

Analytical method validation and monitoring of levulinic acid in soy sauce and their application to food

Dan-Bi Kim, Sunyoung Kim¹, Sanghee Lee, and Miyoung Yoo[★]

*Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea
1Food Safety Center, Food R&D Division, Kwangdong Pharm Co., Ltd, 271,
Digital-ro Guro-gu, Seoul 08381, Korea*

(Received August 31, 2017; Revised October 14, 2017; Accepted October 17, 2017)

간장 및 이를 활용한 식품의 레불린산 분석방법 검증 및 모니터링

김단비 · 김선영¹ · 이상희 · 유미영[★]

한국식품연구원, ¹광동제약 식품연구개발본부 안전센터
(2017. 8. 31. 접수, 2017. 10. 14. 수정, 2017. 10. 17. 승인)

Abstract: This study presents a method validation for extraction and quantitative analysis of levulinic acid in soy sauces using high performance liquid chromatograph-photodiode array detector (HPLC-PDA). The levulinic acid in samples were extracted with distilled water, and then purified with C18 Sep-Pak cartridge. The calibration curves showed good linearity ($R > 0.999$) in a relatively wide concentration range (2.5-400 $\mu\text{g/mL}$). Mean recoveries and relative standard deviation (RSD) of levulinic acid spiked in soy sauce samples at different spiking levels (2.5-400 $\mu\text{g/mL}$; 6 point). Recoveries were 87.58-97.26 % with RSD less than 15 %, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.64 and 1.64 $\mu\text{g/mL}$, respectively. According to monitoring result with the established method, levulinic acid was found in 43 of 59 domestic commercial soy sauces, soy sauce based sauces and seasoned meats. The contamination levels were 0.44-1.23 mg/mL for soy sauces, 0.03-0.83 mg/mL for soy sauce based sauces and 8.43-38.94 mg/mL for seasoned meats. The results indicated to be rapidly and accurately qualifying levulinic acid and can be used as a suitable quality control method for soy sauce and soy sauce related commodities.

요 약: 본 연구는 High liquid chromatograph-photodiode array detector (HPLC-PDA)를 사용하여 간장 및 이를 활용한 식품에서의 레불린산을 측정하기 위하여 신속·정확한 분석법을 개발하였다. 시료 중 레불린산은 증류수로 추출한 후 C18 Sep-Pak 카트리지로 정제하여 기기분석을 수행하였다. 직선성은 비교적 넓은 농도 범위 (2.5-400 $\mu\text{g/mL}$)에서 우수한 선형성 ($R > 0.999$)을 나타내었으며, 간장 시료에 대하여 레불린산의 회수율을 확인한 결과, 6 가지 농도범위(2.5-400 $\mu\text{g/mL}$)에서 87.58-97.26 %로 확인되었으며, 모두 15 % 미만의 표준오차를 나타내었다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.64와 1.64 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 간장 및 이를 활용한 식품에서의 레불린산 함량을 조사한 결과 59 개의 샘플 중 43 개의 샘플에서

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)31-780-9342 Fax : +82-(0)31-780-9280

E-mail : myyoo@kfri.re.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

검출되었다. 검출 수준은 간장의 경우 0.44-1.23 mg/mL, 간장 소스의 경우 0.03-0.83 mg/mL, 양념육의 경우 8.43-38.94 mg/mL로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발된 분석법은 신속하고 정확하게 레블린산을 정량하고 간장 및 이를 활용한 상품의 적절한 품질 관리 방법으로 사용될 것으로 판단된다.

Key words: levulinic acid, monitoring, analytical method, HPLC-PDA, soy suace

1. 서 론

레블린산(levulinic acid) 탄수화물, 단백질 등을 산으로 가수분해 시 발생하는 부반응의 결과로 산처리 공정의 높은 반응 온도와 낮은 pH 조건으로 푸르푸랄(furfural), 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethyl furfural, 5-HMF)과 함께 생성되는 2차 전환산물이다 (Fig. 1). 또한 levulinic acid는 탈지 콩, 밀글루텐, 옥수수글루텐을 염산이나 황산으로 가수 분해하여 얻는 아미노산 액인 식물성 가수분해 단백질(hydrolyzed vegetable protein, HVP)이 사용된 제품에서 함량이 높아지는 특성을 가지고 있어서 HVP 사용 여부에 대한 지표물질로 사용하고 있다.¹ HVP는 간장 원료, 양념류, 즉석면 및 스프 등 다양한 가공식품에 사용되고 있다.

간장의 경우, 우리나라의 대표적인 발효식품으로서 오랜 기간 우리 식단의 기본 조미료로 사용되고 있다. 간장은 식품기준규격에 따라 양조간장(brewed soy sauce, BSS), 산분해간장(acid hydrolyzed soy sauce, AHSS), 혼합간장 등으로 분류되며 식품유형별로 다양한 형태의 간장이 시중에 판매되고 있다. 혼합간장은 양조간장, 산분해간장 등을 적당한 비율로 배합하여 숙성시켜 여과한 후 살균 처리하여 만든 간장으로서 단 시간에 숙성이 가능하기 때문에 대량생산에 유리하여 시중에 많이 유통되고 있다. 그러나 산분해간장은 대표적인 HVP로서, 염산과 가성소다를 처리하여 단 시간 내에 콩을 가수분해하여 제조하며 이 과정에서 유해물질인 3-모노클로로

프로판디올(3-monochloropropanediol, 3-MCPD), 디클로로프로판(dichloropropane, DCP), 식용여부가 확인되지 않은 levulinic acid와 화학염 등이 생성된다고 알려져 있다.^{2,3} 미국 국립산업안전보건연구소(the National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)가 운영하는 화학물질 독성영향기록에 의하면(RTECS number; OI1575000), levulinic acid는 급성독성 실험에서 마우스 경구 투여 시 반수치사량(LD₅₀, lethal dose for 50 percent kill)은 1850 mg/kg으로 보고되었다. Levulinic acid가 인체에 미치는 영향은 현재까지 보고된 바 없으며, 국내는 물론 제외국에서도 일일섭취허용량, 잔류에 대한 기준·규격은 설정되어있지 않은 상태이다. 따라서 levulinic acid의 오·남용 문제가 나타날 수도 있다.

국내에서는 산분해간장 혼입여부를 확인하기 위하여 국가표준(KS) 식품의 기준 및 규격 검증 식품의 기준 및 규격 ‘제2015-78호 KS H2118 2014 간장’에 의하여 화학적 반응에 기반을 둔 시험법으로 녹색띠 생성여부에 따라 양성 및 음성으로 판정하는 바닐린-황산법을 사용하고 있으며, 유사하게 일본에서도 바닐린-황산 방법(JAS, 1978)을 이용하여 혼입여부를 확인하고 있다.⁴ 그러나, 바닐린-황산 시험법은 시험결과를 육안으로 판단하기 때문에 소량의 산분해간장 혼입 시 육안으로 판정이 어려운 경우가 발생하고 있다. Levulinic acid에 대한 기기 분석에 대한 연구는 재생 가능한 바이오매스에 관한 연구로 대형조류, 옥수수, 콩과 같은 식용작물에서 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)⁵와 식품의 유기산 중 일부로 가

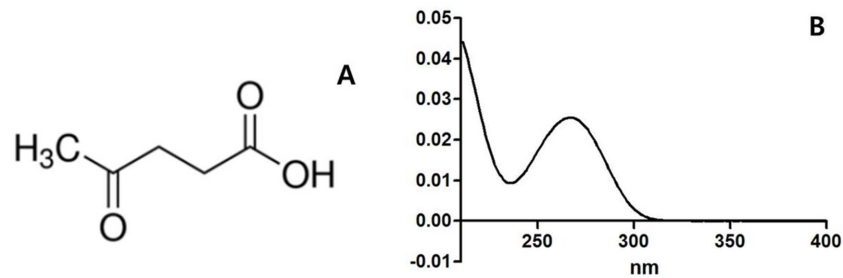


Fig. 1. Molecular structure (A) and spectrophotometer spectrum (B) of levulinic acid.

스크로마토그래피(Gas chromatography; GC)⁶로 수행된 연구보고가 있으나, 분석법 검증 및 간장 및 이물 함유 식품의 함량에 대해서는 연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서는 levulinic acid 실험의 신뢰성 향상을 위하여 함유여부 및 함유량을 정확하고 신속하게 측정할 수 있는 기기 분석법을 확립하고 국내에서 시판 중인 간장, 간장 소스류 및 양념육을 수거하여 추후 기준치 설정 및 규제관리에 필요한 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 재료

Levulinic acid 표준품은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, HPLC grade의 methanol, Acetonitrile 등 용매는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였으며 0.1N hydrochloric acid (HCl)는 DAEJUNG (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd.)로부터, formic acid는 Wako (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Sep-pak[®] Vac C18 카트리지가 Waters (Waters Associates, Milford, MA, USA)로부터 구입하였다. 검체는 국내 유통 중인 간장, 소스류 및 양념육을 구입하였으며 양념육의 경우 양념소스를 따로 취하여 균질화한 후 -4 °C에서 보관하여 사용하였다. 표준원액은 levulinic acid 50 mg을 증류수 50 mL로 용해하여 4 °C에 보관하였으며, 이를 증류수로 희석하여 2.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL의 표준용액을 제조하여 실험에 사용하였다.

2.2. 추출 및 정제

균질화한 검체 2 g을 정밀히 달아 증류수 50 mL로

정용하여 1분간 격렬하게 진탕한 후 실온에서 10분간 초음파추출을 진행하였다. 검체 중 소스류 및 양념육의 양념소스는 5 g을 정밀히 달아 동일하게 수행하였다. 다음 추출용액을 filter paper (No.2, Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 다음 C18 Sep-Pak 카트리지가 (Waters Sep-Pak[®] Vac 6cc)에 methanol, 증류수, 0.01N HCl을 5 mL씩 차례로 통과하여 활성화 시킨 후, 추출용액 5 mL를 loading하였다. 다음 증류수 10 mL를 가하여 용출시켜 받은 후 0.2 µm 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

2.3. 기기분석

Levulinic acid 분석은 Bevilacqua 등의 방법⁵을 변형하여 수행하였으며, 분석에 사용한 기기는 Waters e2695 Separation Module HPLC system과 Water 2998 Photodiode Array Detector (Waters Co., Milford, MA, USA)로 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 YMC C30 Column (150 × 4.6 mm, 3 µm particle size; YMC Europe, Dinslaken, Germany)을 이용하였다.

2.4. 분석법 유효성 검증

본 연구에 사용된 분석법은 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인’에 준하여 특이성 (specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD, S/N=3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)로 유효성 검증을 실시하였다.⁸ 특이성은 표준물질과 시료의 머무름 시간(Retention time)과 스펙트럼(Spectrum)의 일치 여부로 특이성을 확인하였으며, 직선성은 표준물질 levulinic acid를 2.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL로 제조하여 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정하였다. 다음 chromatogram에 대한 면적과 표준용액의 농도를 이용하여 검량선 작성 및 상관관계수 값을 구하여 확인하였다. 정밀성은 하루 3번 수행하는 일내(Intra-day)와 3일간 수행하는 일간(Inter-day)으로 나누어 실험을 수행하였다. 정확성은 회수율을 통하여 확인하였으며, 회수율은 표준물질 첨가법(standard addition)을 활용하여 levulinic acid 표준물질을 2.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL의 여섯가지 농도로 각각 첨가하여 3회 반복으로 실험한 후 측정하였다. 검출한계와 정량한계는 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하여 검출한계는 신호 대 잡음비가 3:1일 때, 정량한계는 신호 대 잡음비가 10:1일 때로 나타내었다.

Table 1. HPLC-PDA operating conditions for the determination of levulinic acid

Instrument	Conditions
Column	YMC C30 Column (150 mm × 4.6 mm, 3 µm)
Column temp.	30 °C
Mobile phase	0.1 % formic acid-water/acetonitrile (97/3, v/v)
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector
Wavelength	270 nm
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	10 µL
Run time	20 min

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC 분석조건 확인

Levulinic acid에 대한 최적 분석 파장을 선택하기 위해서 210 nm에서 400 nm까지 HPLC-PDA로 스캔한 결과, 266 nm가 최대흡수파장(λ_{max})로 확인되어 270 nm를 분석파장으로 선택하였다(Fig. 1). 이동상으로는 증류수와 acetonitrile 혼합용매를 사용하였으며, 97/3(v/v)의 isocratic 조건에서 levulinic acid의 우수한 분리능을 확인할 수 있었으며, 8 분대에서 안정적인

머무름 시간을 확인하였다. Chen 등⁹에 의하면 levulinic acid를 210 nm, Sano 등의 연구¹⁰에서는 430 nm에서 분석하였다고 보고하여 본 연구 결과와는 다소 상이하게 나타났다. 반면 Bevilaqua 등의 연구⁷에서는 270 nm에서 최대파장을 나타내어 본 연구 결과와 일치하였다.

3.2. 추출 및 정제과정의 확립

분석 대상 성분의 최적 추출 용매를 선택하는데 있어서 용해도와 극성도는 매우 중요한 요인이 된다. 또한 시료에 함유된 분석 성분의 최적 추출효율을 확인

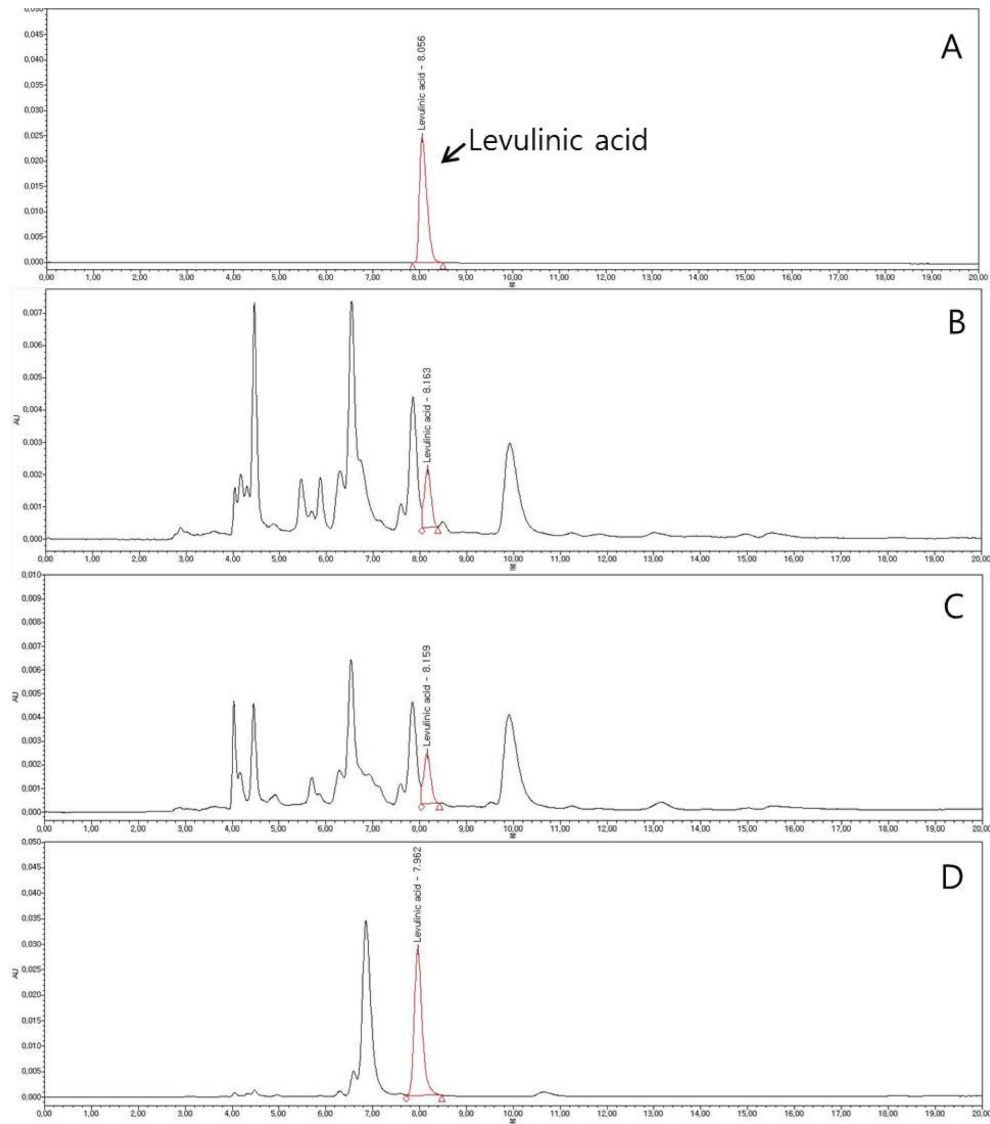


Fig. 2. Chromatogram of levulinic acid at A; levulinic acid 400 μ g/mL, B; soy sauce, C; soy sauce based sauce, D; seasoned meat.

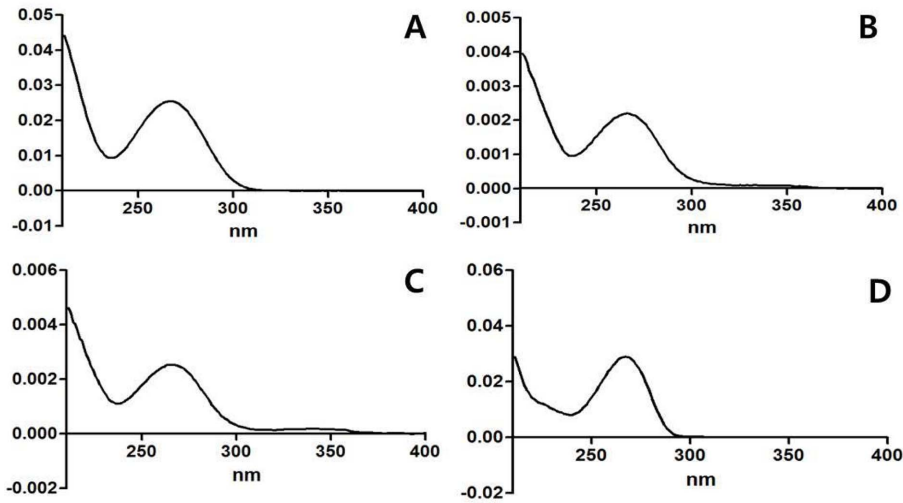


Fig. 3. HPLC-PDA spectrum of A; levulinic acid, B; soy sauce, C; soy sauce based sauce and seasoned D; meat.

Table 2. Results of equation, LOD and LOQ for levulinic acid analysis

Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression equation		R	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
	Slope	Intercept			
2.5-400	671.904	-5553.542	0.999	0.64	1.93

하기 위해서는 매트릭스 효과(matrix effect)에 대한 방해물질 영향도 고려해야 한다. 따라서 본 연구에서는 기존 문헌을 바탕으로 levulinic acid를 추출하는 최적 용매로 증류수를 선정하였다.^{5-7,9,10} 정제는 간섭물질을 제거하기 위한 과정이며, 이 과정에서의 용매의 선택에서는 분석성분에 대한 더 높은 선택성을 요구한다. 본 분석법에서는 비극성물질을 잘 흡착하는 특성을 가지는 C18을 선택하였으며, 이러한 특성을 통해 matrix에서 색소, 단백질 및 지방산류와 같은 간섭물질과 비극성물질을 효과적으로 제거할 수 있었다.

3.3. 특이성 확인

특이성은 시료에 불순물, 분해물 등이 혼재된 상태에서 분석하고자 하는 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 각 시험방법의 목적에 맞는 방법으로 확인하게 된다. 표준용액인 levulinic acid와 간장, 소스류 및 양념육에서 추출한 용액의 chromatogram을 비교하여 확인한 결과, Fig. 2와 같이 다른 물질의 간섭 없이 추출물의 levulinic acid가 분리되었으며 표준용액의 peak 머무름 시간과 추출물의 머무름 시간이 일치하였다. 또한 표준용액과 시료 추출액의 PDA

스펙트럼을 비교한 결과에서도 동일한 스펙트럼을 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인하였다(Fig. 3).

3.4. 표준곡선의 직선성, 상관계수, 검출한계 및 정량한계 확인

Levulinic acid 표준용액은 증류수를 이용하여 2.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 으로 단계적으로 희석하여 위의 제시한 HPLC 조건으로 분석하였다. 분석결과 levulinic acid의 상관계수(R)는 0.999로 우수한 직선성을 나타내었다. 검출한계는 검체 중 존재하는 분

Table 3. Precision of levulinic acid analysis

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)		Recovery ¹⁾ (%)
		Inter-day	Intra-day	
Levulinic acid	2.5	10.86	1.40	95.03 \pm 7.30
	25	3.02	2.15	87.58 \pm 2.53
	50	5.25	5.67	89.28 \pm 4.26
	100	3.44	5.70	88.56 \pm 1.53
	200	5.45	5.69	93.33 \pm 5.86
	400	5.29	2.28	97.26 \pm 3.21

¹⁾Mean values of three replicate with standard deviation.

Table 4. Monitoring of levulinic acid in soy sauces

Food type	No.	Analysis conc. ¹⁾ (mg/mL)	Remarks
Soy sauce	1	ND ²⁾	BSS ³⁾ 100 %
	2	ND	BSS 100 %
	3	ND	BSS 100 %
	4	ND	BSS 100 %
	5	ND	BSS 100 %
	6	ND	BSS 100 %
	7	ND	BSS 100 %
	8	ND	BSS 100 %
	9	1.23 ± 0.03	BSS 30 %, AHSS ⁴⁾ 70 %
	10	1.16 ± 0.03	BSS 10 %, AHSS 90 %
	11	0.71 ± 0.01	BSS 30 %, AHSS 70 %
	12	1.17 ± 0.07	BSS 30 %, AHSS 70 %
	13	0.82 ± 0.01	BSS 30 %, AHSS 70 %
	14	1.17 ± 0.01	BSS 20 %, AHSS 80 %
	15	0.76 ± 0.01	BSS 20 %, AHSS 80 %
	16	0.45 ± 0.01	BSS 50 %, AHSS 50 %
	17	0.64 ± 0.01	BSS 20 %, AHSS 80 %
	18	ND	BSS
	19	0.59 ± 0.01	BSS 17 %, AHSS 83 %
	20	0.46 ± 0.01	BSS 5 %, AHSS 95 %
	21	0.53 ± 0.01	BSS 30 %, AHSS 70 %
	22	0.46 ± 0.03	BSS 10 %, AHSS 90 %
	23	0.76 ± 0.03	BSS 20 %, AHSS 80 %
	24	0.75 ± 0.02	BSS 10 %, AHSS 90 %
	25	0.44 ± 0.01	BSS 10 %, AHSS 90 %
	26	0.58 ± 0.05	BSS 5 %, AHSS 95 %
	27	ND	BSS

¹⁾Mean values of three replicate with standard deviations.

²⁾ND: Not detected

³⁾BSS: Brewed soy sauce

⁴⁾AHSS: Acid hydrolyzed soy sauce

석대상물질을 검출 가능한 최저한계를 의미하며, 정량 한계는 분석대상물질을 정량값으로 표현할 수 있는 최소량을 의미한다. Levulinic acid의 검출한계와 정량 한계는 각각 0.64, 1.93 µg/mL로 측정되었다(Table 2).

3.5. 정밀성 확인 및 정확성 확인

정밀도는 검체를 정해진 조건에서 분석하여 얻은 측정값들의 근접성을 의미하며, 상대표준편차(relative standard deviation, RSD %)를 이용하여 나타내었다. Levulinic acid의 정밀도는 2.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL의 농도를 첨가하여 3반복으로 수행하였으며, Table 3와 같이 일간(inter-day) 정밀도에서 각각 3.02-10.86 %를 나타내었고, 일내(intra-day) 정밀도에서는

1.40-5.70 %로 나타났다. 정확성은 회수율을 측정하여 나타내었으며 농도를 알고 있는 간장 시료에 표준용액을 각각 6 가지 농도로 첨가한 뒤 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 확인하였다. Table 3와 같이 levulinic acid는 첨가된 농도 2.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL에 따라 각각 87.58-97.26 %의 회수율을 나타내었다. Codex 가이드라인에서 권장하는 회수율 70-120 % 미만 및 분석오차 20 % 미만에 충족하는 결과를 나타내어 분석법으로서 적합함을 확인하였다.

3.6. 시료 중 levulinic acid 함량 조사

전국에서 유통되고 있는 간장, 소스류 및 양념육을 대상으로 59건을 수거하여 levulinic acid를 분석한 결과는 Table 4와 같다. 총 59건 중 43건에서 levulinic acid가 검출되어 72.8 %의 검출율을 나타내었다. 시료 유형별로는 간장에서 17건이 검출되었으며 검출범위는 0.44-1.23 mg/mL이었고, 검출된 시료의 표시사항에서 산분해간장이 함유되어있음을 확인하였다. Jurado-Sánchez 등의 연구¹¹⁾에서는 간장시료 2 종의 levulinic acid 함량이 48-52 mg/kg으로 보고되어 본 연구의 결과보다 매우 낮은 수치를 나타내었다. Sano 등의 연구결과¹⁰⁾ 의하면 100 % 자연양조간장(naturally brewed soy sauces)에서는 levulinic acid가 검출되지 않았으며, HVP가 혼합된 간장에서는 2.98-21.66 mg/mL의 함량이 검출되어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 혼합간장에서 산분해간장 혼합비율은 50-90 %이었으며, 산분해간장 혼합비율에 따른 levulinic acid의 함량은 산분해간장이 50 % 이하의 경우 평균 0.45 mg/mL, 70 % 이하에서 0.89 mg/mL, 85 % 이하에서 0.78 mg/mL, 95 % 이하에서 0.64 mg/mL로 산분해간장 혼합비율에 따라 levulinic acid의 함량이 비례하여 증가하지는 않았다. 유사하게 송 등의 연구결과¹²⁾에서도 산분해간장 생산과정에서 형성되는 3-MCPD의 함량이 혼합비율과 비례하지 않음을 보고하였다. 이는 각 식품업체마다 산분해간장 제조 시 사용되는 염산, 중화제 등의 비율이 다르기 때문으로 사료된다.

소스류의 경우 20건 중에서 16 건이 검출되었고 검출범위는 0.03-0.83 mg/mL로 나타났으며, 검출된 시료에는 혼합간장, 진간장, 자연콩 발효액 및 아미노산액이 함유되어있는 것으로 확인되었다. 최근 기호성과 편의성을 증진시킨 새로운 형태의 가공제품이 많이 판매되고 있으며, 대형마트에서 식육에 간장 등의 양념을 넣어 채워 가공한 양념육이 진열되어 있는 것을 쉽게 볼 수 있다. 그러나 양념육의 경우 식육의 원산지 표시는 되어 있으나 양념에 포함된 재료에 대한

Table 5. Monitoring of levulinic acid in soy sauce based sauces and seasoned meats

Food type	No.	Analysis conc. ¹⁾ (mg/mL)	Remarks
Soy sauce based sauce	1	0.05 ± 0.00	BSS ³⁾ 40 %
	2	0.23 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	3	0.21 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	4	0.21 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	5	0.05 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	6	0.05 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	7	0.09 ± 0.00	Contain mixed soy sauce
	8	0.08 ± 0.00	Contain thick soy sauce 15.38 %
	9	0.03 ± 0.01	Contain concentrated soy sauce
	10	0.04 ± 0.00	Contain naturally fermented soy sauce
	11	0.03 ± 0.00	Contain amino acid solution
	12	ND ²⁾	Contain soy sauce 51.84 %
	13	ND	Contain defatted soybean
	14	ND	Contain soy sauce 84 %
	15	ND	Contain BSS
	16	0.83 ± 0.03	Contain mixed soy sauce
	17	0.30 ± 0.02	Contain mixed soy sauce
	18	0.28 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	19	0.31 ± 0.01	Contain mixed soy sauce
	20	0.11 ± 0.02	Contain thick soy sauce 25 %, AHSS ⁴⁾ 37 %
Seasoned meat	21	ND	
	22	10.87 ± 0.83	
	23	38.94 ± 3.98	Contain amino acid solution
	24	13.01 ± 0.09	
	25	22.54 ± 0.65	
	26	8.43 ± 0.30	
	27	13.48 ± 0.79	
	28	16.88 ± 0.62	
	29	ND	
	30	16.44 ± 2.23	
	31	20.64 ± 4.12	
	32	12.41 ± 1.05	

¹⁾Mean values of three replicate with standard deviations.

²⁾ND: Not detected

³⁾BSS: Brewed soy sauce

⁴⁾AHSS: Acid hydrolyzed soy sauce

자세한 표시가 되어있지 않은 경우가 많다. 본 연구에 사용된 양념육의 경우에도 12건 중 1건(Table 5, No. 23)에서만 소스에 대한 정보가 표기되어 있었다. 양념육에서의 levulinic acid를 분석한 결과, 양념육에서는 12건 중 10건이 검출되었으며 검출범위는 8.43-38.94 mg/mL로 평균함량은 17.36 mg/mL로 나타났다. 이 중 표시사항이 나타나있는 No. 23의 경우 아미노산액이 함유되어있음을 확인하였다(Table 5).

양념육에서의 levulinic acid 평균 검출함량은 간장

의 평균 검출함량 0.74 mg/mL 보다는 약 23 배, 소스류의 평균 검출함량 0.18 mg/mL 보다는 약 90 배 높은 함량으로 나타났으며, 이는 양념육에 산분해간장이 혼합된 혼합간장을 사용한 것으로 판단된다. 산분해간장에 포함된 3-MCPD, DCP와 같은 유해물질은 유전독성, 생식독성, 신경독성 등 오랜기간 독성 연구가 보고되고 있으며,¹²⁻¹⁸ 국내에서는 산분해간장 및 혼합간장에서 3-MCPD를 0.3 ppm이하로 규제하고 있다. 그러나 산분해간장 및 혼합간장이 사용된 가공식품에

대해서는 3-MCPD에 대한 규제가 없으며, 양념육에서 산으로 단백질을 가수분해 할 때 생성되는 levulinic acid의 함량이 높게 나타난 것으로 보아 3-MCPD의 함량도 높을 것으로 사료되며, 보다 넓은 범위의 식품에서 규제가 필요할 것으로 판단된다. 또한 levulinic acid도 안전성이 확실히 밝혀진 성분이 아니기 때문에 지속적인 모니터링을 통한 관리가 필요하다고 생각되며, 가공식품의 명확한 원료 표시를 통하여 국민의 건강과 알 권리를 보호해야한다.

4. 결 론

본 연구에서는 levulinic acid의 분석법을 확립하여 보다 신속하고 정확한 분석을 통해 산분해간장 및 HVP 혼입여부에 대해 효율적으로 관리하고자 하였다. 검체의 전처리는 증류수로 추출하고 Sep-pak C18을 이용하여 정제한 다음 HPLC-PDA로 분석하였다. 분석과장은 최대흡수파장인 270 nm로 선택하였으며, 이동상은 0.1% formic acid가 포함된 증류수와 acetonitrile을 97/3(v/v)의 비율로 혼합하여 사용하여 등용매법(isocratic)으로 분석하였다. Levulinic acid의 직선성을 확인한 결과 상관관계수 0.999로 나타났으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.64, 1.93 µg/mL로 확인되었고, 회수율은 87.58-97.26%의 범위로 나타났다. 확립된 분석법을 통하여 국내 시판 중인 간장, 소스류 및 양념육의 모니터링을 실시한 결과 총 59 건 중 43 건에서 levulinic acid가 검출되었으며 검출 범위는 0.03-38.94 mg/mL로 나타났다. 본 연구에서 확립된 시험법은 levulinic acid를 신속, 정확하게 분석할 수 있는 적합한 분석방법임이 검증되었으며, 국내 시판 중인 간장, 소스류 및 양념육의 산분해간장 및 HVP의 혼입여부 등 식품의 품질 및 안전관리를 위해 적용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 과학기술정보통신부 재원으로 한국식품연구원의 지원(ER160400-02)을 받아 수행된 연구 성과입니다.

References

1. C. H. Manley and I. S. Fagerson, *J. Food. Sci.*, **35**(3), 286-291 (1970).
2. I. Baer, B. de la Calle and P. Taylor, *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**(1), 443-456 (2010).
3. S. Hasnip, C. Crews, N. Potter, P. Brereton, H. Diserens and J. M. Oberson, *J. AOAC. Int.*, **88**(5), 1404-1412 (2005).
4. Japanese Agricultural Standards (JAS) Association, Index of inspection on food sanitation II category of food, 67-68 (1978).
5. R. Xie, M. Tu, Y. Wu and S. Adhikari, *Bioresour. Technol.*, **102**(7), 4938-4942 (2011).
6. M. H. Yang and Y. M. Choong, *Food Chem.*, **75**(1), 101-108 (2001).
7. D. B. Bevilaqua, M. K. Rambo, T. M. Rizzetti, A. L. Cardoso and A. F. Martins, *J. Clean. Prod.*, **47**, 96-101 (2013).
8. Guideline for the validation drug analysis procedure (Ministry of food and Drug Safety B1-2012-2-013, 2012).
9. S. F. Chen, R. A. Mowery, V. A. Castleberry, G. P. van Walsum and C. K. Chambliss, *J. Chromatogr. A*, **1104**(1), 54-61 (2006).
10. A. Sano, T. Satoh, T. Oguma, A. Nakatoh, J. I. Satoh and T. Ohgawara, *Food. Chem.*, **105**(3), 1242-1247 (2007).
11. B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros and E. M. Gallego, *Talanta*, **84**(3), 924-930 (2011).
12. H. S. song and B. M. Lee, *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**(2), 191-194 (2002).
13. S. J. Stolzenberg and C. H. Hine, *J. Toxicol. Environ. Health. A*, **5**(6), 1149-1158 (1979).
14. M. G. Kim, Y. S. Kim, M. J. Lee, J. K. Kim, K. A. Kim, E. M. Park, H. U. Ko and J. S. Son, *J. Food Hyg. Safety*, **21**, 153-158 (2006).
15. B. M. Lee, *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 1-11 (2002).
16. J. A. Coppola, *Life. Sci.*, **8**, 43-48 (1969).
17. G. F. Pez and Z. T. Homonnai, *Int. J. Androl.*, **5**, 308-316 (1982).
18. Y. Ban, U. Asanabe, S. Inagaki, M. Sasaki, T. Nakatsuka and H. Matsumoto, *J. Toxicol. Sci.*, **24**, 407-413 (1999).
1. C. H. Manley and I. S. Fagerson, *J. Food. Sci.*, **35**(3),