복 측정하지 않은 데이터를 이용하는 경우는 B type 표준불확도 식 (5)를 이용하였다. 검량선 이외의 실험에서 반복측정이 이루어진 경우는 자유도를 n-1로 계산하였고, 검량선을 위한 실험에서는 반복측정이 이루어졌다고 하더라도 KRISS 지침에 따라 검량선 기술기에 대한 표준불확도의 자유도를 n-2로 계산하였다(14).

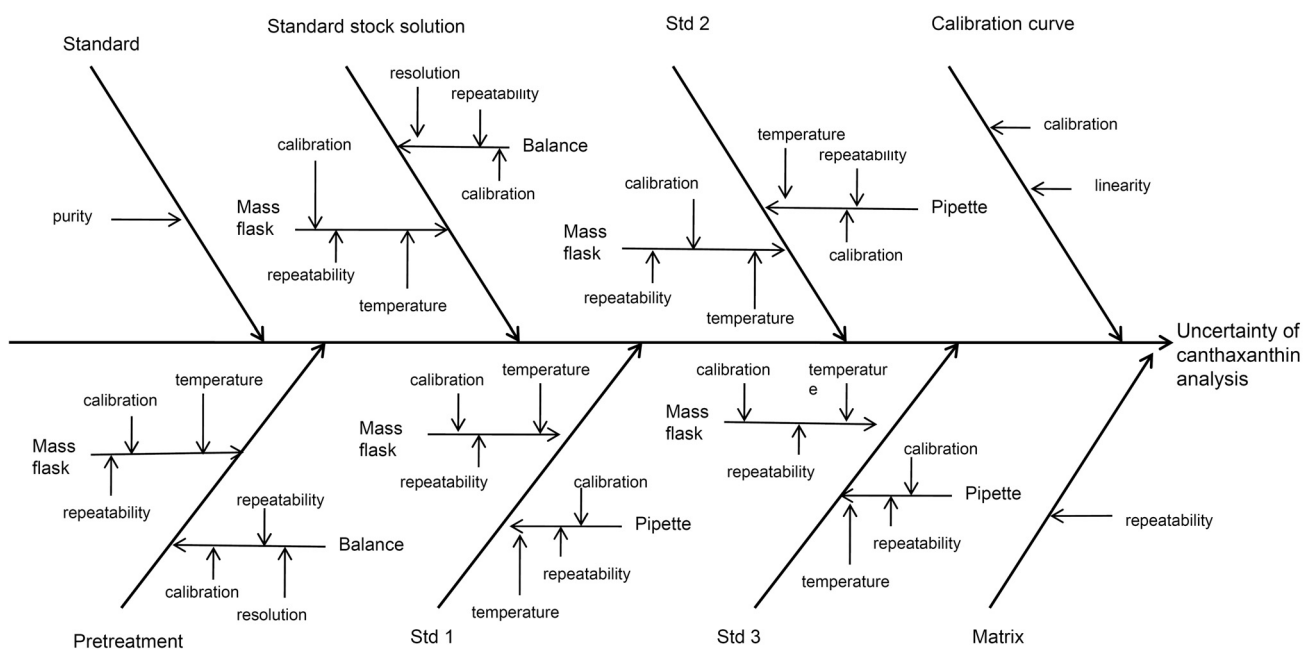
합성표준불확도는 식 (4) 또는 식 (5)를 이용하여 산출한 각 불확도 요인의 표준불확도 값을 근거로 불확도 전파의 법칙에 따라 식 (6)을 이용하여 산출하였다(12-14).

확장불확도는 식 (8)과 같이 합성표준불확도에 포함인자 k를 곱하여 산출하였다. 이때 자유도는 식 (7)을 이용하여 산출하였으며, 자유도가 10보다 큰 경우는 95% 신뢰 수준에서 k=2를 적용하였고, 10보다 작은 경우는 Student t-분포표를 이용하여 k값을 적용하였다(12-14).

$$u(x_i) = \frac{S}{\sqrt{n}} \tag{4} \text{ (A type)}$$

$$u(x_i) = \frac{\text{error}}{\sqrt{3}} \tag{5} \text{ (B type)}$$

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) \tag{6}$$



**Fig. 1.** Fish bone diagram of uncertainty sources in canthaxanthin determination.

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (7)$$

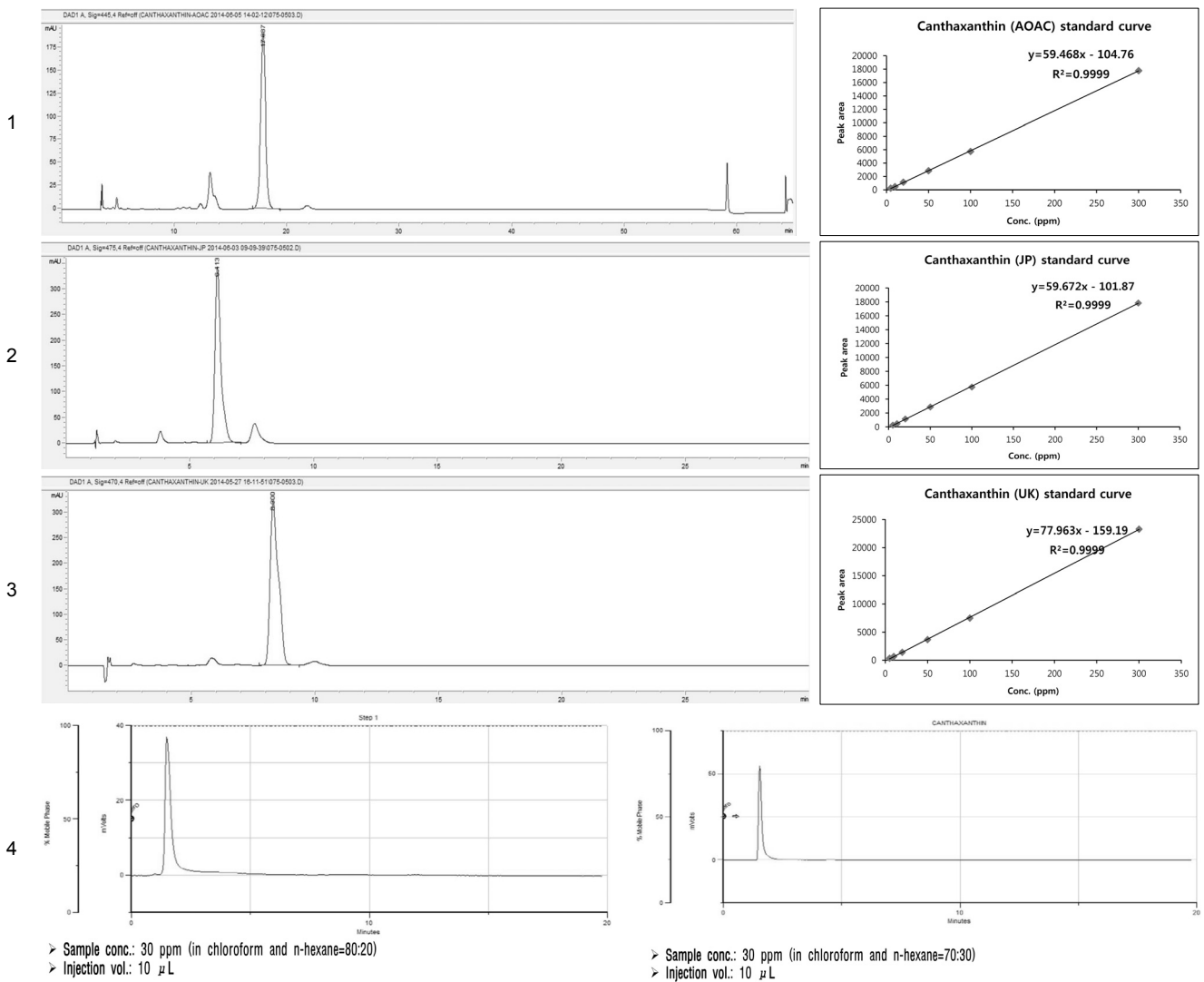
$$U(y) = k u_c(y) \quad (8)$$

- $u$ : Standard uncertainty
- $n$ : Number of measurements
- $u_c$ : Combined standard uncertainty
- $v_{eff}$ : Effective degree of freedom
- $U$ : Expanded uncertainty
- $k$ : Coverage factor

**결과 및 고찰**

**Canthaxanthin HPLC 분석법의 분리능, 민감도, 직선성, LOD, LOQ 비교**

Canthaxanthin의 HPLC 최적 조건을 확인하기 위하여 AOAC법, 일본, 영국, 유럽연합의 공인분석법(3,7-9)에서 제시한 Table 2의 조건으로 실험한 결과 Fig. 2와 Fig. 3의 결과를 얻었다. 분리능은 AOAC법이 5.8로 가장 좋았으나 오랜 분석 시간(65분)과 머무름 시간(17.8분)을 나타내었고, 유럽연합 공인분석법은 피크의 분리능 및 민감도에 문제가 있는 것으로 나타나 비교 대상에서 제외했다(Fig. 2). 일본과 영국의 공인분석법으로 canthaxanthin을 분석 시 총분석시간 30분, 머무름 시간 6~8분으로 비슷한 결과를 나타내었지만, 분리능과 민감도는 일본 방법이 각각 4.0, 1.3으로 나타났고 영국 방법이 각각 2.4, 1.3으로 나타나 일본 방법이 더 우수하였다(Fig. 2). 또한 canthaxanthin 표준용액을 5, 10, 20, 50, 100, 300 µg/mL의 6 point로 희석한 후 Table 2의 조건으로 HPLC 분석을 통해 얻은 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 AOAC, 일본, 영국의 공인 분석법 모두 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 2)(15).



**Fig. 2.** Chromatogram and calibration curves of canthaxanthin standard solution by using various HPLC methods. 1, AOAC (8); 2, MLHW (9); 3, FSA (7); 4, EFSA (3).

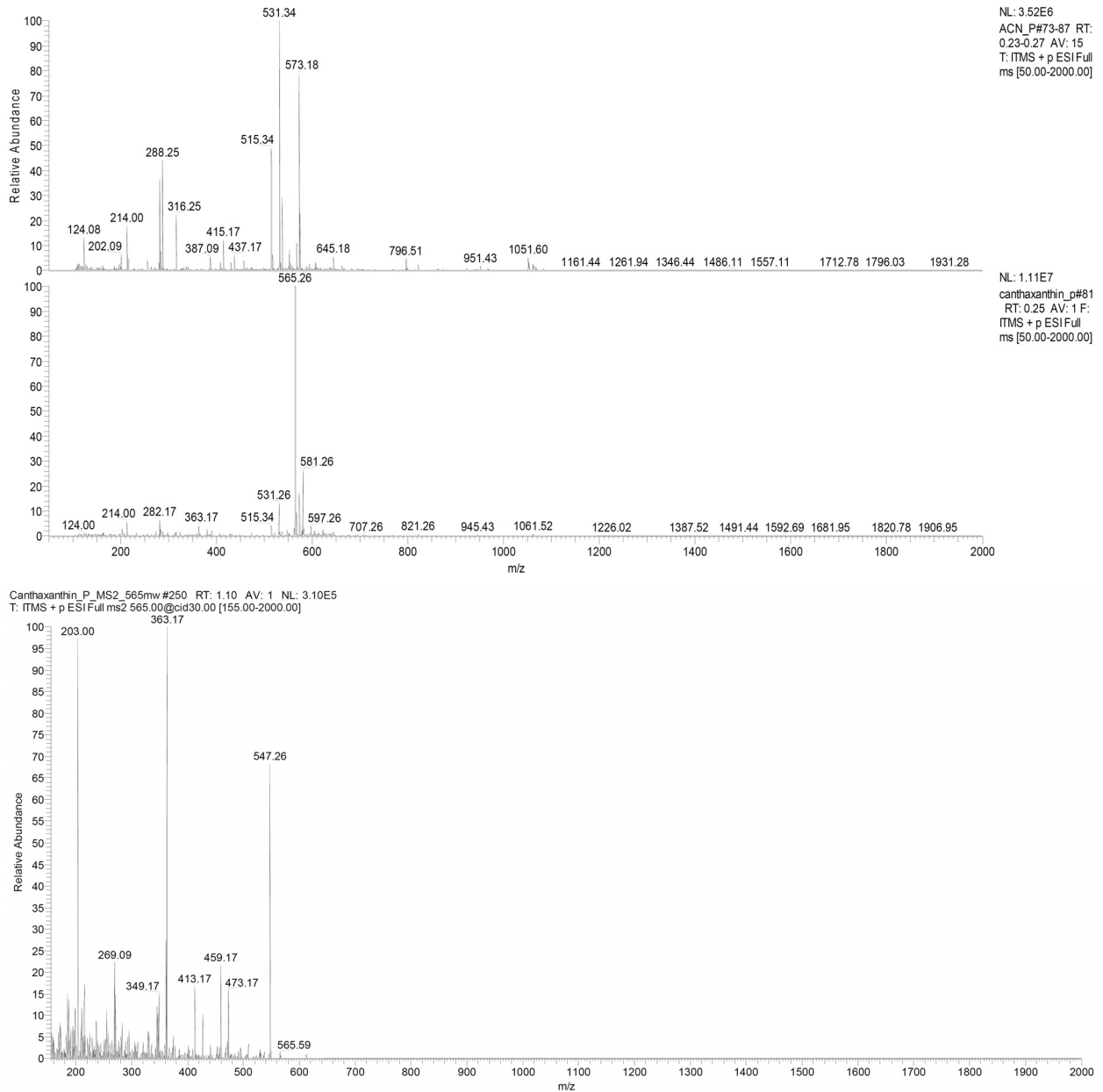


Fig. 3. Full mass scan of canthaxanthin using LC-MS and LC-MS/MS.

LOD와 LOQ는 AOAC법이 0.105 mg/kg, 0.918 mg/kg으로 나타났고, 일본의 공인분석법은 0.084 mg/kg, 0.254 mg/kg으로 나타났으며, 영국의 공인분석법은 0.395 mg/kg, 1.196 mg/kg으로 나타나 일본 공인분석법이 가장 우수하였다. LC-MS와 LC-MS/MS를 이용한 canthaxanthin 분석 결과는 Fig. 3과 같다(15).

#### 정밀도 및 정확도를 이용한 canthaxanthin 최적 분석법 확인

위의 결과를 종합해볼 때 일본에서 발표한 canthaxanthin 공인분석방법의 HPLC 분석조건이 직선성, 분리능, 민감도, LOD, LOQ 면에서 가장 우수한 것으로 나타났다. 그러나

이 방법이 canthaxanthin 분석을 위한 최적의 방법이 되기 위해선 실험 중에 발생할 수 있는 계통오차(systematic error) 또는 우연오차(random error)가 이상적인 기준에 부합하는지 확인해볼 필요가 있다. 따라서 일간분석 및 일내분석을 통해 정밀도와 정확도를 측정된 결과(12) Table 4와 같은 결과를 얻었다. Canthaxanthin 표준용액의 농도를 10, 20, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 6 point로 희석하여 하루에 1회 분석으로 3일간 측정하여 얻은 일간분석에서 정밀도는 0.06~1.09로 나타났고, 정확도는 91~102%로 나타났다. 또한 canthaxanthin 농도를 30, 60, 120, 180  $\mu\text{g/mL}$ 의 4 point로 조제하여 하루 동안 5회 분석하여 얻은 일내분석에서는 정밀도가 0.04~1.19, 정확도는 101~106%로 나타났

**Table 4.** Precision and accuracy obtained from inter-day test and intra-day test using optimized analysis methods

	Inter-day test (n=3)						Intra-day test (n=5)			
	10	20	50	100	150	200	30	60	120	180
Spiked concentration (µg/mL)	10	20	50	100	150	200	30	60	120	180
Mean concentration (µg/mL)	9.12	19.23	49.97	101.43	153.34	196.91	31.68	62.82	125.9	181
Precision	0.06	0.21	0.46	0.44	1.09	0.9	0.04	0.1	0.19	0.12
Accuracy (%)	91.2	96.1	100	101.4	102.2	98.5	105.6	104.7	104.7	100.5

다. 즉, 일간분석 및 일내분석 모두에서 국제표준화기구(International Organization for Standardization, ISO)가 이상적인 측정값이라고 설정한 정밀도 1, 정확도 90~105%의 기준에 근접하는 결과를 나타내(12), 일본의 공인분석방법이 canthaxanthin 최적 분석방법이 되기에 매우 타당하였다(15).

**Canthaxanthin 전처리법 비교 및 최적화**

Canthaxanthin 사용대상 식품인 음료, 유제품, 수산물 가공품의 3개 식품군에 속하는 시료 각 5 g을 취하여 canthaxanthin 표준용액을 50 mg/kg 농도가 되도록 첨가한 후 AOAC법, 일본 및 유럽연합의 공인분석방법에 따라 전처리하고(3,8,9), 위에서 canthaxanthin 최적 기기조건으로 확인된 일본의 HPLC 분석조건(Table 2)으로 분석한 결과는 Table 5와 같다. 유럽연합의 canthaxanthin 전처리법은 음료, 유제품, 수산물 가공품 모두에서 53% 이하의 회수율을 보여 가장 정확도가 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 전처리 절차 중 효소처리 과정이 포함되어 있어 오랜 분석시간이 요구될 뿐만 아니라 분석 비용이 많이 드는 단점이 발생하였다. AOAC 방법은 전처리 법이 간단하였지만 세 종류 식품 매트릭스에 첨가한 canthaxanthin 회수율이 73% 이하로 나타나 역시 최적 전처리법으로 확보되기에는 부족하였다. 일본 공인분석법의 경우 50 mg/kg 농도로 첨가한 cantha-

xanthin이 세 가지 서로 다른 매트릭스에서 91~99%로 회수되는 것으로 나타나 가장 좋은 결과를 보였다. 최적 분석법이 되려면 낮은 첨가농도에서도 높은 회수율을 나타내어야 하므로, canthaxanthin 표준용액을 최종농도가 5, 10, 50 mg/kg이 되도록 세 종류 식품 매트릭스에 첨가하여 일본의 전처리법으로 다시 한 번 회수율 실험을 한 결과 세 농도 모두에서 87~106%의 우수한 회수율을 나타내고, 분석법의 정밀도를 나타내는 분석값 간의 상대표준편차는 1.7~23.9%의 좋은 결과를 나타내었다(Table 6). 이상에서 가공식품 중 canthaxanthin 최적 전처리법과 HPLC 기기조건은 모두 일본의 공인분석법으로 확인되었다.

**Canthaxanthin 최적 분석법의 실험실 간 교차검증**

Canthaxanthin 최적 분석법으로 확인된 일본의 공인 분석법을 이용하여 서로 다른 3개의 실험실에서 HPLC 기기의 직선성과 회수율을 측정된 결과는 Table 7과 같다. 검량선 농도를 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/mL의 6 point로 조제하여 측정된 결과 각 실험실 간에 약간의 차이는 있었으나 R<sup>2</sup>값이 0.999 이상으로 우수하였다. 한 가지 식품군에 10, 20, 50 µg/mL의 3개 농도가 되도록 canthaxanthin을 첨가한 후 회수율을 측정된 결과 세 기관 모두에서 90~110%로 나타났고, CV% 값이 평균 5% 정도로 평이한 결과를 얻어 분석방법의 타당성이 입증되었다(14,15).

**Table 5.** Comparison for recoveries of canthaxanthin in the 50 µg/mL spiked concentration using various official methods

	AOAC <sup>1)</sup>			MHLW <sup>2)</sup>			EFSA <sup>3)</sup>		
	Mean concentration	RSD (%)	Recovery (%)	Mean concentration	RSD (%)	Recovery (%)	Mean concentration	RSD (%)	Recovery (%)
Beverage	36.4±2.9	8.0	72.8	49.0±8.0	16.2	97.9	26.7±6.0	22.3	53.4
Dairy product	34.9±3.1	8.7	69.9	45.6±4.2	9.2	91.2	26.0±2.3	8.9	52.0
Fishery product	36.0±4.1	12.1	66.7	49.3±2.5	5.1	98.6	26.0±3.1	12.1	51.5

<sup>1)</sup>AOAC (8). <sup>2)</sup>MLHW (9). <sup>3)</sup>EFSA (3).

**Table 6.** Recoveries of canthaxanthin using optimized analysis methods

Class	Spiked concentration	Mean±SD (µg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
Beverages	5 µg/mL	4.7±0.4	7.4	94.6
	10 µg/mL	8.7±0.4	4.1	87.4
	50 µg/mL	49.0±8.0	16.2	97.9
Dairy products	5 µg/mL	5.0±0.1	2.4	100.0
	10 µg/mL	9.0±2.2	23.9	90.4
	50 µg/mL	45.6±4.2	9.2	91.2
Processed marine products	5 µg/mL	4.7±0.1	1.7	93.5
	10 µg/mL	10.6±1.2	11.5	106.0
	50 µg/mL	49.3±2.5	5.1	98.6



**Table 7.** Inter laboratory test using optimized canthaxanthin analysis methods

	Spiked concentration	Laboratory 1	Laboratory 2	Laboratory 3	C.V (%)
Recovery	10 µg/mL	101.1%	95.6%	109.9%	7.05
	20 µg/mL	102.3%	94.6%	97.7%	3.95
	50 µg/mL	95.4%	90.2%	90.7%	3.96
R <sup>2</sup> (correlation coefficient)		0.9996	0.9995	0.9999	—

### Canthaxanthin HPLC 최적 분석법의 측정불확도

본 실험에서 확인한 canthaxanthin 최적 분석법의 타당성을 확보하기 위하여 측정불확도를 평가하였다. 측정 결과값에 영향을 줄 수 있는 불확도 인자로 시료 전처리, 표준물질, 표준용액제조, 검량곡선, 시료 반복 측정을 설정하였고, 요인별 측정값에서 표준불확도, 상대표준불확도, 합성상대표준불확도, 합성표준불확도, 확장불확도를 계산하여 canthaxanthin 측정불확도를 산출하였다. 이때 측정 결과에 대한 불확도는 약 95%의 신뢰수준에서의 포함인자( $k$ , coverage factor)를 적용하여 산출하였다(14,16-18).

시료 전처리에 대한 표준불확도에는 저울과 용량플라스크가 포함되었다. 화학저울 교정성적서 상의 불확도, 표준분동에 대한 반복측정 안정성, 화학저울의 분해능이 저울의 불확도 요인으로 측정되었으며, 교정성적서 상의 불확도, 물 무게의 반복측정 안정성, 온도에 대한 부피 안정성이 용량플라스크의 불확도 요인으로 측정되었다. 화학저울에 대한 교정성적서 상의 불확도는 0.0003 g(95% 신뢰수준)으로 나타나 표준불확도는 0.00013이었다. 저울의 안정성 실험에서는 25 g 분동을 이용하여 4회 반복 측정된 합동 표준편차가 0.000052 g으로 나타나 표준불확도는 0.000026이었다. 화학저울의 분해능은 0.0001 g이었으며, 분해능에 대한 표준불확도는 0.0000289였다. 용량플라스크의 교정성적서 상의 불확도는 0.69 mL이고 표준불확도는 0.35였다. 물을 채워 10회 반복 측정 시의 표준편차는 0.00348 g이고 표준불확도는 0.00110이었다. 실험실 온도 변화( $\pm 5^\circ\text{C}$ )에 따른 물의 팽창계수(0.00021/ $^\circ\text{C}$ )를 고려한 표준불확도는 0.061로 나타났다. 따라서 시료 전처리에 대한 저울과 용량플라스크의 상대표준불확도는 각각 0.0000027, 0.0007이었고, 합성상대표준불확도는 0.0007로 나타났다.

표준물질의 불확도는 제조사 규격을 적용하여 산출하였다. Canthaxanthin 표준물질의 순도는 98.8%, 오차는  $\pm 1.2\%$ 였고, 신뢰구간이 정해져 있지 않았으므로 직사각형 분포로 추정하였다. Canthaxanthin 표준물질의 불확도는 오차를  $\sqrt{3}$ 으로 나누어 0.0069로 산출되었으며, 합성상대표준불확도는 0.0070으로 산출되었다.

표준용액 제조의 불확도 측정에서 canthaxanthin 표준용액을 1,008 µg/mL로 제조하기 위해 사용된 용량플라스크, 화학저울의 불확도를 계산하여 불확도 요인으로 산출하였다. 교정성적서 상에 표시된 불확도, 10회 반복측정에 대한 불확도, 실험실 온도 변화( $\pm 5^\circ\text{C}$ )에 따른 물의 팽창계수(0.00021/ $^\circ\text{C}$ )를 고려한 불확도를 계산하여 용량플라스크의

상대표준불확도를 구하였으며, 화학저울 교정성적서 상의 불확도, 표준분동에 대한 반복측정 안정성, 화학저울의 분해능을 불확도 요인으로 화학저울의 상대표준불확도를 측정하였다. 그 후 화학저울과 용량플라스크의 상대표준불확도를 합성하여 표준용액 제조에 대한 합성상대표준불확도를 추정된 결과 0.0015로 나타났다.

검량곡선의 불확도 측정을 위해서는 canthaxanthin 표준용액을 0.1, 5, 10, 20 µg/mL 농도로 희석한 후 HPLC-UVD로 3회씩 반복 측정하고 최소사승법을 이용하여 검량선을 작성한 결과 상관계수( $R^2$ )는 0.999였다. 식 (4)에 의해 산출된 검량선의 표준불확도는 0.051 µg/mL였으며, 상대표준불확도는 0.0260으로 산출되었다.

시료 반복측정에 대한 불확도 측정을 위해 시료 5.000 g을 채취하여 3회 반복 분석한 결과 시료 중 canthaxanthin 평균함량은 39.5 mg/kg으로 측정되었다. 이때의 표준편차는 2.7332이며 자유도는 2, A형 표준불확도는 1.5780, 상대표준불확도는 0.03999로 측정되었다.

Canthaxanthin 확장불확도(expanded uncertainty)를 산출하기 위해 위에서 측정된 불확도 요인 각각의 표준불확도와 상대표준불확도로부터 합성상대표준불확도(combined relative uncertainty)와 합성표준불확도(combined standard uncertainty)를 산출하였다. 그 결과 Table 8과 같이 측정 농도 39.5 mg/kg에 대한 합성표준불확도는 1.9 mg/kg으로 나타났다. Canthaxanthin 확장불확도는 식 (8)을 이용하여 합성표준불확도 1.9 mg/kg에 포함인자  $k=2.78$ 을 곱하여 산출하였으며, 5.29 mg/kg으로 나타났다. 즉 측정 농도 39.5 mg/kg은 확장불확도를 포함하여  $39.5 \pm 5.29$  mg/

**Table 8.** Uncertainties for canthaxanthin analysis using HPLC-UVD

Parameter	Result
Concentration <sup>1)</sup>	39.5
Combined relative uncertainty (ur/r)	0.048
Combined standard uncertainty (uc) <sup>1)2)</sup>	1.9
Expanded uncertainty (U) <sup>1)3)</sup> (95% confidence level, $k=2$ )	5.29
A coverage factor ( $k$ )	2.78
Effective degree of freedom (veff)	4
Uncertainty/result (%)	13.39

<sup>1)</sup>Unit is mg/kg.

<sup>2)</sup>Combined standard uncertainty was calculated for multiplying concentration and combined relative uncertainty.

<sup>3)</sup>Expanded uncertainty was calculated for multiplying combined standard uncertainty and a coverage factor.

kg(95% 신뢰구간,  $k=2.78$ )으로 표기될 수 있다. 이때 확장 불확도는 측정 농도의 13.4%에 해당하는 값으로 유럽연합의 기준 16%를 만족하는 값이었다(19). 따라서 본 연구에서 확인한 canthaxanthin 최적 분석법은 향후 우리나라 공인분석방법으로 제시되기에 타당하다고 생각한다.

### 요 약

본 연구는 한국에서 식용색소로 지정되지 않은 keto-carotenoid계의 canthaxanthin에 대한 최적 분석방법을 확보하기 위해 수행되었다. HPLC-UVD를 이용한 외국의 canthaxanthin 공인분석법을 검토하여 직선성, 분리능, 민감도, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)를 도출하고, 각 실험 데이터를 비교하여 최적의 canthaxanthin 분석방법을 확보하였다. 또한 확보된 최적 분석방법에 대한 정밀도, 정확도, 회수율, 실험실 간 교차검증, 측정불확도를 산출하여 canthaxanthin 최적 분석법에 대한 타당성을 검증하였다. AOAC법, 일본 및 영국의 공인분석법을 이용하여 canthaxanthin 표준용액을 5, 10, 20, 50, 100, 300 µg/mL의 6 point로 희석한 후 얻은 검량선의 상관계수는 모두  $R^2=0.999$  이상으로 나타나 우수한 직선성을 보였으나 분리능, 민감도, LOD, LOQ는 일본의 공인분석법이 가장 우수하였다. 일본 공인분석법의 LOD와 LOQ는 각각 0.084 mg/kg, 0.254 mg/kg으로 나타났다으며, 1보다 낮은 정밀도, 100%에 가까운 정확도,  $100 \pm 10\%$  사이의 회수율, 교차검증 시 세 기관의 변동계수가 5 이하로 나타나 canthaxanthin 분석을 위해 가장 최적화된 방법으로 확인되었다. 또한 측정하는 중에 나타나는 불확실성을 알아보기 위하여 canthaxanthin이 함유된 가공식품을 분석하여 측정불확도를 산출한 결과  $39.5 \pm 5.29$  mg/kg (95% 신뢰구간,  $k=2.78$ )으로 나타났다. 확장불확도는 측정 농도의 13.4%로 나타나 유럽연합의 기준(16% 이하)에 적합한 결과를 보였다.

### 감사의 글

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처 연구개발비(14162 불량식971)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Isler O. 1979. History and industrial application of carotenoids and vitamin A. *Pure & Appl Chem* 51: 447-462.
2. WHO. 1996. *WHO Food Additives Series 35*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je08.htm> (assessed Jul 2015).

3. EFSA. 2010. Scientific opinion on the re-evaluation of canthaxanthin (E 161 g) as a food additive. *EFSA Journal* 8: 1852.
4. WHO. 1986. *WHO Food Additives Series 22*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v22je09.htm> (accessed Jul 2015).
5. FDA. 2015. *Code of Federal Regulation Title 21*. Food and Drug Administration, Washington, DC, USA. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=73.75> (accessed Jul 2015).
6. KFDA. 2010. *Korea Food Additives Code*. Korea Food and Drug Administration, Ohsong, Korea. Available from: [http://www.mfds.go.kr/fa/%20%20index.do?nMenuCode=12&page\\_gubun=1&gongjeoncategory=1](http://www.mfds.go.kr/fa/%20%20index.do?nMenuCode=12&page_gubun=1&gongjeoncategory=1) (accessed Jul 2015).
7. FSA. 2010. *Review and evaluation of available methods extraction and analysis for approved natural colours in food and drink*. Food Standard Agency, London, UK. p 13-29.
8. AOAC. 2012. *Official methods of analysis*. 19th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. Chapter 51, p 13.
9. JMHLW. 2009. *Canthaxanthin analysis method*. The Japan Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan. Available from: <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iya-ku/syoku-anzen/zanryu3/2-042.html> (accessed Jul 2015).
10. Ahuja S, Dong MW. 2005. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Elsevier Academic Press, London, UK. p 1-658.
11. EMEA. 2006. *Validation of analytical procedures: Text and methodology*. European Medicines Agency, London, UK. p 8-15.
12. ISO. 2004. *Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) – Supplement 1: Numerical methods for the propagation of distributions*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. p 5-36.
13. Ellison SLR, Roeslein MI, Williams A. 2000. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2nd ed. EURACHEM, London, UK. p 32-94.
14. KRIS. 2010. *Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea. p 1-142.
15. Kim KS. 2015. Comparison and optimization of the analytical method for canthaxanthin, a food additive. *MS Thesis*. Chung-Ang University, Gyeonggi, Korea. p 27-33.
16. CITAC. 2012. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd ed. Cooperation on International Traceability Analytical Chemistry, Sugiez, Switzerland. p 4-31.
17. BIPM. 2008. *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Bureau International des Poids et Mesures, Sèvres, France. p 5-27.
18. EC. 2004. *Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation, with particular reference to community legislation concerning*. European Commission, Brussel, Belgium. p 6-22.
19. Codex. 2004. *Guidelines on measurement uncertainty CAC/GL 54-2004*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. p 5.