

## HPLC-ELSD와 LC/MS를 활용한 건강기능식품 중 글루콘산철 최적 분석법 확립 및 검증

박영주<sup>1</sup> · 정소연<sup>1</sup> · 서현지<sup>1</sup> · 이지현<sup>2</sup> · 이 찬<sup>2</sup> · 서희재<sup>1</sup>

<sup>1</sup>선문대학교 식품과학과, 식품바이오 융합연구소  
<sup>2</sup>중앙대학교 식품공학부

### Establishment and Validation of an Optimized Analytical Method for Ferrous Gluconic Acid in Health Functional Foods Using HPLC-ELSD and LC/MS

Yeongju Park<sup>1</sup>, Soyeon Jeong<sup>1</sup>, Hyunji Seo<sup>1</sup>, Jihyun Lee<sup>2</sup>, Chan Lee<sup>2</sup>, and Hee-Jae Suh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Food and Bio Conversion, Department of Food Science, Sun Moon University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

**ABSTRACT** Ferrous gluconate has been used in Korea, the United States, Japan, and the European Union to control the acidity in foods. We optimized an analytical method to determine the levels of ferrous gluconate in foods by a high-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) and an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). The linearity of the developed analysis method using HPLC was excellent with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.999 obtained from calibration curve, and limits of detection and quantitation were 12.8  $\mu\text{g/mL}$  and 38.9  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. In intra-day and inter-day analysis, the accuracy was 95.6~101.5% and 98.6~103.1%, respectively, and the precision was 1.5~2.6% and 0.7~2.9%, respectively. The measurement uncertainty of analyzing the health functional food samples was within 3%, and the verification results of all analytical methods met the standards of the European Commission (EC). UPLC-MS was also used to confirm ferrous gluconate. As a result, the field applicability of the ferrous gluconate analytical method developed in this study was confirmed.

**Key words:** ferrous gluconic acid, acidity regulator, HPLC-ELSD, UPLC-MS, analytical method

## 서 론

글루콘산철(ferrous gluconate)은 철과 두 분자의 글루콘산이 결합한 글루콘산염으로(Fig. 1) 주로 글루콘산나트륨(또는 글루콘산바륨, 글루콘산칼슘)을 황산제일철로 반응시켜 제조한다. 황회색~녹황색의 결정형 분말로 탄 캐러멜과 유사한 냄새를 띠며, 결정질 상태에서는 공기 중에서 안정적이지만 수용액의 경우는 빛에 민감하다. 물에는 잘 용해되어 20°C에서 물 100 cm<sup>3</sup>에 8.5 g의 용해력을 갖는 데 반해, 알코올 및 에테르에는 불용성을 나타낸다(Nikolić 등, 2014).

우리나라에서는 글루콘산철이 산도조절제 및 영양강화제의 용도로 허용되어 있으며, 건강기능식품, 조제유류, 영아용 조제식, 올리브가공품이 그 사용대상 식품이다(Ministry

of Food and Drug Safety, 2019). 건강기능식품 등 3품목에 대해서는 국내의 사용기준이 설정되어 있지 않으며, 주로 영양 강화의 목적으로 사용된다. 올리브가공품의 경우는 우리나라, CODEX, EU(European Union), 일본에서 철로써 150 mg/kg 이내로 사용하도록 설정되어 있으며, 캐나다에서는 적정제조기준(Good Manufacturing Practice, GMP)으로 사용량이 설정되어 있다(MFDS, 2019; Codex Alimentarius, 2019; European Commission, 2008; The Japan Food Chemical Research Foundation, 2021; Government of Canada, 2017).

국제식량농업기구/세계보건기구 합동식품첨가물전문가위원회(Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA)에 의하면 글루콘산철의 일일최대섭취허용량(acceptable

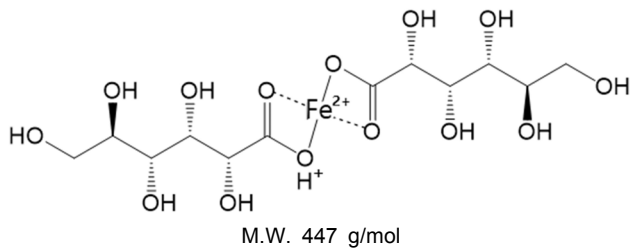
Received 9 May 2021; Revised 11 June 2021; Accepted 23 June 2021

Corresponding author: Hee-Jae Suh, Department of Food Science, Sun Moon University, 70, Sunmoon-ro 221beon-gil, Tangeong-myeon, Asan-si, Chungnam 31460, Korea, E-mail: suhj@sunmoon.ac.kr

Author information: Yeongju Park (Graduate student), Soyeon Jeong (Graduate student), Hyunji Seo (Graduate student), Jihyun Lee (Professor), Chan Lee (Professor), Hee-Jae Suh (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Fig. 1.** Structure of ferrous gluconate.

daily intake, ADI)은 0.8 mg/kg으로 설정되어 있으며 rat과 mouse에 대한 과반치사량(LD<sub>50</sub>)은 각각 2,237 mg/kg, 3,700 mg/kg으로 보고되고 있다(Lewis, 1996; Merck Research Laboratories, 2001). 철은 인간의 생명 유지에 꼭 필요한 무기질로 부족 시에는 빈혈 등 치명적인 부족증이 나타나게 되지만, 철과 칼슘을 동시에 과도한 수준으로 섭취할 경우 신장 기능을 저하시킬 수 있으며(Lee와 Lee, 2000), 11개월 영아가 철 함유 제제를 과량 복용할 경우 혼수상태에 빠질 수도 있다는 연구도 보고되었다(Mann 등, 1989). 따라서 글루콘산철의 과량 섭취로 인한 독성을 예방하기 위해 이에 대한 안전사용 관리가 필요하다.

식품 중 글루콘산철의 함량을 분석하는 공인분석법은 국내외에 모두 존재하지 않으며 일부 연구자들에 의해 매우 미미하게 연구되었다. Qin(2013)은 빈혈치료제로부터 글루콘산철을 분석하기 위해 고속액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 시스템과 자외선-가시광선 검출기(ultraviolet-visible, UV-vis)를 이용하여 510 nm에서 분석하였으나 20 mg/kg 미만의 저농도에 대한 검출범을 보고한 것으로써, 20 mg/kg 이상 함유된 글루콘산철 분석에 적용하기에는 한계가 있다. Nikolić 등(2014)도 자외선-가시광선 검출기와 Zorbax Eclipse XDP C<sub>18</sub> 컬럼을 이용하여 아세트니트릴과 물(80:20)을 이동상으로 205 nm에서 글루콘산철 합성품에 대한 HPLC 분석법을 보고하였으나, 머무름 시간이 1.23분으로 매우 빨랐고 타당성을 검증하지 않았으므로 이 분석법의 정확도를 판단하기는 어렵다. 상기의 두 연구를 제외하고는 식품 시료로부터 글루콘산철을 추출하여 정량 분석법을 보고한 연구는 현재까지 전무하다.

본 연구에서는 글루콘산철의 선행 분석법을 검토한 후 HPLC를 이용한 최적의 분석조건과 식품 중 글루콘산철의 전처리 방법을 확립함과 동시에 확립된 분석법의 검출한계, 정량한계, 직선성, 정밀도, 정확도 등을 평가하므로 타당성을 검증하였다. 또한 LC-MS를 사용하여 글루콘산철의 검증을 실시하므로 일선 분석기관에서 사용할 수 있는 공인분석법의 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 시액

글루콘산철(ferrous gluconate)의 표준품(EP reference standard)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, HPLC 이동상 제조 및 시료 전처리를 위한 물, 아세트니트릴, 메탄올, 트리플루오로아세트산은 Sigma-Aldrich와 Alfa Aesar(Boston, MA, USA)에서 HPLC grade를 구입하여 사용하였다. 시료 전처리에 사용된 0.2 µm PVDF filter는 Whatman(Maidstone, England)에서 구입하여 사용하였다.

### 표준용액의 제조

글루콘산철(순도 100%) 100 mg을 정밀히 취하여 물(HPLC grade)에 녹여 1,000 µg/mL로 표준원액을 제조한 후 필요한 농도에 맞춰 희석하여 사용하였다. 검량선 작성을 위한 표준용액으로는 100~1,000 µg/mL 농도로 희석한 것을 사용하였다.

### 분석 장비 및 기기

글루콘산철의 정량분석을 위해 HPLC Agilent Technologies 1260 system(Agilent, Santa Clara, CA, USA), HyperClone™ ODS column(5 µm, 250 mm×4.6 mm, Torrance, CA, USA), Viva C<sub>4</sub> column(5 µm, 150 mm×4.6 mm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA), Zorbax SB C<sub>18</sub> column(5 µm, 150 mm×4.6 mm, Agilent)을 사용하였다. 글루콘산철의 피크 검증을 위해서는 UPLC-MS(Synapt G2-S, Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, USA), Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> column(1.7 µm, 100 mm×2.1 mm, Waters)을 사용하였다.

### 분석 장비 기기 HPLC-ELSD 및 LC-MS 분석법 확립

글루콘산철의 정량분석 조건을 확립하기 위해 Qin(2013)와 Nikolić(2014)의 분석법을 검토한 후 분석 컬럼 및 이동상을 수정하여 method 1~3의 분석조건을 선정하였다(Table 1). Qin(2013)의 연구에서는 UVD를 사용한 것 외에 자세한 분석법이 보고되지 않았으므로, Nikolić(2014)이 보고한 방법에 따라 UVD(200 nm)와 Zorbax C<sub>18</sub> 컬럼을 사용하여 이동상만 조금 변형한 method 1의 방법을 설정하였다. 또한, 컬럼의 pore size 및 제조사를 변경하여 Viva C<sub>4</sub> 컬럼(method 2)과 HyperClone ODS 컬럼(method 3)을 사용하고 이동상(트리플루오르아세트산-TFA, 아세트니트릴-ACN)의 농도 및 용리 조건을 변형한 후 ELSD로 분석하는 방법으로 method 2와 method 3을 선정하였으며(Table 1), 세 가지 분석법에 따른 결과를 비교하여 최적의 분석법을 확립하였다.

또한 글루콘산철의 피크를 검증하기 위해 UPLC-MS(Synapt G2-S, Acquity UPLC, Waters)와 UPLC® BEH C<sub>18</sub> 컬럼(1.7 µm, 2.1 i.d.×100 mm)을 이용하여 예비실험을 진행하였다. 예비실험에서 0.1% TFA와 ACN을 이동상으로 사용하였으며, 다양한 용매 기율기 조건을 적용하여

**Table 1.** HPLC analytical conditions for ferrous gluconate

	Method 1	Method 2	Method 3
Instrument		Agilent 1260 HPLC	
Column	Zorbax SB C <sub>18</sub> (5 µm, 150 mm×4.6 mm)	Viva C <sub>4</sub> (5 µm, 150 mm×4.6 mm)	HyperClone™ ODS (5 µm, 250 mm×4.6 mm)
Mobile phase	Acetonitrile : 1% Phosphoric acid (90:10)	0.7% Trifluoroacetic acid : Acetonitrile (91:9)	1.3% Trifluoroacetic acid : Acetonitrile (95:5)
Flow rate	1.0 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
Column temp.	40°C	25°C	25°C
Detector	Agilent 1260 Diode array detector	Agilent 1260 ELSD	Agilent 1260 ELSD
Wavelength	200 nm	—	—
ELSD temp.	—	115°C	115°C
Injection vol.	10 µL	10 µL	10 µL
Running time	10 min	10 min	10 min

**Table 2.** LC-MS analytical condition for ferrous gluconate

Instrument	UPLC-MS (Waters Synapt G2-S, Acquity UPLC)		
Column	Acquity UPLC® BEH C <sub>18</sub> column (1.7 µm, 100 mm×2.1 mm)		
Mobile phase	(A) 0.1% Trifluoroacetic acid, (B) Acetonitrile		
	Time (min)	%A	%B
Gradient	Initial	0.0	100.0
	4.00	20.0	80.0
	12.00	0.0	100.0
Flow rate	0.3 mL/min		
Column temp.	60.0°C		
Detector	PDA&QTOF MS		
Detection mode	TOF (time of flight)		
	Electrospray Ionization		
	Polarity		ESI <sup>+</sup>
Ion source	Capillary (kV)		3.0
	Source temp. (°C)		120
	Desolvation temp. (°C)		300
	Desolvation gas flow (L/min)		600
Injection vol.	5.0 µL		
Running time	12 min		

가장 뚜렷한 피크를 보인 조건을 바탕으로 Table 2의 방법을 확립하였다.

### 시료 전처리법 확립

글루콘산철은 물에 용해되는 특성이 있으므로 물과 이동상 제조에 사용하는 용매(TFA, ACN)를 이용하여 추출용매 및 추출시간에 따른 글루콘산철의 추출효율을 비교하였다. 정확한 용해능을 비교하기 위해 Fig. 2와 같이 글루콘산철이 함유되지 않은 음성시료(건강기능식품) 1 g을 정밀히 취하고 글루콘산철 표준품을 농도가 1,000 µg/mL가 되도록 첨가한 후 전처리법 1~3에 각각 제시된 용매로 추출하였다. 초음파 세척기(UC-20, Lab Companion, Billerica, MA, USA)를 사용하여 10분간 초음파 추출 후 10,000×g로 원심 분리(VS-550, Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)한 추출액을 0.2 µm PVDF filter(Whatman)로 여과하여 본 연구에서 확립한 HPLC-ELSD 분석법을 사용하여 분석하였

다. 분석 결과를 비교하여 추출률이 가장 높은 방법을 최적의 시료 전처리법으로 확립하였다.

### 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계

HPLC 분석법의 특이성을 확인하기 위해 시료 내에 존재하는 다른 분해물들의 간섭 여부를 검토했으며, 표준품과 시료의 분석 크로마토그램에서 분리도와 머무름 시간을 확인하였다. 직선성을 확인하기 위해서는 글루콘산철 표준용액을 100, 300, 500, 700, 1,000 µg/mL 농도로 제조하여 얻은 크로마토그램으로부터 면적과 농도 데이터를 이용하여 검량선을 작성하고 산출된 결정계수(R<sup>2</sup>)를 확인하여 직선성을 검토하였다. 검출한계와 정량한계의 경우 100, 200, 300 µg/mL로 제조된 표준용액을 이용하여 작성된 검량선의 기울기와 중간 농도(200 µg/mL) 7회 분석값으로부터 y 절편의 표준편차를 얻었으며, ICH Harmonised Tripartite Guideline에서 제안한 식 (1)에 의해 검출한계(limit of de-

tection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 산출하였다. 또한 식품시료(건강기능식품)에 위와 동일한 농도의 글루콘산철 표준용액을 첨가하여 매트릭스 기반 검량선(matrix based calibration curve)을 구하였으며, 직선성, LOD, LOQ를 산출해봄으로써 매트릭스의 영향을 검토하였다(EMEA, 2006).

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma / S \quad (1)$$

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

$\sigma$ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

### 정확도 및 정밀도

정확도는 식품 매트릭스(건강기능식품)에 최종 농도가 100, 300, 500, 700, 900  $\mu\text{g/mL}$  되도록 글루콘산철 표준용액을 스파이크(spike)한 후 하루 동안 다섯 번 분석하는 일내분석(intra-day)과 사흘에 걸쳐 하루에 한 번씩 분석하는 일간분석(inter-day) 결과들의 분석값과 이론값을 비교하여 백분율로 산출하였고, 정밀도는 그 분석값의 상대표준편차(RSD)를 구하여 검증하였다.

### 측정불확도

글루콘산철 최적 분석방법의 측정불확도 산출을 위해 GUM(Guide to the expression of uncertainty in measurement)(ISO, 2004)과 EURACHEM(Ellison 등, 2000)에 근거하여 모델식을 설정하였으며, 불확도 요인으로 표준물질, 표준용액 제조, 표준 검량곡선, 시료 전처리, 반복성 등을 선정하고, 선정된 불확도 요인별로 표준불확도 및 유효자유도를 계산하였다. 합성표준불확도는 식 (2)를 이용하여 산출한 각 불확도 요인별 표준불확도를 식 (3)에 대입하여 산

출하였다. 확장불확도는 식 (4)와 같이 합성표준불확도에 포함인자  $k$ 를 곱하여 산출하였다. 이때 포함인자  $k$ 는 신뢰구간 95%에서  $2(k=2)$ 를 사용하였다(ISO, 2004; Ellison 등, 2000; Ministry of Food and Drug Safety, 2017).

$$u(x_i) = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) \quad (3)$$

$$U(y) = k u_c(y) \quad (4)$$

$u$ : standard uncertainty,  $n$ : number of measurements,  $u_c$ : combined standard uncertainty,  $U$ : expanded uncertainty,  $k$ : coverage factor

### 실험실 간 교차검증

개발된 최적 분석법의 재현성 확보를 위해 서로 다른 두 기관의 실험실에서 동일한 농도 및 조건으로 제조된 시료들을 분석하여 실험실 간 교차검증을 진행하였다. 글루콘산철의 사용 가능 식품인 건강기능식품에 200, 400, 600, 800, 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도가 되도록 표준용액을 첨가하여 본 연구에서 확립된 전처리법을 이용해 전처리 후 Table 1의 조건으로 분석하고 회수율을 산출하였다. 산출된 회수율의 실험실 간 상대표준편차(RSD %)를 구하여 실험실 간 교차검증을 수행하였다.

### 국내 유통식품 모니터링 진행

국내에서 유통되는 글루콘산철이 사용된 건강기능식품 4종과 글루콘산철이 사용되지 않은 건강기능식품 1종을 구입하여, 본 연구를 통해 개발된 글루콘산철의 최적 분석방법과

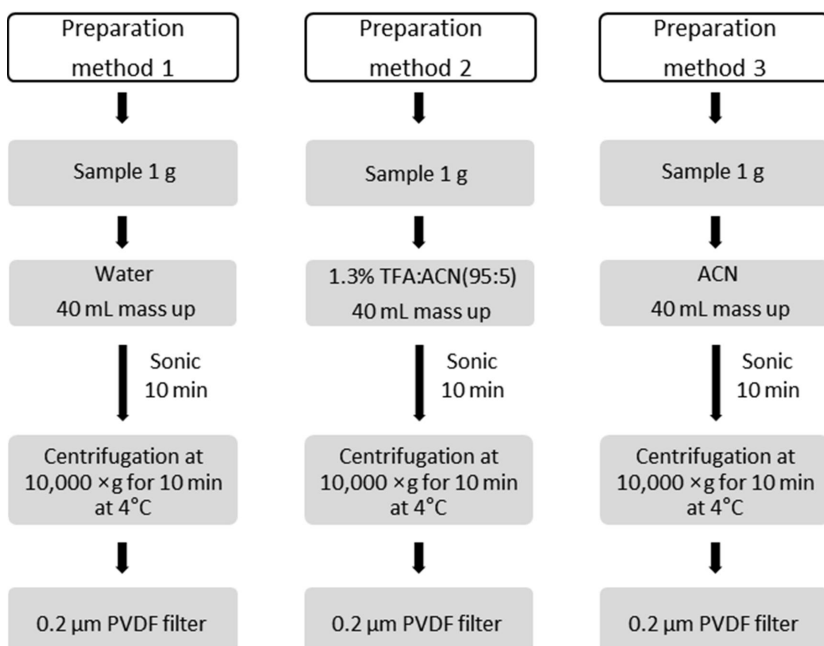


Fig. 2. Sample preparation methods of ferrous gluconate for HPLC-ELSD analysis.

전처리법을 적용하여 분석을 진행하였다.

표준편차를 계산하였다.

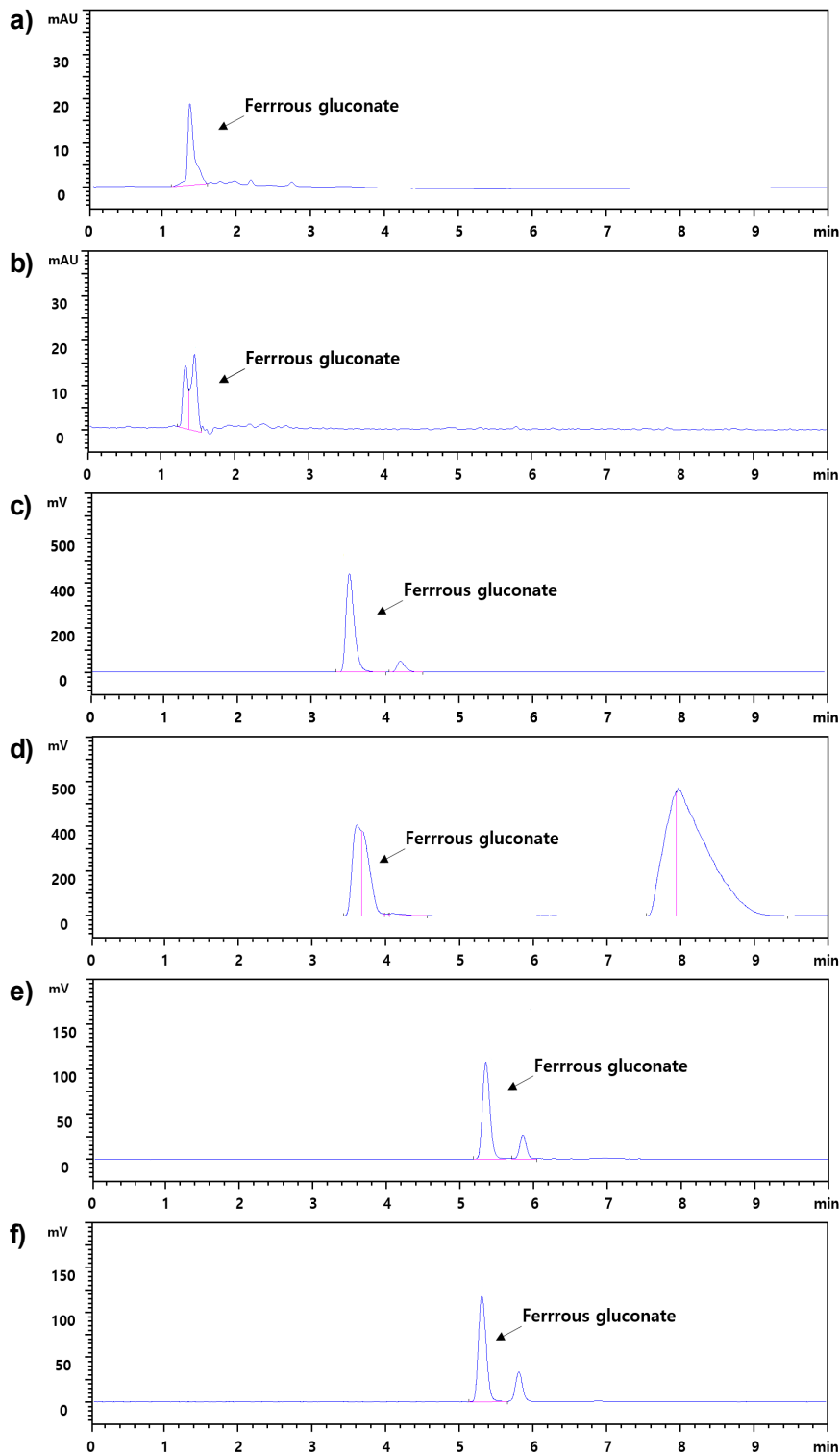
### 통계분석

본 연구에서 글루콘산철의 분석은 모두 3~5 반복으로 수행되었으며, 엑셀 시트(Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA)를 이용하여 산술평균, 표준오차, 표준편차, 상대

### 결과 및 고찰

#### 글루콘산철의 최적 분석법 확립

글루콘산철의 정량분석을 위해 표준용액 1,000 µg/mL를



**Fig. 3.** Chromatograms of ferrous gluconate analyzed by different HPLC method. a) standard of ferrous gluconate (1,000 µg/mL) obtained using method 1, b) spiked standard (1,000 µg/mL) into negative sample obtained using method 1, c) standard of ferrous gluconate (1,000 µg/mL) obtained using method 2, d) spiked standard (1,000 µg/mL) into negative sample obtained using method 2, e) standard of ferrous gluconate (1,000 µg/mL) obtained using method 3, f) spiked standard (1,000 µg/mL) into negative sample obtained using method 3.

제조하고, 시료에 대한 간섭 여부를 확인하기 위하여 글루콘산철이 함유되지 않은 건강기능식품(음성시료)에 글루콘산철 표준물질을 1,000 µg/mL 농도가 되도록 스파이크한 후 Fig. 2의 전처리 조건으로 추출하였다. Table 1에 제시된 세 가지 HPLC 기기 조건에 따라 표준물질과 시료 추출액을 분석한 결과 Fig. 3의 크로마토그램을 얻었다. Qin(2013)의 연구에서 보고된 기기 조건을 일부 수정한 method 1로 표준용액을 분석한 결과는 Fig. 3의 a), 시료 추출물을 분석한 결과는 Fig. 3의 b)로 나타났다. 즉, 시료에서 검출되는 임의의 피크와 글루콘산철 표준물질의 피크가 겹치는 문제를 확인하였다. 이때 Fig. 2에 제시된 전처리 조건별 크로마토그램의 차이는 없었다. Method 2를 이용하여 동일한 방법으로 제조된 표준용액과 시료 추출액을 분석한 결과 Fig. 3c) 및 d)와 같은 크로마토그램을 얻었다. Method 1의 결과보다 표준물질의 검출 정도가 개선되었으나, 여전히 표준물질과 시료에서 얻어지는 임의의 피크가 완전히 분리되지 않았음을 확인하였다. Method 3을 이용하여 동일한 표준용액과 시료 추출액을 분석한 결과는 Fig. 3의 e), f)와 같이 나타났다. 표준물질 피크와 시료로부터 얻어지는 임의의 피크가 서로 분리되었으며, 머무름 시간도 5.2분으로 적절하여 method 3을 글루콘산철의 최적 분석조건으로 확립하고 타당성 검증

을 실시하였다.

글루콘산철의 최적 전처리법을 확립하기 위해 물과 이동상 제조에 사용하는 시약을 이용하여 전처리법 1~3으로 추출하고(Fig. 2) 그 결과를 비교하여 최적 전처리법을 선정하였다. 전처리를 위한 추출용매로 물, ACN, 1.3% TFA와 ACN(95:5) 혼합액을 선정하고 최적의 HPLC 기기 조건(method 3)으로 추출효율을 비교한 결과 회수율은 94.8~101.8%의 범위로 나타났다. 세 방법 모두 국제표준화기구(International Organization for Standardization, ISO)에서 제시한 기준인 70~120%에 부합하였으나(ISO, 1994), 회수율과 반복성이 가장 우수한 전처리법 1(물을 추출용매로 설정)을 최적의 전처리법으로 확립하였다.

**LC-MS 이용한 글루콘산철 분석**

글루콘산철을 Table 2에 제시된 조건으로 UPLC-MS를 이용하여 분석한 결과 Fig. 4와 같은 크로마토그램을 얻었다. 글루콘산철 표준품을 분석한 결과 글루콘산 두 분자에 철 한 분자가 결합한 형태의 글루콘산철(447 g/mol)이 검출되었으며, 이외에도 글루콘산철의 유도체인 D-글루콘산(197 g/mol, D-gluconic acid), D-글루콘산나트륨(219 g/mol, D-gluconic acid-Na) 등도 검출됨을 확인하였다(Fig. 4).

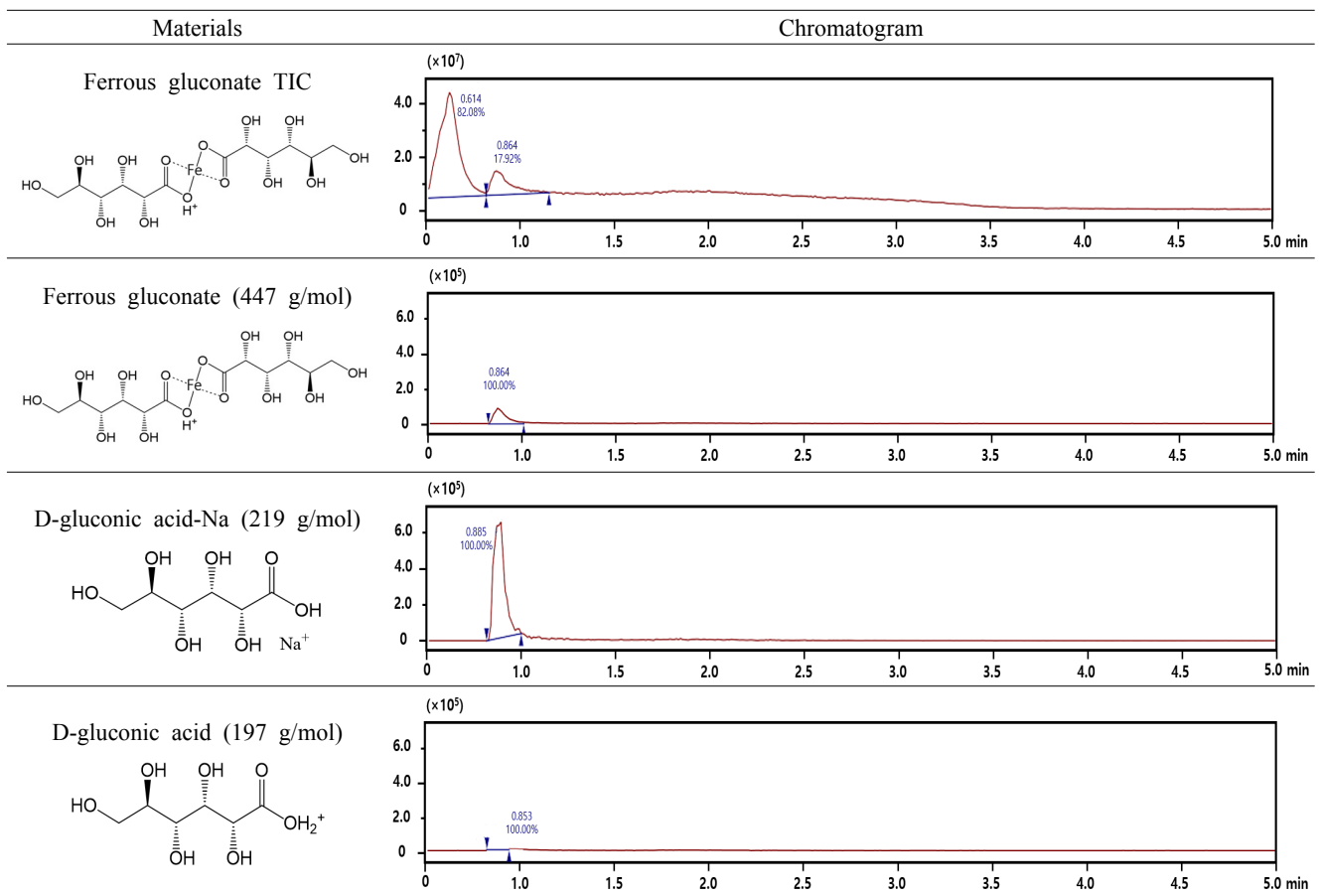


Fig. 4. Chromatograms of ferrous gluconate analyzed by developed UPLC-MS method.

**Table 3.** Correlation coefficient of calibration curves, limit of detection, and limit of quantification of ferrous gluconate

	Concentration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope	Intercept	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Standard curve	100~1,000	1.5803	-101.45	0.9999	12.8	38.9
Matrix based standard curve	100~1,000	0.9607	-65.707	0.9997	11.5	34.7

<sup>1)</sup>LOD means limit of detection.

<sup>2)</sup>LOQ means limit of quantification.

### 특이성

글루콘산철 최적 분석법의 특이성 확인을 위해 표준용액의 크로마토그램(Fig. 3e)과 표준용액을 스파이크한 시료(건강기능식품) 추출액의 크로마토그램(Fig. 3f)을 비교해본 결과, 시료 중에 포함된 각종 추출 성분으로부터 간섭 없이 글루콘산철이 선택적으로 분리되었음을 확인하였다. 또한 표준용액과 시료 추출액에 함유된 글루콘산철의 머무름 시간이 일치하였으며 UPLC-MS 측정 결과로부터 글루콘산철 피크가 검증되었다.

### 직선성, 검출한계 및 정량한계

최적의 분석조건으로 설정된 method 3의 직선성을 검증하기 위해 글루콘산철 표준용액을 100, 300, 500, 700, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 로 제조한 후 method 3을 이용하여 분석한 결과, 검량선의 직선성은  $R^2 > 0.999$ 로 우수한 결과를 보였다(Table 3). 이는 Association of Official Agricultural Chemists(AOAC, 2012)에서 제시한 기준인  $R^2 > 0.99$ 를 충족한 결과이다. 또한 식품 매트릭스(건강기능식품)에 동일한 농도의 글루콘산철 표준용액을 스파이크한 후 method 3으로 분석하여 얻은 매트릭스 기반 검량선의  $R^2$  역시 0.999로 나타나 검량선의 직선성은 매트릭스에 관계없이 우수한 것을 알 수 있었다.

글루콘산철의 표준용액을 100, 200, 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 제조하여 본 연구에서 개발한 최적의 분석법으로 분석한 후 식(1)(EMEA, 2006)을 이용하여 검출한계와 정량한계를 산출한 결과 각각 12.8과 38.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 산출되었으며, 매트릭스(건강기능식품)에 글루콘산철을 첨가한 후 구한 검량

선으로부터 얻은 검출한계와 정량한계는 각각 11.5와 34.7  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Table 3).

### 정밀도 및 정확도

정확도를 측정하기 위하여 건강기능식품에 최종 농도가 100~1,000  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 글루콘산철 표준용액을 스파이크한 후 최적의 HPLC 분석법을 이용하여 분석한 결과, 일내(intra-day) 정확도는 95.6~101.5%, 일간 정확도는 98.6~103.1%로 나타났다(Table 4). 정밀도는 그 분석값의 상대표준편차(RSD)를 구하여 검증하였으며, 일내 정밀도와 일간 정밀도는 각각 1.5~2.6%와 0.7~2.9%로 나타났다(Table 4). 정확도는 국제표준화기구의 기준인 70~120%의 범위에 있었고(ISO, 1994), 정밀도는 유럽연합(EU) 기준인 20% 이하를 충족하였다.

### 측정불확도

글루콘산철 최적 분석법의 측정불확도를 산출한 결과는 Table 5와 같이 나타났다. 측정 농도가 954.7  $\mu\text{g/mL}$ 였을 때 확장불확도( $U^k$ )는 27.73  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 이 값은 합성표준불확도( $U^1$ )인 13.9  $\mu\text{g/mL}$ 와 자유도 10에 대해  $k=2$ 로부터 결정되었고, 이는 95%의 신뢰수준을 갖는 것으로 추정되는 구간을 나타낸다. 유럽연합에서는 측정 농도값이 1 g/kg 이하이면 확장불확도를 측정된 농도 결과로 나눈 값이 11% 이내인 경우를 타당하다고 보고 있으므로(European Commission, 2004), 본 연구 결과(2.9%)는 타당한 분석법으로 인정되는 범위에 있었다.

**Table 4.** Accuracy and precision for ferrous gluconate in functional food

Matrix	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day (n=5)		
		Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)	RSD (%)
Functional food	200	201.8 $\pm$ 3.2	100.9	1.6
	400	406.0 $\pm$ 7.2	101.5	1.8
	600	584.3 $\pm$ 15.4	97.4	2.6
	800	780.9 $\pm$ 13.2	96.9	1.7
	1,000	951.1 $\pm$ 14.3	95.6	1.5
Matrix	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inter-day (n=3)		
		Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)	RSD (%)
Functional food	100	103.1 $\pm$ 0.7	103.1	0.7
	300	297.3 $\pm$ 1.9	99.1	1.9
	500	493.2 $\pm$ 2.6	98.6	2.6
	700	710.2 $\pm$ 1.3	101.5	1.3
	900	896.8 $\pm$ 2.9	99.6	2.9

**Table 5.** Measurement uncertainty (U) obtained for the ferrous gluconate analysis in functional food

Matrix U	U1 <sup>1)</sup>	U2 <sup>2)</sup>	U3 <sup>3)</sup>	U4 <sup>4)</sup>	U5 <sup>5)</sup>	U6 <sup>6)</sup>	U7 <sup>7)</sup>
Functional food	0.00028	0.0051	0.0014	0.0092	0.0078	13.9	27.73

<sup>1)</sup>U1: individual uncertainties of the sample preparation. <sup>2)</sup>U2: reference material. <sup>3)</sup>U3: stock solution.

<sup>4)</sup>U4: calibration curve. <sup>5)</sup>U5: repeatability. <sup>6)</sup>U6: combined standard uncertainty. <sup>7)</sup>U7: expanded uncertainty.

**Table 6.** Result of inter-laboratory test for ferrous gluconate

Matrix	Concentration (µg/mL)	Lab A			Lab B			RSD (%)
		Mean (µg/mL)	SD	Recovery (%)	Mean (µg/mL)	SD	Recovery (%)	
Functional food	200	200.3	1.7	100.2	212.3	4.2	106.1	4.0
	400	403.5	2.1	100.9	451.7	6.0	112.9	7.9
	600	585.7	3.0	97.6	617.8	7.6	103.0	3.8
	800	780.9	1.7	96.5	827.2	0.7	103.4	4.9
	1,000	964.4	0.8	96.4	1,012.0	0.5	101.2	3.4

**Table 7.** Content of ferrous gluconate in commercial functional food

Number of sample	Concentration (µg/mL)
	Mean±SD
1	157.5±0.1
2	33.5±0.0
3	192.5±0.1
4	n.d. <sup>1)</sup>
5	1,522.5±1.5

<sup>1)</sup>n.d. indicates not detected.

### 실험실 간 교차검증

글루콘산철의 HPLC-ELSD 분석법에 대한 재현성 확보를 위해 서로 다른 두 기관의 실험실에서 교차검증을 진행하였다. 글루콘산철 표준물질을 농도별(200, 400, 600, 800, 1,000 µg/mL)로 분석하여 검량선의 R<sup>2</sup>값을 산출한 결과 두 기관 모두에서 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었다. 글루콘산철이 함유되지 않은 건강기능식품에 글루콘산철 표준용액을 스파이크한 뒤 회수율과 기관 간 상대표준편차(RSD %)를 산출한 결과는 Table 6과 같다. 회수율은 식약처 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인에 따라(MFDS, 2016) 매트릭스 기반 검량선에 대입하여 산출되었다. A 기관과 B 기관의 회수율은 각각 96.4~100.9%, 101.2~112.9%로 나타났고, 기관별 상대표준편차는 3.4~7.9%로 확인되었다.

### 국내 유통식품에 분석법 적용

국내에서 글루콘산철의 사용이 허용된 건강기능식품을 5종 선정하여 본 연구에서 개발한 전처리법과 분석법을 적용하여 분석한 결과 글루콘산철의 함량은 n.d.~1,522.5 µg/mL로 확인되었다(Table 7).

## 요 약

본 연구는 국내에서 식품첨가물로 사용되는 산도조절제 글루콘산철(ferrous gluconate)의 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용한 분석법 개발 및 이에 대한 타당성을 검증하기 위해 진행되었다. 글루콘산철의 정량을 위해 증기화 광산란 검출기(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD), 역상 분배형 컬럼(HyperClone™ ODS column)을 사용하였으며, 이동상은 1.3% 트리플루오로아세트산과 아세트오니트릴을 이용하였다. 개발된 분석법의 직선성은 결정계수(R<sup>2</sup>)가 0.999로 우수하였고, 검출한계는 12.8 µg/mL, 정량한계는 38.9 µg/mL로 나타났다. 정확도는 일내분석에서 95.6~101.5%와 일간분석에서 98.6~103.1%로 나타났으며, 정밀도는 일내분석과 일간분석에서 각각 1.5~2.6%와 0.7~2.9%로 나타났다. 또한, 건강기능식품을 시료로 분석한 측정정확도는 954.7 µg/mL 농도에 대해 확장불확도가 27.73 µg/mL로 산출되어 약 3%의 측정정확도 값이 산출되었다. 이 분석법 검증 결과는 유럽연합 집행위원회(European Commission, EC) 및 국제표준화기구(International Organization for Standardization, ISO)의 기준을 모두 충족시키는 결과였다.

## 감사의 글

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처 연구개발비(18162 MFDS009) 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International. Appendix K: guidelines for dietary supplements and botanicals. 2012 [cited 2019 Jun 14]. Available from: [https://members.aoc.org/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/eoma\\_appendix\\_k.pdf](https://members.aoc.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_k.pdf)
- Codex Alimentarius. Codex General Standard for Food Additives. 2019 [cited 2019 Jun 21]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B192-1995%252FC>



- XS\_192e.pdf
- Ellison S, Rosslein M, Williams A. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. EURACHEM, London, UK. 2000. p 32-94.
- EMA. Validation of analytical procedures: Text and methodology. European Medicines Agency, London, UK. 2006. p 8-15.
- European Commission. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives (Text with EEA relevance). 2008 [cited 2019 Jun 21]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02008R1333-20191028&from=en>
- Government of Canada. List of Permitted Food Additives with Other Accepted Uses. 2017 [cited 2019 Jun 15]. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/8-other-accepted-uses/archive003.html>
- International Organization for Standardization (ISO). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1. General principles and definitions. 1994 [cited 2019 Jun 24]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en>
- International Organization for Standardization (ISO). Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) – Supplement 1: Numerical methods for the propagation of distributions. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2004. p 5-36.
- Lee JH, Lee YS. Effect of excess calcium and iron supplement on bone loss, nephrocalcinosis and renal function in osteoporotic model rats. Korean J Nutr. 2000. 33:147-157.
- Lewis RJ. Sax's dangerous properties of industrial materials. 9th ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY, USA. 1996. p 1644.
- Mann KV, Picciotti MA, Spevack TA, Durbin DR. Management of acute iron overdose. Clin Pharm. 1989. 8:428-440.
- Merck Research Laboratories. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed. Merck&Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA. 2001. p 716.
- Ministry of Food and Drug Safety. Research on establishing analytical method for coloring agents and emulsifiers in food. 2017 [cited 2021 Feb 7]. Available from: <https://scienceon.kisti.re.kr/commons/util/originalView.do?cn=TRKO201800035730&dbt=TRKO&rn=>
- Ministry of Food and Drug Safety. Standard procedure for preparing test methods such as food guidelines on. 2016 [cited 2019 Aug 4]. Available from: [http://www.nifds.go.kr/brd/m\\_15/view.do?seq=8215&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=24](http://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=8215&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=24)
- Ministry of Food and Drug Safety. Standards and specifications for food additives. 2019 [cited 2019 Jun 14]. Available from: [https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04\\_03.jsp?idx=8200050](https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=8200050)
- Nikolić VD, Ilić DP, Nikolić LB, Stanojević LP, Cakić MD, Tačić AD, et al. The synthesis and characterization of iron (II): Gluconate. Savremene Tehnologije. 2014. 3(2):16-24.
- Qin YL. Determination of ferrous gluconate in tablets by HPLC. Journal of Anhui Agricultural Sciences. 2013. 41:3635-3636.
- The Japan Food Chemical Research Foundation. Standards for use, according to use categories. 2021 [cited 2021 Feb 4]. Available from: <https://www.ffcr.or.jp/en/upload/StandardsforUseFeb32021.pdf>