

Determination of fluorine in Krill oils by combustion-ion chromatography

Jaehak Jung^{1,2, *}, Soobin Kim², Euisung Chu², and Joungmoo Joung²

¹Korea Institute of Analytical Science and Technology, 99, Seongsuil-ro, Seoungdong-gu, Seoul 04790, Korea

²SUNGMOON SYSTECH, 471 Chenggyecheon-ro, Dongdaemun-gu, Seoul 02587, Korea

(Received March 25, 2020; Revised August 5, 2020; Accepted August 10, 2020)

연소-이온크로마토그래프를 이용한 크릴오일 중 불소 시험법

정재학^{1,2, *} · 김수빈² · 추의성² · 정정무²

¹한국분석과학연구소, ²성문시스텍

(2020. 3. 25. 접수, 2020. 8. 5. 수정, 2020. 8. 10. 승인)

Abstract: A fluorine content analysis method for krill oils, which is a representative oil formulation in foods, was developed in compliance with the Korea Food and Drug Ministry's "Guidelines for Validation of Testing Methods Related to Food". Using this method for krill oils, the presence of impurities was evaluated via combustion-ion chromatography (C-IC). A review of published technical data on fluorine in krill oils showed that while the traditional wet potentiometric method was typically used, it was not reliable. Moreover, there was no food testing/analysis laboratory in Korea to perform a fluorine test analysis on such an oil matrix. Therefore, we identified halogen (fluorine) tests, developed to national and international standards, and developed a test method suitable for krill oils by selecting a C-IC method that is sufficiently applicable to the oil matrix. Based on the characteristics of the oil matrix, the optimal test method was established through various experiments by reviewing the concerns related to loss and interference in the preparation and introduction of samples. The fluorine content test was carried out on 11 krill oil products that were purchased online. Most products (with the exception of only one) were found to contain less than the reporting limit obtained by the test method. Furthermore, after additional testing, a high fluorine content of approximately 2,000 ~ 3,000 mg/kg was detected on the krill surface, although the concentration varied depending on the area of the krill. A comparison with samples from two ISO/IEC 17025 testing laboratories confirmed that there was no significant difference in the statistical analysis results obtained by ANOVA among the three laboratories. A testing guide for fluorine content analysis was completed.

요약: 식품 중 대표적인 오일 제형인 크릴오일 중에 불소 시험법 개발을 위해 식약처 "식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인"에 따라서 연소-이온크로마토그래피를 사용하여 크릴오일 중 불소 시

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-6591-1117 Fax : +82-(0)2-6951-1137

E-mail : jh3370@naver.com

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.

험법을 개발하였다. 기존 크릴오일 중 불소 시험법은 전통적인 습식 전위차법이 사용되었으나, 신뢰성이 높지 않았고 국내에서는 이러한 오일 제형에 대해서는 불소 시험을 하는 식품검사기관이 없는 상황이었다. 이에 할로젠 시험법 관련 국가 및 국제표준으로 개발된 시험규격을 확인하였으며, 이 중에 오일 제형에 충분히 적용 가능한 연소-이온크로마토그래프 장비를 선택하여 크릴오일에 적합한 시험법을 개발하였다. 오일 제형의 특성상 시료준비 및 도입 시에 손실 및 각종 방해 (interference) 관련 우려를 사전 검토하여 다양한 실험을 통해서 최적의 시험법을 확립하였다. 개발된 오일 중 불소 시험법을 활용하여 유통되는 크릴오일 제품 11 개를 구입하여 불소함량 시험을 하였으며, 1개 시료를 제외한 대부분 제품들은 시험법에서 제시한 보고서 검출한계 미만으로 불검출을 확인하였다. 또한 불소가 검출되는 부분을 확인하기 위해 진행한 크릴새우 자체 시험한 결과, 크릴 부위에 따라서 농도가 다르긴 하지만, 몸통을 제외한 크릴 껍질부는 약 2,000 mg/kg~3,000 mg/kg의 높은 불소함량이 검출됨을 확인하였다. 이후 확립된 시험법을 국제공인 시험기관 (ISO/IEC 17025) 2 곳에 시료를 의뢰하여 본 수행기관과 시험결과를 비교해 본 결과, 3개 실험실 간에 분산분석 통계처리에서 결과의 유의차가 없음을 확인하였고, 이에 본 내용을 토대로 크릴오일 중 불소함량 분석법 관련 시험법으로 적합함을 확인하였다.

Key words: krill, fluorine, analytical method, C-IC

1. 서 론

최근 성인별 예방 및 건강증대를 위한 건강기능식품에 대한 요구가 늘고 있으며, 대표적인 신제품으로 크게 각광받고 있는 크릴오일 제품(식품군으로 분류)이 홈쇼핑 및 온라인 마켓에서 큰 인기를 누리며 판매가 증가되는 상황이다.

남극새우라고 불리는 크릴새우(학명: *Euphausia superba*)는 새우와 생김새는 비슷하지만 다른 어종으로서 동물성 플랑크톤의 일종으로 남극의 차가운 심해에서 서식하는 원양 해양생물로 지구상에서 가장 풍부한 동물종으로 알려져 있다.¹ 이런 크릴새우는 어류, 조류 및 고래류의 먹이로 남극해 먹이사슬의 중심에서 남극 생태계를 유지시키는 절대적인 위치에 있기도 하다. 이러한 크릴새우는 불포화지방산(48.6%)의 함량이 높고, 특히 이들 불포화지방산 중에서 DHA (Docosa hexaenoic acid, 16.6%~36.5%) 및 EPA (Eicosapentaenoic acid, 11.1%~24.8%)와 같은 n-3 (또는 오메가-3) 지방산이 상당히 높은 비율로 함유되어 있다.² n-3 지방산은 적색육(등푸른 생선류) 어류에 많이 함유되어 있으며, DHA와 EPA는 혈액 중 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시켜 동맥경화나 심장질환 예방에 관여한다고 알려져 있다.^{3,7} 또한 붉은 색깔을 띠는 각종 갑각류(새우, 가재, 게 등)에는 일반적으로 항산화력 및 면역자극 효과에 좋다고 알려진 아스타잔틴 (Astaxanthin)이⁸ 다량 함유되어 있는데, 특히 크릴새우에서 추출된 오일에서 많이 함유되어 있다고 하여 최

근에는 식품 또는 건강기능식품의 부원료로 널리 사용되고 있으며, 유럽 등 전세계적인 생산 및 판매가 증가되는 추세다.^{9,10}

크릴 중에 불소 관련 연구는 오래전부터 지속되어 왔으며¹¹⁻¹³ 특히 1979년 T. Soevik가 연구한 결과¹⁴에서 보듯 남극의 크릴새우 분석결과, 생크릴 및 삶은 몸통에서는 불소가 약 570 mg/kg 및 750 mg/kg, 무지방의 껍질부에서는 4,260 mg/kg의 높은 농도의 불소가 검출되었다. 이에 식용으로 사용하기 위해서는 무엇보다 크릴의 머리, 껍질 같은 불소함량이 높은 부분을 제거하게 되어 있으나 현재 식품 중 오일매질에서 불소함량을 확인할 수 있는 적합한 시험법이 없기에 불소함량 시험법 마련이 필요한 상황이다.

2015년 전세계 크릴오일 시장 규모는 2억 440만 달러로 평가되었으며 인구 중 건강 인식 제고로 인해 크게 성장할 것이 예상되며, 특히 EPA, DHA 및 n-3 지방산 등 식품 보충제에 대한 수요가 증가함에 따른 이들 제품의 활용도도 크게 증가할 것으로 예상된다.⁹ 글로벌 크릴오일시장 2014~2017 분석 및 2025 시장 예측 보고서¹⁰에 따르면, 세계 크릴오일시장은 향후 지속적인 증가를 통해 2025년 까지 7억 940만 달러에 이를 것으로 예상된다. 독일의 경우 나라 자체가 어류 소비가 적어서 대개의 독일인들은 DHA와 EPA를 충분히 섭취하지 못하고 있다. 그러나 이러한 영양소 부족분을 크릴오일이 채워주는데, 이 제품 혁신과 다양한 제품 형태의 도입으로 향후 크릴오일 시장의 성장은 가속화 될 것으로 예상된다.¹⁰

이에 본 연구에서는 1) 식품 등 다양한 제형에 대한 불소 시험법에 대해서 국내외 조사 및 정성/정량 분석법들을 고찰하고, 2) 크릴오일 제품 중에서 불소 함유량을 분석하는 전처리 및 기기 분석방법을 개발하여 밸리데이션을 수행하였고, 3) 개발된 시험법을 통해 실험실간 비교검증을 실시하였으며 4) 유통되는 크릴오일 제품 및 크릴새우 중의 불소함량을 확인하였다. 최종적으로는 식품으로 사용되는 크릴오일의 불소함량 분석법을 마련함으로써 생산 및 판매기업의 품질관리/품질보증 활동을 돕고 이를 통해 소비자의 식품안전 관련 불안감을 해소하는데 일익 담당하고자 한다.

2. 연구방법

2.1. 국내외 시험법 비교

국내의 불소 시험법 관련 발표된 여러 연구논문 및 각종 시험표준에 대해서 확인한 결과, 한국 식품의약품안전처와 관련된 다양한 제품/제형에서 불소 관련 시험법을 확인할 수 있었다. 우선, 식품의약품안전처의 식품공전의 제7장 일반시험법 중 2.2 미량영양성분 시험법에서 불소 시험법은 이온전극을 사용하는 전위

차전극법을 사용하고 있다.¹⁵ 식품의약품안전처, 의약품에 관한 기준 및 시험법 (식품의약품안전처 고시 제2020-21호)¹⁶에 [별표 3] 의약품각조 제2부 약사법」 제2조제7호나목 중, 치약 등에 원료로 사용되는 플루오르화소듐(NaF) 이산화규소 페이스트 관련 시험법에서는 이온전극법을 사용하도록 되어 있으며, 관련하여 치약을 제조 판매하는 기업에서는 불소이온전극을 사용하여 불소함량을 평가하고 있다. 그러나 치약의 페이스트 제형 자체가 불소 분석 시에 시료 간섭 현상이 크에 따라 시험전처리 조건이 매우 불안정하여 숙련된 시험자가 아닌 경우, 결과값의 편차가 매우 크다. 따라서 이온전극을 사용하는 불소 시험법의 경우, 신뢰도가 낮은 것으로 평가되고 있다.⁹

화장품의 경우에는 식품의약품안전처, 기능성화장품 기준 및 시험법(식품의약품안전처 고시 제2012-89호) 중 일반시험법 “23. 산소플라스크 연소법”¹⁷에는 염소, 브롬, 요오드, 불소, 황 등을 함유하는 유기화합물을 산소로 채운 플라스크 중에서 연소 분해하여 그 중에 함유되어 있는 할로젠, 황 등을 확인 또는 정량하는 방법이 있다. 이 방법의 경우 대학교 화학 기기 분석 교과서에 수록된 전통적인 할로젠 분석방법으로

Table 1. Worldwide halogen test methods¹⁸⁻²¹

Standard	Test method	Instrument	Recommended method detection limit	Application
Determination of certain substances in electrotechnical products Screening-F, Cl, Br in polymers and electronics by Combustion-IC	IEC 62321-3-2:2020 2nd Edition	Combustion-IC	Greater than 1~10 mg/kg	electrical electronics, automotive, plastics, materials, industrial products, etc.
Characterization of waste – Halogen and sulfur content – Oxygen combustion in closed systems and determination methods	EN 14582:2016	Oxygen bomb-IC	Greater than 25 mg/kg	Solid, pasty and liquid samples
Characterization of waste – Halogen and sulfur content – Oxygen combustion in closed systems and determination methods		Oxygen flask-IC	Greater than 250 mg/kg	Solid, pasty and liquid samples
Standard test method for halogen (F, Cl, Br) and sulfur content by oxidative pyrohydrolytic combustion followed by ion chromatography detection (Combustion ion chromatography - CIC)	KS M 0180:2009	Combustion-IC	Greater than 1~10 mg/kg	Electrical electronics, automotive, industrial products, etc.
Standard Test Method for Total F, Cl and S in Aromatic Hydrocarbons and Their Mixtures by Oxidative Pyrohydrolytic Combustion followed by Ion Chromatography Detection (Combustion Ion Chromatography-CIC)	ASTM D7359-18	Combustion-IC	Aromatic hydrocarbons and their mixtures, Greater than 0.1~10 mg/kg	Aromatic hydrocarbons and their mixtures

시료의 제형에 따라서 결과 값 변동이 매우 클 수 있으므로 시료전처리 조건 설정에서 특히 큰 주의가 요구된다. 또한 이 방법은 유럽표준 (European Standards, 이하 EN) 에서 폐기물 중 할로젠 시험법 표준인 EN 14582¹⁸ 내의 부속서에 해당 시험법이 기술되어 있는데, 검출한계 250 mg/kg 이상에만 적용하도록 권고하고 있다. 즉 250 mg/kg 이하의 낮은 농도 시료에는 적용하기 어려운 방법으로 알려져 있다.

현재 확인된 국가 및 국제표준에서 불소 시험법으로는, 아래 Table 1에서 보여주듯 IEC (International Electrical Commission), EN (European Standards), KS (Korean Industrial Standards), ASTM (American Society for Testing and Materials) 과 같은 다양한 할로젠 시험규격들이 있다. 이 규격들은 2009년 이후로 발간된 것으로, 이 중에서 IEC, KS 및 ASTM 규격은 자동화된 연소-이온크로마토그래피를 이용한 시험방법 표준으로서 EN 규격 대비 저농도 측정에 사용되고 있음을 보여준다.

국제표준으로는 EU의 제품환경 규제인 RoHS (Restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment) 및 ELV (End of Life Vehicle)와 같은 전기전자/자동차 제품 및 관련 소재/부품에 적용하고 있는 국제 유해물질 규제에 대표적으로 사용되는 IEC 62321-series 국제표준 중에 IEC 62321-3-2 표준이 있다. 이 표준은 2013년 초판으로 발간될 당시에는 브로민만 분석하는 방법으로 개발되었다가, 2015년 이후 불소 및 염소를 포함하여 표준화 개정이 진행되어 현재는 국제시험소간비교시험 (International Inter-laboratory Study, 이하 IIS) 후 CDV (Committee Draft for Voting, 위원회투표안)가 통과되었으며, 이후 2020년 6월말 최종 국제표준으로 발간되었다. 불소 관련 표준내 본장 (Normative part)에는 연소-이온크로마토그래피 (Combustion-Ion Chromatography, 이하 연소-IC) 방법이 포함되어 있으며, 부속서 (Informative annex)에는 산소통-IC 및 산소 플라스크-IC 방법이 수록되어 있어 불소 시험에 대한 기기분석방법이 모두 포함된

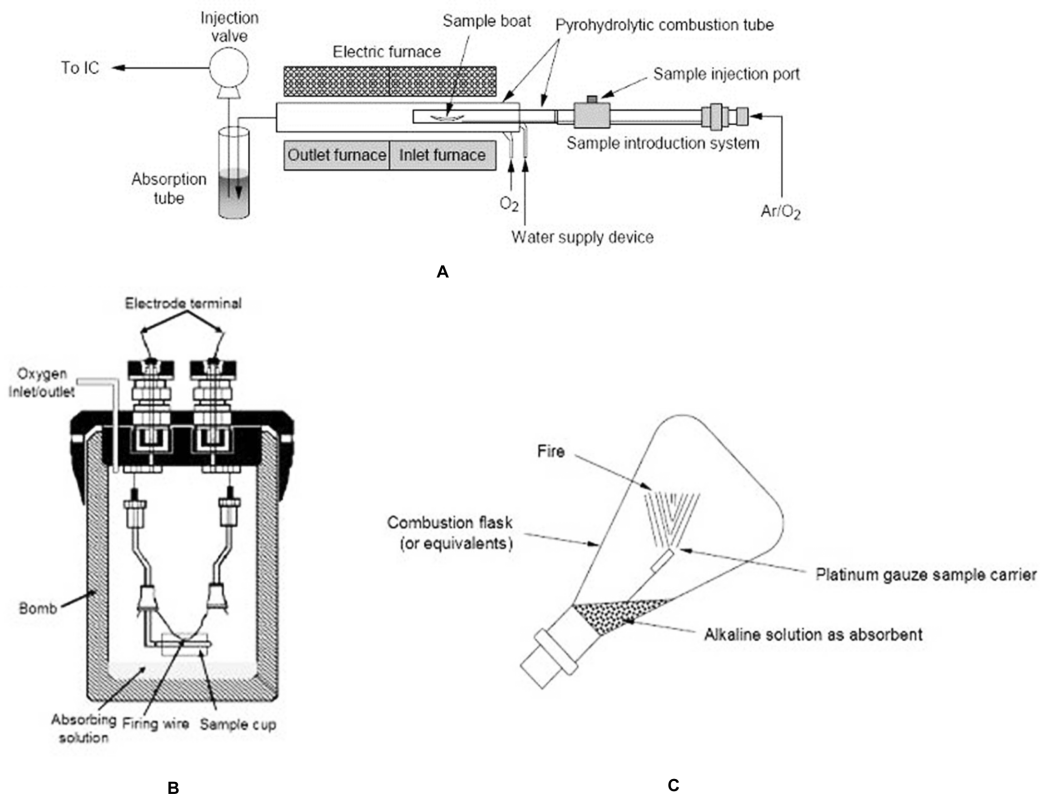


Fig. 1. Schemes for halogen sample pre-treatment (A) electric furnace combustion device connected to IC, (B) oxygen bomb combustion device, (C) oxygen flask combustion device (Referenced figures from IEC 62321-3-2, Informative Annex A, B, C).

시험표준이기도 하다.¹⁹ Fig. 1에서는 IEC 62321-3-2 표준에서 사용된 할로젠 시험법 관련된 여러 전처리 용 시험기기 도식도를 보여주고 있다.

할로젠 시험법 관련 국가표준으로는 한국에서 개발하여 KS로 제정한 KS M 0180²⁰ 표준이 있으며, 이 표준은 국제표준을 제안하기 위해서 사전에 한국의 시험분석 전문가들이 협력하여 시험법 개발 후 KS로 제정하였다. 상기 IEC 62321-3-2 국제표준과 시험법 주요 내용은 동일하나, 시험대상 물질의 경우, 할로젠 (F, Cl, Br)과 황 (S)이 모두 포함되어 있으므로 한번의 시험으로 동시에 여러 할로젠 물질과 황에 대한 분석이 가능한 표준으로 사용되고 있다.²⁰

유럽의 대표적인 할로젠 시험분석 표준인 EN 14582¹⁸의 경우, 폐기물 (Waste) 대상으로 개발되었지만, 실제적으로는 표준 내 적용 가능한 매질이 고체, 페이스트 및 액체 등 다양한 제형을 포함하여 시험이 가능하도록 정의하고 있으며, 주요 시험법으로는 산소통-IC와 산소플라스크-IC 방법이 수록되어 있다. 전 세계적으로도 연소-IC를 표준화 채택되기 전에는 대부분 이 방법을 제품환경 및 환경 폐기물 관련 할로젠 시험법으로 사용하였다.¹⁸

미국 ASTM의 경우, ASTM D 7359-18²¹ 표준에 있는데, 석유 및 액체 제형 시료에 대해서 불소, 염소 및 황에 대한 시험을 연소-IC를 이용하여 수행하는 표준이며, 0.1 mg/kg 이상의 저농도의 석유화학 및 관련 제품 및 재료평가에 많이 활용되고 있다.²¹

그 외에 논문들을 조사한 결과, 음료나 치약의 경우 주로 이온전극법을 사용하고 있으며, 수질분야에서는 이온크로마토그래프법을 사용하고 있음을 알 수 있다. 이러한 최근 동향을 봤을 때 다양한 제형, 특히 오일류와 같은 제형의 경우에는 이온전극법 보다는 연소-IC와 같이 복잡한 매질의 시료라 할지라도 시료전처리가 간단하고, 관련 시료 및 기기 간섭을 최소화하여 빠르고 정확하게 분석이 가능한 연소-IC 방법이 가장 효율적인 방법으로 판단되어 본 연구에서는 연소-IC를 이용한 기기분석법을 사용하였다.^{15,20}

이에 본 연구에서는 크릴오일 제형의 특성을 고려하여, 시료 샘플링 및 시료전처리, 정성분석 및 정량 분석 방법을 연구하였다.

2.2. 시약 및 재료

시료의 정량을 위해 불소이온 표준물질 (KRISS, Korea, 1,000.0 mg/kg), 오일 중 불소 인증표준물질 (Sigma Aldrich, USA, 2,910 mg/kg)을 사용하였다. 미

네랄 오일(Samchun, Korea, 밀도 0.83 g/mL~0.89 g/mL 25°C)은 시약급으로 불소의 함유 여부를 확인 후 사용하였고, 정제수는 실험실에서 정제수 장치 (Human Power, Korea)를 사용하여 18 MΩ/cm로 조제하여 사용하였다. 조연제로는 산화텅스텐 (WO₃, 순도 99.9%) 분말을 이용하였다. 연소에 사용되는 산소는 순도 99.7% (부피분율) 이상이며 아르곤은 순도 99.99% (부피분율) 이상의 가스를 사용하였다. 용리액 (Eluent)은 Na₂CO₃ 3.5 mM와 NaHCO₃ 1.0 mM를 혼합하여 사용하였다.

2.3. 용액 제조 및 시료 전처리

불소이온 표준물질을 이용하여 (0.5~8.0) mg/L로 검정공선용 표준용액을 정제수를 이용하여 조제하였고, 방법검출한계 (Method Detection Limit, 이하 MDL)를 측정하기 위하여 불소 50 mg/L 용액을 조제하였다. 오일 매질의 불소 인증표준물질을 적정 농도로 희석하기 위해 불소 검출한계 이하로 확인된 미네랄 오일로 희석하여 회수율을 평가하기 위한 품질보증 표준용액 (58.2 mg/kg)을 조제하여 사용하였다.

분석조건 확립을 위해 불소이온 농도가 20 mg/kg, 30 mg/kg인 용액을 각각 조제하였고, 불소 인증표준용액으로 불소이온 농도가 134 mg/kg 이용액을 부피플라스틱에 조제 후 자석교반기를 이용하여 (40~50) °C에서 5분간 교반하여 용액을 조제하였다.

크릴새우는 부위별 건조 전후의 불소 농도를 측정하기 위해서 크릴새우 머리, 몸통, 껍질, 꼬리의 각 부위를 나누어 배치하였다. 건조가 필요한 크릴새우는 60 °C Dry oven에서 30분 동안 건조시킨 후 뒤집어서 다시 30분 건조시켜 수분을 최대한 제거하였다.

연질캡슐에 함유된 크릴오일은 칼로 절단하여 내부에 들어 있는 오일을 실험 직전에 채취하여 분석하였다.

2.4. 분석 기기 및 조건

본 연구에 사용한 연소-IC 장비는 Fig. 2와 같은 구



Fig. 2. Combustion-ion chromatograph system.

성으로 시료도입 및 연소부는 Mitsubishi Chemical Analytech (Japan)사의 장비 (모델명: AQF-2100H)를 사용하였다. 전기로 온도는 (900~1,000) °C이며 주입되는 O₂와 Ar은 각각 400 mL/min, 200 mL/min 유량으로 주입되었다. 연소관 내의 가습을 위해 (0.01~0.04) mL/min의 속도로 정제수를 도입하였다. 흡수액(정제수)의 최종 부피는 10 mL가 되도록 한 후 이온크로마토그래프에 1 mL를 주입하였다. 이온크로마토그래프는 Thermofischer Scientific (USA)사 장비 (모델명: AQUION)을 사용하였는데, 이동상은 3.5 mM Na₂CO₃, 1.0 mM NaHCO₃의 혼합액을 이용하였고, 분석용 컬럼은 Thermofischer Scientific사의 AS 23 (4 mm × 250 mm, 6 μm) 음이온 분석전용 컬럼을 사용하였으며 검출기는 전기전도도 (Conductive Detector, CD) 측정방식을 사용하였다.

크릴오일 및 액체 제형의 물질을 분석 시 세라믹 재질의 시료보트에 석영솜을 올린 후 시료를 주입하여 분석하였고, 크릴새우의 경우 조연제가 흘러넘치지 않게 하기위해 Ni 재질의 시료보트에 크릴새우와 조연제 분말을 넣어 세라믹 시료보트 안에 올린 후 분석을 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 크릴오일 분석 조건 확립

3.1.1. H₂O₂ 간섭 검증

불소 분석 시 회수율을 높이기 위해 흡수액에 일반적으로 첨가되는 H₂O₂에 대해서 간섭영향을 확인하기 위하여 H₂O₂의 농도에 따른 불소의 회수율 변화를 측정하였다. Fig. 3과 같이 불소이온 20 mg/kg 용액의 H₂O₂ 농도에 따른 회수율을 측정한 결과, H₂O₂를 10 mg/kg 이상 사용함에 따라 회수율이 60% 미만으

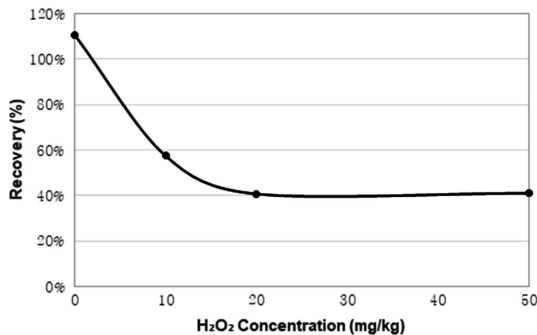


Fig. 3. Verification of H₂O₂ interference for fluorine analysis.

Table 2. Evaluation of fluorine recovery (%) according to the sample input amount

Sample Input (mg)	F Concentration (mg/kg)	Recovery (%)
20	27	90
30	31	103
40	28	93
50	31	103
60	27	90
70	30	100
80	30	100
90	32	107
100	34	113
150	35	117

로 떨어지는 것이 확인되었다. H₂O₂ peak와 불소 peak가 일부 중복 및 명확하게 분리되지 않아 크로마토그램 적분 시 분석 오류를 발생시키는 것을 확인하여, 본 연구에서는 흡수액에 H₂O₂는 첨가하지 않고 정제수만을 흡수액으로 사용하는 조건으로 수행하였다.

3.1.2. 시료 도입량에 따른 회수율 평가

시료 도입량에 따른 불소 회수율을 평가하기 위하여 불소이온 농도 30 mg/kg 용액을 조제하고, 도입되는 시료량을 20 mg ~ 150 mg으로 늘여가며 실험하였다. Table 2에서 보듯, 실험결과 회수율은 90% ~ 120%로 시료량 증가에 따른 유의미한 차이는 없는 것으로 확인됨에 따라서 본 연구에서 최종 시료 도입량은 약 50 mg 수준으로 정하였다.

3.1.3. 시료 중 불소의 휘발성 평가

시료 노출 시간에 따른 불소 휘발(손실)을 확인을 위해 불소 인증표준용액으로 불소이온 농도가 134 mg/kg 용액을 조제하여 (0~4) 시간 동안, (23~27) °C, (40~60) % R.H. 조건에서 방치한 후 시간별 분석

Table 3. Evaluation of fluorine volatility/recovery rate according to sample exposure time

Exposure time (h)	F Concentration (mg/kg)	Recovery (%)
0	142	106
1	120	90
2	87	65
3	80	60
4	81	60

하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 방치 2시간 이후 부터 회수율이 약 60%로 급격하게 떨어졌기에, 오일 매질에 대한 불소시험 시에는 시료 휘발 가능성을 고려한 시험이 필요함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 크릴오일을 실험 직전에 절단 후 채취하여 시료 보트에 투입 후 바로 분석 장비에 도입하였다.

3.2. 분석법의 유효성 검증

분석법 유효성 확인은 식품의약품안전평가원에서 발간된 "식품 등 분석법 마련 표준절차에 관한 가이드라인 (2016)"⁴²에 준하여 특이성 (Specificity), 정확성 (Accuracy), 정밀도 (Precision), 정량한계 (Quantification limit) 및 직선성 (Linearity)을 확인하였다.

우선 식품 중 매질에 의한 영향을 확인하기 위하여 각각 다른 매질의 시료를 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 불소이온 2 mg/L의 표준용액(A)과 오일 제형에 불소이온 2 mg/L를 첨가한 시험용액(B) 간 머무

름 시간 및 스펙트럼 형태를 조사한 결과, 두 시료의 불소이온 머무름 시간은 0.007 분 차이로 큰 차이가 없었고 시료 간 스펙트럼의 형태가 일치함을 확인하였다.

불소가 검출되지 않는 크릴오일 제품에 각 분석 대상물질을 일정 농도로 첨가하여 정밀도 및 정확도 결과를 Table 4에 보여주고 있다. 정밀도 및 정확도는 측정농도에 따라 AOAC 공식분석법 가이드라인²³에 따라 판정하였으며, 분석결과 정밀도는 회수율이 93.37%~102.0%이며, 정확도는 상대표준편차 (RSD) 1.25%~3.60%로 AOAC 가이드라인²³에서 농도 수준 별 정한 기준 이하의 양호한 회수율 및 RSD(%) 결과를 확인하였다.

연소-IC 장비의 경우, 전기료에서 회화되어 가스화된 시료가 흡습액에 용존화된 후 최종 IC에 도입되는 과정에서 정확한 시료량 측정을 위해서는 분석장비에 따라서 내부표준물질을 사용할 수도 있다. 최신 개발

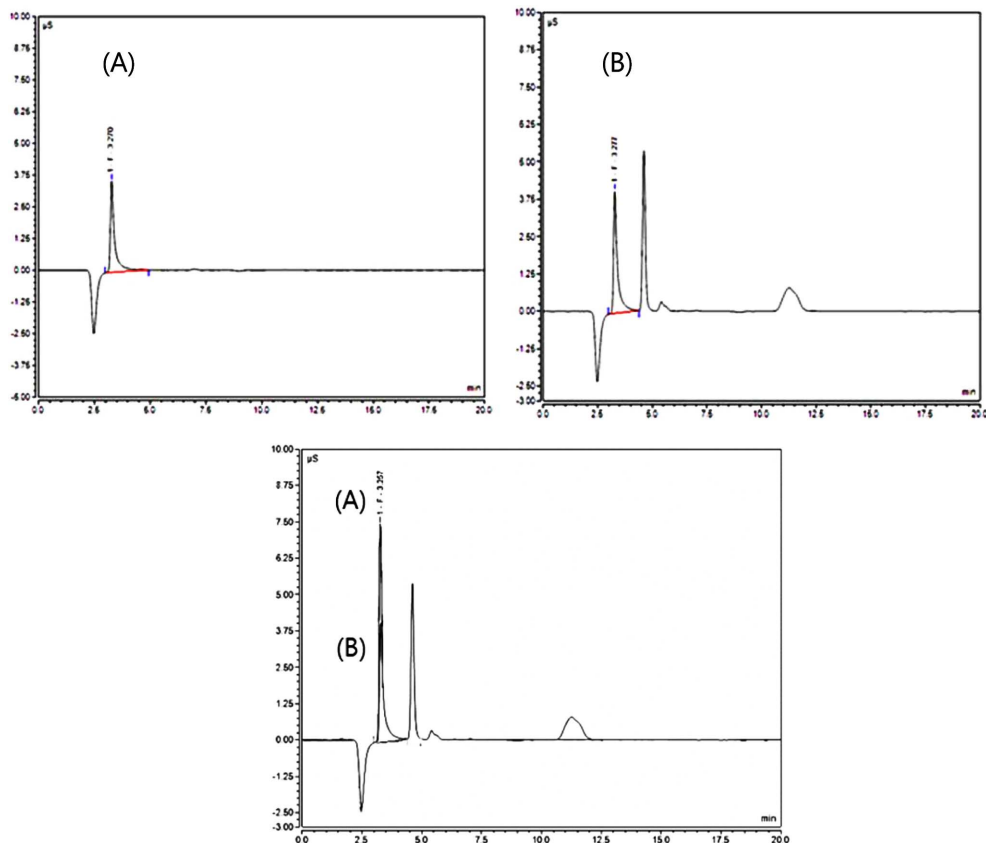


Fig. 4. Study results of retention time and spectral pattern between F^- 2 mg/L standard solution (A), test solution spiked with F^- 2 mg/L in oil formulation (B) and overlapped spectrum between (A) and (B).

Table 4. Results of evaluating accuracy and precision

Accuracy (%)	F Concentration (mg/kg)			Precision (mg/kg)	F Concentration (mg/kg)		
	100	200	300		100	200	300
1	90.65	192.17	301.91	1	90.65	192.17	301.91
2	91.64	191.57	301.87	2	91.64	191.57	301.87
3	99.19	191.11	309.9	3	99.19	191.11	309.90
4	92.56	188.98	308.44	4	92.56	188.98	308.44
5	92.80	184.38	307.95	5	92.80	184.38	307.95
Recovery (%)	93.37	94.82	102.00	Average (mg/kg)	93.37	189.64	306.01
Average (%)		96.73		RSD (%)	3.60	1.68	1.25
Range (%)		93.37~102.0		Range (%)		1.25~3.60	

Table 5. Results of evaluating reproducibility between laboratories (between test equipment/methods)

Repetition	Laboratory	
	A (ISTD ^a used)	B (None)
1	192.17	187.70
2	191.57	201.47
3	191.11	185.83
4	188.98	196.12
5	184.38	193.05
RSD (%)	1.68	3.29
Average (mg/kg)	189.64	194.53
Average of A&B (RSD, %)	2.48	

^aISTD: internal standard

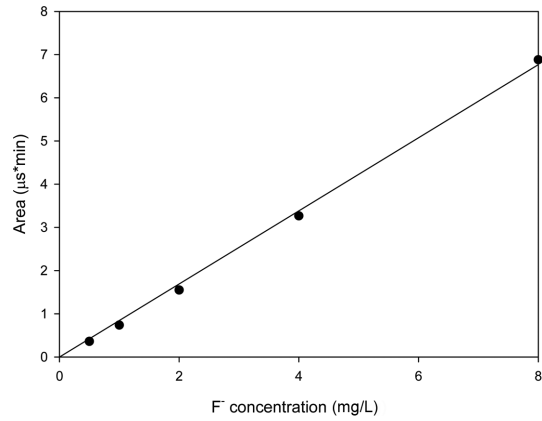


Fig. 5. Calibration curves for the Fluorine linearity test [F : 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 (mg/L)].

된 분석장비의 경우, 장비 내부에서 유량 센서를 통해 자동보정을 해주나 기존 구형 장비의 경우에는 투입량이 일정치 않을 수 있으므로, 내부표준물질을 사용하여 IC 주입량에 대한 보정이 요구된다. 이에 내부표준물질 사용 유무에 따른 두 개 시험기관간 동

일 시료를 사용하여 비교하였으며 그 결과는 Table 5에서 볼 수 있다. 결과적으로 내부표준 물질의 사용 여부에 따른 두개 실험실의 다른 분석장비간 재현성 평가 결과는 2.48 %로 큰 차이가 없는 것을 확인하

Table 6. Measurement of linearity

Repetition	# 1		# 2	
	Concentration (mg/L)	Area (µs*min)	Concentration (mg/L)	Area (µs*min)
1	0.5	0.359 2	0.5	0.413 9
2	1.0	0.736 2	1.0	0.793 3
3	2.0	1.549 6	2.0	1.641 0
4	4.0	3.265 6	4.0	3.385 6
5	8.0	6.881 5	8.0	7.012 4
Slope	0.872 9		0.883 3	
y-intercept	-0.147 7		-0.089 2	
R ²	0.999 4		0.999 6	

였다.

직진성에 대한 측정결과는 5 개의 표준용액을 사용한 Table 6 및 Fig. 5의 결과에서 볼 수 있다. 2회의 실험결과 모두 검정곡선은 양호한 직진성 ($R^2 \geq 0.999$) 결과를 확인할 수 있었다.

이온크로마토그래프 만의 검출한계는 2번 검정곡선 시험을 통해서 검정곡선 기율기법으로 구하였다. 0.5 mg/L에서 8.0 mg/L까지 5 개 표준용액을 조제하여 평가한 결과, 이온크로마토그래프의 정량한계는 0.36 mg/L로 확인되었다.

불소 50 mg/kg 용액을 10회 반복측정하여 연소-IC의 정확도 평가한 결과, Table 7의 결과에서 보듯 회수율이 (93 ~ 102) % 수준이며 상대 표준편차는 4 % 이내의 양호한 정밀도로 확인되었다. 이온크로마토그래프의 검정곡선용 매질과 오일시료 매질은 상이하므로 미네랄 오일에 불소 표준물질을 첨가한 시료를 이용한 MDL 평가 결과는 4.5 mg/kg으로 Table 7에서 확인되었다.

$$(계산식) \quad MDL = t \times s_{n-1} \quad (1)$$

여기에서

MDL: method detection limit (방법 검출한계), (mg/kg);

t: 스튜던트 t 값 (99 % 신뢰);

s: 표준편차.

본 MDL은 향후 본 시험소의 성적서 상에서 불검출 (N.D. not detected) 여부를 결정할 때 한계수치로 사용될 수 있다.

3.3. 실험실 간 개발된 시험법 교차 검증

크릴오일 중 불소함량 분석법에 대한 시험법 검증 차원에서 실험실간 비교실험을 연소-IC를 보유한 국제공인시험기관 (ISO/IEC 17025) 두 곳에 시험법과 함께 의뢰하여 총 3개 기관의 결과로 비교 진행하였다. 오일 중 불소 인증표준물질 (CRM) (Sigma Aldrich, USA, 2,910 mg/kg) 및 크릴오일 (KO-12) 시료에 대한 3개 실험실간 결과에 대해서 Box plot 비교 및 분산분석 (ANOVA) 평가 결과, CRM 기준값 대비하여

Table 7. MDL (method detection limit) measurement for 50 mg/kg fluorine in oil by C-IC

Sample	No	F concentration (mg/kg)	Average (mg/kg)	Standard deviation (s)	t-value ($\alpha=99$)	MDL (mg/kg)
Spiking fluorine (50 mg/kg)	1	45.2	48.27	1.6	2.82	4.5
	2	48.0				
	3	46.3				
	4	50.0				
	5	48.0				
	6	48.4				
	7	49.5				
	8	47.3				
	9	50.1				
	10	49.9				

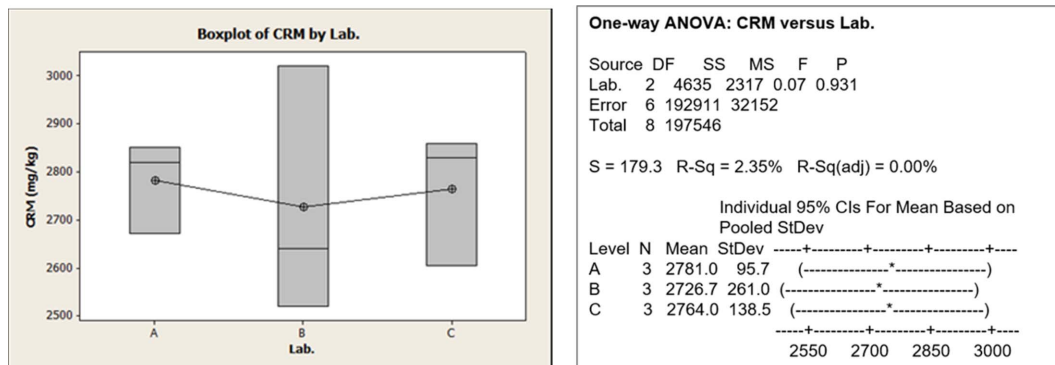


Fig. 6. ANOVA analysis of inter-laboratory testing for CRM sample (Fluorine 2910 mg/kg).

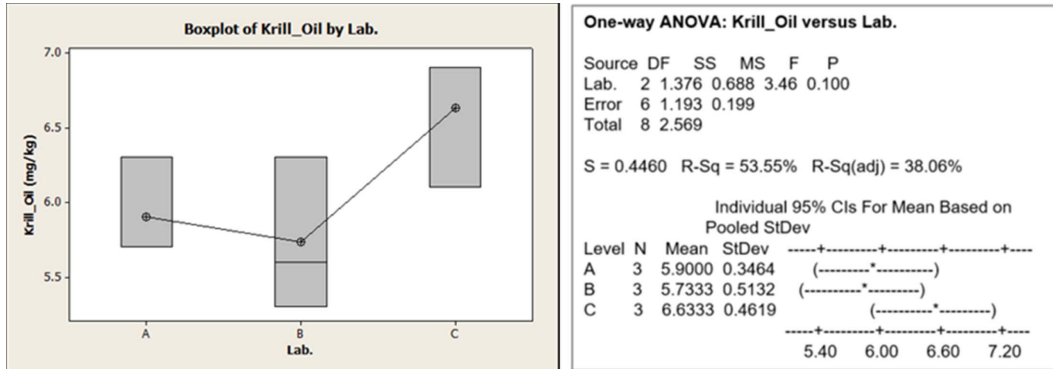


Fig. 7. ANOVA analysis of fluorine inter-laboratory testing for Krill Oil sample.

Table 8. Test results of fluorine in krill oil products

Sample	No.	Amount (mg)	F Conc. (mg/kg)	Mean (mg/kg)	Sample	No.	Amount (mg)	F Conc. (mg/kg)	Mean (mg/kg)
KO-01	1	12.2	2.8	N.D. ^a (2.4)	KO-07	1	37.8	N.D.	N.D. (1.1)
	2	20.6	1.5			2	39.1	2.1	
	3	13.3	2.9			3	43.3	1.3	
KO-02	1	13.7	1.9	N.D. (1.6)	KO-08	1	23.1	N.D.	N.D.
	2	16.3	1.4			2	21.8	N.D.	
	3	23.5	1.4			3	18.9	N.D.	
KO-03	1	29.7	3	N.D. (2.8)	KO-09	1	32.3	N.D.	N.D.
	2	39.3	2.3			2	38.2	N.D.	
	3	60.6	3			3	25.6	N.D.	
KO-04	1	31.5	2.2	N.D. (3.2)	KO-10	1	34.5	N.D.	N.D.
	2	31.4	3.7			2	23.9	N.D.	
	3	60.3	3.8			3	32.4	N.D.	
KO-05	1	34.1	N.D.	N.D. (0.5)	KO-11	1	61	N.D.	N.D.
	2	46.1	2.3			2	62.8	N.D.	
	3	44.4	N.D.			3	69.7	N.D.	
KO-06	1	82.4	2.5	N.D. (2.5)	KO-12	1	60.7	5.7	5.9
	2	84.9	2.2			2	52.5	6.3	
	3	85.9	2.9			3	71.2	5.7	

^aN.D.: not detected (MDL: 4.5 mg/kg)

회수율은 약 (94 ~ 96) % 정도 수준이었고, 3개 실험실 평균값 간 유의차가 없는 것으로 확인되었다. Fig. 6에서 본 실험실간 비교 결과를 보여주고 있다.

3.4. 유통되는 크릴오일 제품 중 불소함량 결과

시중에서 주로 유통되는 크릴오일 11개 제품과 국내 생산공장에서 입수한 반제품 1개를 대상으로 개발된 시험법을 사용하여 평가한 결과를 Table 8에서 볼 수 있다. 전체 시험결과는 모두 6 mg/kg 이하의 불

소를 함유하고 있음이 확인되었다. 이는 시험결과에서 확인된 MDL (4.5 mg/kg)을 적용할 시에 KO-12 시료를 제외하면 모두 불검출 수준임을 확인하였다. 즉, 국내 유통되는 주요 제품의 경우 불소함량이 불검출 수준 또는 최대 6 mg/kg이 넘지 않는 수준임을 확인하였다.

3.5. 크릴새우 중 불소함량 결과

크릴오일 추출공정에서는 생산제품의 안전 품질관리를 위해서는 크릴새우에 함유된 불소를 제거해야만

Table 9. Test results of fluorine in krill (Before drying)

Samples	Head ^a (mg/kg)	Shell (mg/kg)	Body (mg/kg)	Tail (mg/kg)
K-1	617	938	134	1,263
K-2	609	1,350	27	802
K-3	675	1,948	128	2,211
K-4	1,563	553	52	1,935
K-5	296	1,378	59	1,896
Range	296~1,563	553~1,948	27~134	802~2,211

^aExcluding eyes hall

Table 10. Test results of fluorine in krill (sample K-5) (After drying)

Samples of K-5	Head ^a (mg/kg)	Shell (mg/kg)	Body (mg/kg)	Tail (mg/kg)
# 1	435	1,071	109	3,270
# 2	702	2,116	158	1,641
# 3	1,051	3,096	321	3,572
# 4	1,387	1,914	270	4,731
Range	435~1,387	1,071~3,096	109~320	1,641~4,731

^aExcluding eyes hall

한다. 이에, 실제 주원료인 크릴새우에서 어느 정도의 불소를 함유하고 있는지 확인하고자 국내 유통되는 크릴새우 5종을 확보하여 수분이 함유된 상태에서 불소함량 분석을 실시하였고, 이 중에서 한 개의 크릴새우(K-5)를 대상으로 60 °C Dry oven에 30분 동안 건조시킨 후 뒤집어서 다시 30분 건조시켜 수분을 최대한 제거한 후에 부위별 건조 전/후 불소함량 시험결과를 Table 9 및 Table 10에서 보여주고 있다. 크릴오일이 생물이거나 각 개체마다 불소함량이 일정하지는 않지만 대체로 몸통 (27 mg/kg ~ 134 mg/kg) 보다는 껍질 (553 mg/kg ~ 1,948 mg/kg)과 꼬리 (802 mg/kg ~ 2,211 mg/kg)에서, 크릴새우(K-5)의 껍질 건조 전 (553 mg/kg ~ 1,948 mg/kg) 보다는 건조 후 (1,071 mg/kg ~ 3,096 mg/kg)에 불소함량이 2 배 이상 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 건조 전에 함유한 수분이 휘발되면서 건조 후의 시료에서 불소 농도가 상승한 것으로 추정된다. 그리고 크릴새우 눈알의 경우, 그 값이 200 mg/kg ~ 300 mg/kg으로 일정한 값을 가지고 있음을 확인하였기에 머리 부분에서는 눈알을 제외하고 시험하였다.

4. 결 론

최근 건강증식 관련 식품원료 및 식품으로 크게 각

광을 받고 있는 크릴오일 제품을 대상으로 불소함량 시험법을 개발하였다. 본 시험법은 오일 제형의 특성을 고려하여 시료 질량 측정 후 별도 시료의 전처리 없이 바로 고온 회화로를 통해 전처리가 가능한 연소-IC 분석법으로 수 mg/kg 수준의 불소에 대한 정성 및 정량분석법을 개발하였다.

개발된 시험법에서 이온크로마토그래프 직선성은 0.5 mg/L ~ 8.0 mg/L 정량범위 내에서 결정계수 (R^2) 값이 0.999 이상의 양호한 직선성을 보여주었고, 정밀도 측면의 재현성은 상대표준편차 (RSD) 1.25% ~ 3.60%이며, 정확도 측면의 회수율은 93.37% ~ 102.0%로 결과가 양호하였으며, 이온크로마토그래프만의 정량한계는 0.36 mg/L 이었다. 그리고 내부표준물질의 사용 여부에 따른 두 개 실험실/시험장비간 결과 차이는 2.48% 이내로 미미한 것으로 확인되었고, 연소-IC를 사용한 매질을 고려한 분석방법 검출한계 (MDL)는 4.5 mg/kg이었다.

확립된 시험법을 국제공인 시험기관 (ISO/IEC 17025) 2곳에 시료의뢰를 통해 본 수행기관과 시험결과를 비교한 결과, 3 개 실험실간 분산분석 통계처리에서 결과 유의차가 없음을 확인하였으며, 개발된 오일 중 불소 시험법을 활용하여 유통되는 크릴오일 제품 11 개를 구입하여 불소함량 시험 결과, 1 개 시료를 제외한 대부분 제품들은 시험법에서 제시한 분석방법 검출한계 미만의 불검출로 확인되었다. 크릴오일의 주원료인 크릴새우의 부위별 불소함량을 분석했을 때, 부위에 따라서 농도가 다르긴 하나 몸통을 제외한 크릴 껍질부는 약 2,000 mg/kg ~ 3,000 mg/kg의 높은 농도의 불소가 검출됨을 확인하였다.

본 연구를 통해 제시된 시험법은 식품류 중 크릴오일 및 각종 오일제형 시료에 대한 불소함량시험 및 관련 연구개발에 적용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처의 연구개발비 (19162식위생033)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. J. C. Hureau, Interaction between Antarctic and Sub-Antarctic marine, freshwater and terrestrial organisms, in "Antarctic nutrient cycles and food webs", W.R. Siegfried, P.R. Condy and R.M. Laws (1985).

2. P. Virtue, R. E. Johannes, P. D. Nichols and J. W. Young, *Marine Biology*, **122**(1), 121-128 (1995).
3. F. J. Kelly, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **98**, 581-585 (1991).
4. G. Singh and R. K. Chandra, *Progress in food & nutrition Science*, **12**, 371 (1988).
5. V. Venugopal, *Marine products for healthcare*. Boca Raton: *CRC Press*, 143 (2009).
6. J. Singh et al., *Int. J. Food and Nutr. Sci.*, **3**(6), 2014-2019 (2014).
7. D. S. Siscovick et al., *Jama*, **274**, 1363-1367 (1995).
8. A. Mortensen et al., *FEBS Lett.* Nov 24;418(1-2):91-7 (1997).
9. Krill Oil Market: Global Demand Analysis & Opportunity Outlook 2023, Published On : April, 2018, Category: FMCG & Food
10. Krill Oil Market Analysis By Product (Liquids, Tablets (Soft Gels, Capsules)), By Application (Dietary Supplements, Functional Food & Beverages, Pharmaceuticals, Animal Food & Pet Food), By Region, And Segment Forecasts, 2018-2025.
11. T. Soevik and O. R. Braekkan, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **36**(11), 1414-1416 (1979).
12. M. Sands, S. Nicol and A. McMinn, *Marine Biology*, **132**, 591-598 (1998).
13. H. Zhang, J. Pan, X. Cheng and B. Zhu, *Antarctic Research*, **4**, 55-61 (1993).
14. T. Soevik and O. R. Braekkan, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **36**(11), 1414-1416 (1979).
15. 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물공전, 제 8. 일반시험법, 2. 식품성분시험법, 2.2 미량영양성분시험법, 2.2.1 무기질, 2.2.1.13 불소, 고시 제2020-24호 (2020.4.14).
16. 식품의약품안전처, 의약품에 관한 기준 및 시험법, 고시 제2020-21호(2020.4.2).
17. 식품의약품안전처, 기능성화장품 기준 및 시험법 중, 일반시험법 “26. 산소플라스크 연소법”, 식품의약품안전처 고시 제2012-89호(2012.8.24).
18. EN 14582:2007 (Characterization of waste-halogen and sulfur content-oxygen combustion in closed systems and determination methods).
19. IEC 62321-3-2 2nd Edition (Determination of certain substances in electrotechnical products Screening-, Cl, Br in polymers and electronics by Combustion-IC).
20. KS M 0180:2009 (산화 열기수 분해후 이온크로마토그래프 검출에 의한 할로젠(F, Cl, Br) 및 황의 시험방법).
21. ASTM D7359-18, Standard Test Method for Total F, Cl and S in Aromatic Hydrocarbons and Their Mixtures by Oxidative Pyrohydrolytic Combustion followed by Ion Chromatography Detection (Combustion Ion Chromatography-CIC).
22. 식품의약품안전평가원, 식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인, 2016.04.
23. AOAC Official Methods of Analysis, Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998).

Authors' Position

Jaehak Jung	: CTO
Soobin Kim	: Researcher
Euisung Chu	: Researcher
Joungmoo Joung	: Senior Researcher