

식품 중 3-monochloropropane-1,2-diol의 분석법 비교 연구

오창환* · 유승석¹

세명대학교 한방식품영양학부, 세종대학교 조리외식경영학과

Comparison of the Analytical Method for 3-Monochloropropane-1,2-diol in Food

Chang-Hwan Oh* and Seung-Seok Yoo¹

Department of Oriental Medical Food and Nutrition, Semyung University,

¹Department of Culinary and Foodservice Management, Sejong University

Abstract The studies for the derivatization of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) were performed mainly as acylation with HFBI (heptafluorobutyrylimidazole), alkylation with PBA (phenylboric acid) and silylation with BSTFA (*N,O*-bis[trimethylsilyl]trifluoroacetamide). Also silylation with MTBSTFA (*N*-methyl-*N*-[*tert*-butyldimethylsilyl] trifluoroacetamide) and acylation with MBTFA (*N*-Methyl-bis[trifluoroacetamide]) were also considered. Except the TBDMS derivative of 3-MCPD, all the derivatives were detected well. The derivatives of 3-MCPD with HFBI, PBA and BSTFA showed below 10 µg/kg which was sensitive enough to satisfy Korea maximum residue limit 0.3 mg/kg. Among the tested adsorbents, Extrelut20 and Florisil were evaluated as the proper adsorbents to eliminate the soy sauce matrix for 3-MCPD. Ethyl acetate was the most efficient eluent with good recovery rate. The desired surrogate compound and internal standard were 1,2-butanediol and 1,2-dibromo-3-chloropropane, respectively. The limit of detection for PB-MCPD and TMS-MCPD were 10.16 and 7.06 µg/kg on GC/MSD, respectively. HFB-MCPD derivative showed the lowest detection limits 2.98 and 5.32 µg/kg by GC/ECD and GC/MSD, respectively.

Key words: 3-monochloropropane-1,2-diol, derivatization, adsorbents, eluent, soy sauce, detection limit

서 론

3-Monochloropropane-1,2-diol(3-MCPD)는 국내에서 1985년 8월 및 1996년 2월에 발생한 소위 “간장파동”의 원인물질로서 인체 유해성 논란을 불러일으킨 이후부터 우리에게 잘 알려진 물질이다. 3-MCPD는 정자수 감소, 정자의 기능 감퇴, 유전독성 및 발암성 등을 유발시킨다는 연구 발표가 있었으나 최근 유전독성에 대한 증거가 미비한 관계로 발암성만 부각되고 있다(1). 3-MCPD는 간장과 같이 식물성 단백질을 산 가수분해하는 과정에서 사용되는 염산과 대두에 존재하는 triglyceride와 반응하여 생성되는 유독한 물질이다(2). 3-MCPD는 유전독성, 생식독성, 신경독성, 신장독성뿐만 아니라 발암성이 매우 우려되는 물질로서 유럽에서는 3-MCPD를 기술적으로 가능한 수준으로 낮출 것을 권고해 왔으며 2002년 4월 5일 기준으로 최대 허용기준치를 0.02 mg/kg(20 ppb)으로 정한바 있다. 이 허용치는 고형물(dry matter) 40%를 포함하고 있는 액상제품을 기준하고 있으며 고형물 100%인 경우는 0.05 mg/kg에 해당하는 수치이다(1,3). 우리나라는 2002년 5월 22일 고시 제2002-24호로 산분해간장 및 혼합간장의 3-MCPD를 0.3 mg/kg 그리고 식물성단백 가수분해물(hydrolyzed vegetable protein; HVP)에서는 1.0 mg/kg으로 잠정허용기준을 규제 관리하고

있다. 3-MCPD의 함유량이 가장 많은 식품은 산분해 간장으로 알려져 있으나, 맥아추출물에서도 0.2 mg/kg까지 검출된 사례가 있는 것으로 알려져 있으며 색깔이 짙을수록 그 양이 늘어나는 것으로 확인된 바 있다. 이외에도 살라미와 같이 발효된 소시지 및 몇몇 가열 식품들에서도 저농도의 3-MCPD가 검출된 사례가 있어 다양한 식품에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다(4).

3-MCPD 분석은 먼저 유기용매인 ethyl acetate나 diethyl ether로 시료를 추출한 후 유도체를 만들어 GC/MSD로 분석하며, 검출한계는 최근 0.005 µg/kg 수준까지 가능해졌다(4,5). 현재 3-MCPD 분석법은 크게 2가지로 구분할 수 있는데 먼저 heptafluorobutyrylimidazole(HFBI)로 유도체화시켜 Gas Chromatograph(GC)/Mass Selective Detector(MSD) 및 GC/Electron Capture Detector(ECD)로 분석하는 방법과 0.2% phenylboric acid(PBA)로 유도체화한 후, GC/MSD 및 GC/Flame Ionization Detector(FID)로 분석하는 방법이 있다. 전자는 AOAC 등재 방법으로, 유럽연합(EU)에서도 사용되며 후자는 현재 우리나라 고시방법으로 기재된 분석 방법이다. 3-MCPD 분석을 위해 AOAC에서 검증된 방법은 검체를 혼합한 정제 컬럼(Extrelut20)을 혼합 용매(diethyl ether와 hexane)로 추출한 후 무수물 상태에서 HFBI로 유도체화하고 GC-MSD로 분석한다. GC/MSD selective ion mode일 경우 *m/z* 453, 291, 289, 275 및 253이온을 선택한다. HFBI로 유도체화했을 경우, 3-MCPD 피크가 5분대로 비교적 빨리 용출되므로 초기온도를 50°C부터 시작하여 분석한다. 반면 국내 고시된 공정 방법에서는 상기와 동일한 방식으로 시료를 혼합시킨 정제 컬럼을 ethyl acetate로 추출한 후 무수물 상태에서 0.2% PBA로 유도체화하고 GC/FID 또는 GC/MSD로 분석하는 방법이다. GC/MSD selective

*Corresponding author: Chang Hwan Oh, Semyung University, 579 Sinwoul-dong, Jecheon-City, Chungbuk 390-711, Korea
 Tel: 82-43-649-1434
 Fax: 82-43-649-1759
 E-mail: och35@semyung.ac.kr or changhwan@hanmail.net
 Received may 9, 2007; accepted June 9, 2007

ion mode일 경우에는 선택이온은 m/z 147, 91, 195 및 104를 사용한다. PBA 유도체 방법은 12분대에 비교적 늦게 용출되므로, 초기의 온도 70°C에서 시작한다.

본 연구에서는 상기 두 방법을 포함하여 문헌에 보고된 기타 여러 가지 3-MCPD 분석방법을 검토하고, 분석조건에 미치는 영향을 비교하였다. 또한 간장 및 기타 식물성 단백질의 소비가 많은 우리나라의 식문화를 고려하여 간장의 유해 독성물질인 3-MCPD의 공식 분석방법 타당성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

유도체화 시약 HFBI, PBA 그리고 정제용 Celite는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA), *N*,*O*-bis[trimethylsilyl]trifluoroacetamide(BSTFA) 및 *N*-methyl-bis[trifluoroacetamide](MBTFA)는 Pierce(Rockford, IL, USA)로부터 구입하였다. 시료 정제용 흡착제 Extrelut-20은 Supelco Inc.(Bellefonte, PA, USA)에서 그리고 Silicagel(Merck, Darmstadt, Germany), Florisil(J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA) 및 LC-diol(Alltech, Lexington, KY, USA) 등을 사용하였다. 또한 3-MCPD 추출을 위한 유기용매로는 용매의 극성을 고려하여, *i*-octane, toluene, ethyl acetate, diethyl ether, hexane 등을 Burdick & Jackson(Muskegon, MI, USA) 등에서 구입하여 사용하였다. 한편, 3-fluoropropane-1,2-diol, 1,2-propanediol 및 1,2-butanediol은 surrogate 표준물질로, 1,2-dichlorobenzene 및 1,2-dibromo-3-chloropropane은 내부표준물질(internal standard)로서 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. GC-MSD 검출조건 확립등에 사용한 중수소치환 3-MCPD(d_3 -MCPD)는 Fluka(Fallavier, France)에서 구매하였다.

분석기기

기기분석은 Agilent 6890 GC와 검출기로 FID, m-ECD 혹은 Agilent 5973 MSD(Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 컬럼은 J&W사(Folsom, CA, USA)의 DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m film thickness)를 이동상 헬륨(1 mL/min)과 함께 사용하였다. 컬럼 오븐은 70°C에서 2분간 유지시킨 후 10°C/min의 속도로 200°C까지 상승시키고 10분간 머문 뒤 280°C까지 30°C/min으로 상승시켜 10분간 유지하는 조건을 이용하였다. 시료는 분할비 15:1로 240°C에서 주입하였으며 MSD는 electron impact mode(70 eV)로 interface 온도는 280°C 그리고 solvent delay time은 3분이었다.

유도체화 반응

3-MCPD를 GC로 분석하기 위한 유도체화 방법은 다음과 같다. 용매(*i*-octane, toluene 또는 ethyl acetate)에 1 μ g/mL의 3-MCPD와 내부표준물질 혼합 표준물 1 mL를 각각 바이알에 취한 후, HFBI 50 μ L, PBA 1 mL, BSTFA, MBTFA, MTBSTFA 각각 100 μ L를 개별 바이알에 첨가하고 수초간 교반한 후 70°C 오븐에서 3분 동안 방치한다. 이때 HFBI를 제외한 PBA, BSTFA, MBTFA 및 MTBSTFA 유도체 시약은 첨가 후 후처리 없이 바로 기기 분석하며, HFBI의 경우에만 증류수 1 mL를 첨가하고 5분간 방치하여 분리된 상층(*i*-octane) 1 mL를 취해 새로운 바이알에 옮겨 담아 소량의 무수황산나트륨으로 5분간 방치하여 수분을 제거한 뒤, 시료로 사용하였다.

흡착제의 영향

시료로부터 3-MCPD의 회수를 위한 흡착 및 용출에 사용되는 고체상 추출용 칼럼으로 기존 공정법상 사용되고 있는 Extrelut20을 포함하여, Celite, Silicagel, Florisil 및 LC-diol 등 5종의 흡착제에 대하여 흡착 및 용출 특성을 비교 검토하였다. 다양한 흡착제에 대한 실험은 matrix dispersion 방법을 이용하였으며, HFBI를 유도체화 시약으로 사용하였다. 시판중인 간장을 시료로 구입하여 1 mg/mL 수준이 되도록 시료에 첨가한 뒤, 각 흡착제에 대하여 3-MCPD의 회수율을 측정하였다.

시료를 10 g 측량한 후 비이커에 담아, 50 mg/mL의 1,2-butanediol 20 μ L를 surrogate 표준물질로 첨가하였다. 그 후 각각의 흡착제와 시료를 충분히 섞어 glass column에 충전하고 상층에는 1 cm 높이로 무수황산나트륨을 충전하였다. 용출용매로 ethyl acetate 250 mL를 분당 10 mL의 속도로 용출시켜 플라스크에 모아 rotary evaporator로 1 mL까지 농축하였다. 최종 농축한 시료는 유도체 바이알에 옮겨 담은 후 40°C heating block에서 약한 질소가스로 소량의 용매가 남을 때까지 날려보냈다. 그 후 *i*-octane 1 mL로 치환한 후, 유도체화 시약인 HFBI 50 mL를 첨가하고 vortex mixer를 이용해 수초간 교반하였다. 70°C 오븐에서 30분간 방치하고, 증류수 1 mL 첨가하여 교반한 후 분리된 상층을 바이알에 옮겨 담아, 무수황산나트륨을 첨가하고 5분간 방치하여 수분을 제거한 뒤, 시료 1 mL에 50 mg/mL의 내부표준물질 1,2-dibromopropane 20 μ L를 첨가하여 GC/MSD로 분석하였다.

용출용매의 영향

시료가 섞인 흡착제로부터 3-MCPD를 추출하기 위한 용매의 영향을 검토하기 위하여 실제 간장시료를 Extrelut20과 혼합한 후, 각각 250 mL의 diethyl ether 및 ethyl acetate로 직접 용출시키는 방법과 hexane + diethyl ether(9:1), hexane + ethyl acetate(9:1) 80 mL로 먼저 컬럼을 세척한 후, diethyl ether와 ethyl acetate로 각각 용출시키는 2단계 용출 방법에 대하여 검토하였다. 유도체화는 HFBI를 사용하여 수행하였다.

Surrogate 및 내부표준물질의 선정

식품의 3-MCPD의 분석을 위해 고가의 d_3 -MCPD를 대체하여 사용할 surrogate 표준물질과 내부표준물질의 반응도를 검토하였다. Surrogate 표준물질로는 3-fluoropropane-1,2-diol, 1,2-propanediol 및 1,2-butanediol이 사용되었으며, 내부표준물질로는 1,2-dichlorobenzene 및 1,2-dibromo-3-chloropropane이 비교 분석되었다. 이때 적합한 각 표준물질의 결정을 위해 HFBI 및 PBA 유도체화 과정을 거쳐 GC/MSD 및 GC/ECD로 분석하여 반응도를 비교하였다. 이때 각각의 surrogate 표준물질 및 내부표준물질은 0.1 g을 취해 총부피가 100 mL가 되도록 용매에 용해시킨 후 20배 희석한 후 surrogate 표준물질은 시료에, 그리고 내부표준물질은 기기분석 직전 20 μ L(1 μ g)를 첨가하여 분석하였다.

결과 및 고찰

유도체화 반응조건

반응시약의 영향: 3-MCPD의 분석을 위한 유도체화 과정에서 유도체 시약으로 HFBI, PBA, BSTFA, MBTFA 및 MTBSTFA를 사용하여 처리한 후 3-MCPD와 d_3 -MCPD의 유도체화 반응 결과를 비교하였다. 대표적으로 HFBI에 의해 유도체화된 화합물들의 EI mass spectrum은 Fig. 1과 같다. HFBI를 포함한 유도체화

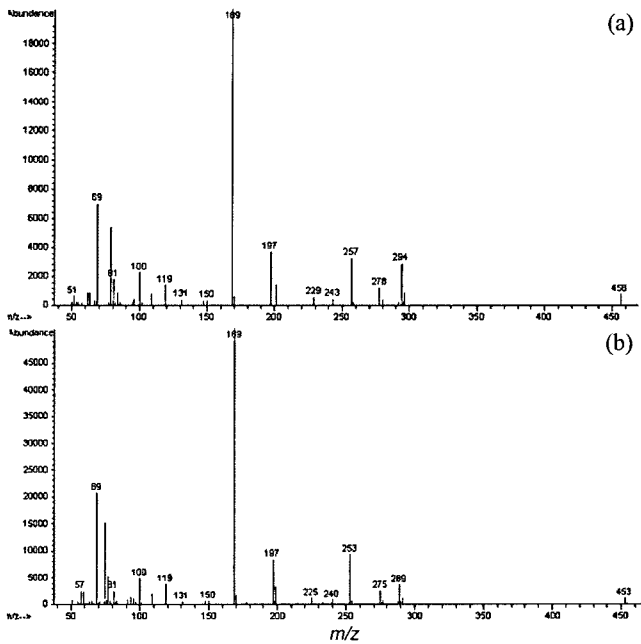


Fig. 1. Electron ionization(EI) mass spectra of (a) heptafluorobutyryl(HFB)-3-MCPD and (b) HFB- d_5 -3-MCPD derivatives.

시약을 사용하여 얻어진 각 화합물의 EI mass spectra의 주요한 fragment ion은 Table 1에 나타내었다.

3-MCPD 분석에 매우 효율적인 유도체 방법(6-9)으로 보고된 HFBI로 acylation 한 HFB- d_5 -MCPD 및 HFB-MCPD 유도체의 피크는 각각 머무름시간 5.71 및 5.77 분을 나타내었으며 major ion으로 m/z 169(C_3F_7)를 공통적으로 가지고 있는 것으로 나타났다. 이때 m/z 169를 제외하면 d_5 -MCPD는 m/z 456, 294, 278, 257이 3-MCPD는 m/z 259, 275, 253이 특징적 이온으로 나타났다. 또한 CH_2Cl_2 이 떨어져 나간 $[M-49]^+$ 이온인 m/z 453 이온도 확인되었다. 한편, PBA를 이용한 alkylation 유도체방법(10-12)은 국내에서 3-MCPD 분석 시 주로 사용하고 있는 방법으로 유도체화 반응 후 별도의 후 처리가 필요 없으며, 반응시간도 짧고, GC/FID로도 분석이 가능한 장점이 있다. 그러나 대상 성분의 diol이 1 및 2 위치로 인접해 있을 경우에만 유도체화가 가능한 제한이 있다. 분석결과 PB- d_5 -MCPD 및 PB-MCPD의 주요 fragment는 각각

m/z 201, 150, 93 및 m/z 196, 147, 91로 나타났다. 이외에도 PB- d_5 -MCPD상에서는 m/z 107, 106 및 104 등이 검출되었다. BSTFA를 이용한 silylation 유도체방법(13,14)은 PBA와 마찬가지로 후 처리가 필요 없으나, 수분에 매우 민감하다. 유도체 반응 결과 TMS- d_5 -MCPD 및 TMS-MCPD의 주요 이온은 각각 m/z 119, 208, 244와 m/z 116, 205, 239로 나타났으며, TMS- d_5 -MCPD 및 TMS-MCPD의 크로마토그램에서 주된 이온인 m/z 147은 $(CH_3)_3Si-O^+=Si(CH_3)_2$ 로 TMS 유도체의 특징적인 이온이다. TMS 유도체의 구조 규명에 손쉽게 사용될 수 있는 $[M-15]^+$ 이온은 TMS- d_5 -MCPD 및 TMS-MCPD에서 각각 m/z 239 및 244로 확인되었다. MBTFA는 BSTFA와 동일한 특징을 갖는데, 유도체의 머무름 시간이 모두 너무 짧은 시간에 용출되어 GC/MSD 분석 시 용매 피크와 겹치는 문제점을 나타내었다. 한편, TBDMS-3-MCPD 유도체 피크는 용출되지 않았으며, 이는 MCPD의 구조상TMS에 비하여 상대적으로 매우 큰 TBDMS 그룹이 steric hindrance로 인하여 두개의 알코올 그룹에 동시에 치환되기는 힘들기 때문인 것으로 추정된다.

반응용매의 영향: 3-MCPD 분석 시 각 유도체 시약은 반응용매에 따라 다른 감응도를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Table 2에 요약하여 나타내었다. 반응 용매로는 *i*-octane, ethyl acetate 및 toluene을 사용하였고, 70°C에서 30분간 가열하여 동일한 조건에서 GC/MSD를 이용하여 비교하였다. 이때 Table 2에서와 같이 HFBI 시약을 이용하여 *i*-octane, toluene 용매 하에서 MCPD를 acylation한 경우 서로 유사한 크기의 HFB-MCPD 피크가 관찰되었으나, ethyl acetate는 물에 대한 용해도가 큰 관계로 과량 사용된 HFBI의 제거과정이 불가능하여 반응용매로는 적절치 못하였다. 그러나 0.2% PBA를 이용한 alkylation은 세가지 용매 중 ethyl acetate에서 가장 큰 PB-MCPD 피크를 얻을 수 있었다. BSTFA를 사용한 MCPD의 trimethylsilylation도 ethyl acetate를 용매로 사용하는 경우 가장 큰 TMS-MCPD 피크를 얻을 수 있었다. Ethyl acetate의 경우 *i*-octane을 사용한 경우보다 약 10배 이상의 TMS-MCPD 피크 response가 관찰되어 BSTFA를 이용한 silylation에 가장 우수한 반응 용매로 확인되었다. 또한 MBTFA 시약을 이용한 TFA-MCPD는 toluene에서 비교적 우수한 response를 나타냈지만 기기 분석 시 용매피크와 너무 가깝게 용출되었으며, 유도체 피크의 크기는 기타 다른 유도체들에 비해 매우 낮은 response를 나타내었다.

Table 1. Major fragment ions in the electron ionization mass spectra from each derivative

Derivatization reagents ¹⁾	Derivatized standards	Major fragment ions (m/z)			
HFBI	3-MCPD	453	289	253	169
	d_5 -MCPD	456	294	257	169
PBA	3-MCPD	196	147	104	91
	d_5 -MCPD	201	150	107	93
BSTFA	3-MCPD	239	205	147	116
	d_5 -MCPD	244	208	147	119
MBTFA	3-MCPD	253	175	153	69
	d_5 -MCPD	256	178	157	69
MTBSTFA	3-MCPD	nd ²⁾	nd	nd	nd
	d_5 -MCPD	nd	nd	nd	nd

¹⁾HFBI: heptafluorobutyrylimidazole, PBA: phenylboric acid, BSTFA: *N,O*-bis[trimethylsilyl]trifluoroacetamide, MBTFA: *N*-Methyl-bis[trifluoroacetamide], MTBSTFA: *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide

²⁾nd: not detected

Table 2. Relative peak areas from each derivative of 3-monochloropropane-1,2-diol on different reaction time at 70°C with various solvent media

Derivatization reagents ¹⁾	Solvent medium	Reaction time (min)			
		10	30	60	overnight
HFBI	<i>i</i> -Octane	145 ± 7	150 ± 0	140 ± 0	40 ± 2
	Toluene	40 ± 1	145 ± 0	150 ± 0	145 ± 1
	Ethyl acetate	²⁾	-	-	-
PBA	<i>i</i> -Octane	20 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	15 ± 2
	Toluene	140 ± 3	140 ± 6	135 ± 4	145 ± 4
	Ethyl acetate	220 ± 7	220 ± 9	210 ± 6	205 ± 12
BSTFA	<i>i</i> -Octane	10 ± 0	50 ± 2	40 ± 1	40 ± 1
	Toluene	50 ± 4	220 ± 15	200 ± 7	200 ± 7
	Ethyl acetate	150 ± 23	390 ± 8	380 ± 4	380 ± 4
MBTFA	<i>i</i> -Octane	10 ± 1	50 ± 2	50 ± 6	40 ± 1
	Toluene	95 ± 2	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 3
	Ethyl acetate	30 ± 6	30 ± 4	35 ± 3	180 ± 9

¹⁾HFBI: heptafluorobutyrylimidazole, PBA: phenylboric acid, BSTFA: *N,N*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, MBTFA: *N*-Methyl-bis(trifluoroacetamide).

²⁾ -: not determined

Table 3. Recovery rate (%) of 1,2-butanediol (surrogate) and 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) from the type of adsorbents

Type (matrix)	Derivatives	Adsorbents				
		Extrelut20	LC-diol	Celite	Silicagel	Florisil
Standard	Surrogate	90.5 ± 1	86.0 ± 2	104.5 ± 0	81.0 ± 3	94.0 ± 2
	3-MCPD	120.0 ± 2	146.0 ± 15	105.0 ± 5	80.0 ± 5	101.0 ± 1
Sample	Surrogate	92.1 ± 3	NT*	92.4 ± 4	101.0 ± 3	87.9 ± 2
	3-MCPD	93.4 ± 1	NT	65.6 ± 18	72.0 ± 10	104.1 ± 3

*not tested.

반응시간의 영향: 3-MCPD 분석을 위한 유도체화 반응 시 반응용매의 종류와 더불어 반응시간이 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉, Table 2와 같이 70°C에서 각각 10, 30, 60분 및 하룻밤 동안 반응한 후 GC/MSD로 분석하였다. HFB-MCPD 유도체화의 경우 *i*-octane 용매에서는 10-60분까지 안정한 반응을 보인 반면, toluene은 30분 이후 안정적인 반응을 나타내었다. 또한 PBA는 ethyl acetate > toluene > *i*-octane의 순으로 우수한 상대 면적비를 보였으며, 반응 직후부터 시간에 따른 영향은 거의 없었다. 또한 TMS-MCPD의 용매별 상대 면적비도 PBA와 동일한 순으로 나타났다으나 모두 30분 이후 안정적인 것으로 나타내어 최저 상대 표준편차를 나타낸 60분 이상의 반응 시간이 바람직함을 확인하였다. MBTFA를 사용한 TFA-MCPD는 *i*-octane의 경우 30분 이후, ethyl acetate는 60분 이내 그리고 toluene은 전반적으로 고른 안정성을 보여주었다. 그러나 ethyl acetate는 overnight 한 경우 급격히 유도체 화합물이 증가한 것으로 보아 Li 등(15)의 보고와 같이 반응 시간이 증가함에 따라 검출하고자 하는 유도체 성분이 분해로 인해 상대적으로 많은 양으로 정량된 것으로 추정된다.

흡착제의 영향

Extrelut20 컬럼을 포함한 Celite, Silicagel, Florisil 및 LC-diol 등 다양한 흡착제를 선택하여 흡착제에 의한 영향을 검토하였다. 이때 matrix dispersion 방법으로 ethyl acetate를 용출용매로 하여 HFBI 유도체 과정을 통해 3-MCPD 표준물 및 실제 시료에서의 흡착제에 대한 회수율을 측정하여 비교하였으며, 그 결과는 Table

3에 나타내었다.

Extrelut20, LC-diol, Celite, Silicagel 및 Florisil의 surrogate 회수율은 각각 90.5, 86.0, 104.5, 81.0 및 94.0%로 양호한 수준을 나타내었으나, 1 µg/mL 수준이 되도록 3-MCPD를 첨가하여 실험한 결과 회수율은 80.0-146.0%로 다양한 범위의 값을 나타냈다. 한편, Celite, Extrelut20 및 LC-diol의 경우, 첨가한 표준물의 양을 초과하는 회수율을 나타내었으며, 회수율이 146.0%에 이른 LC-diol은 3-MCPD 흡착제로는 적합하지 않았다. 그 외의 흡착제인 Extrelut20, Celite, Silicagel 및 Florisil은 3-MCPD 분석에 가능한 것으로 판단되었다. 한편, 시료로 실제의 식품인 간장을 사용하여 3-MCPD를 첨가한 후 얻은 회수율 결과에 따르면 Table 3과 같이 surrogate 회수율은 87.9-101.0%, 3-MCPD는 65.6-104.1%의 범위를 보였다. 이때 Celite와 Silicagel은 surrogate 유도체의 회수율은 양호한데 반해 3-MCPD의 경우 각각 65.6과 72.0%로 상대적으로 낮은 회수율을 나타냈다. 반면, Extrelut20 및 Florisil 흡착제는 92.4 및 104.1%로 우수한 회수율을 보여주어 3-MCPD의 분석에 적합한 것으로 확인되었다.

용출용매의 영향

보고된 자료나 문헌(16-18)에 의하면 3-MCPD의 추출은 주로 ethyl acetate나 diethyl ether를 대부분 사용하는 것으로 알려져 있으며, 또한 ethyl acetate와 diethyl ether는 각각 국내의 고시 및 AOAC의 등재된 용매로서 추출시 분배계수를 고려하여, 본 실험에서는 위와 같은 대표적인 두 종류의 용매에 대한 추출효율을

Table 4. Recovery rate (%) of 1,2-butanediol (surrogate) and 3-monochloropropane-1,2-diol from the type of elution solvent

Type (matrix)	Derivatives	Elution Solvents			
		Diethyl ether	Ethyl acetate	Hexane/DE ¹⁾	
				Diethyl ether	Ethyl acetate
Sample	Surrogate	89.9 ± 3	100.6 ± 0	102.9 ± 2	93.8 ± 1
	3-MCPD	81.5 ± 3	95.2 ± 1	80.1 ± 4	92.1 ± 2

¹⁾Hexane/DE: pre-eluted with hexane/diethyl ether (9 : 1).

²⁾Hexane/EA: pre-eluted with hexane/ethyl acetate (9 : 1).

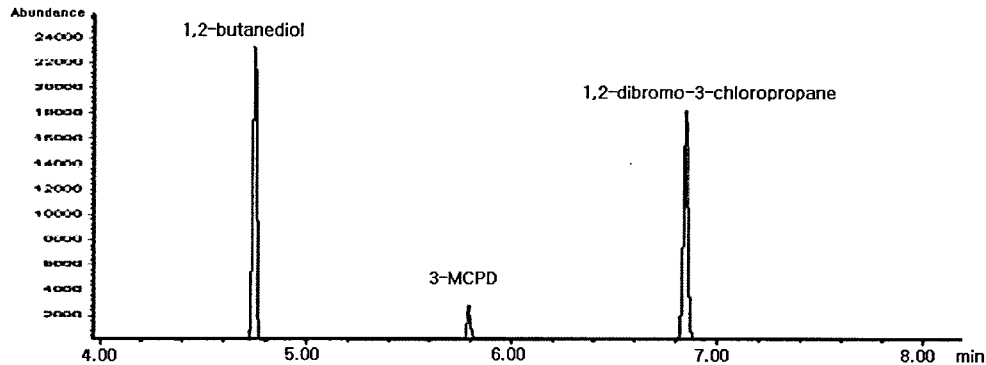


Fig. 2. Total ion chromatogram of heptafluorobutyryl (HFB) derivatives of selected surrogate and internal standard for 3-monochloropropane-1,2-diol analysis. Surrogate standard: 1,2-butanediol (RT; 4.75 min), Internal standard: 1,2-dibromo-3-chloropropane (RT; 6.85 min).

비교하였다. 또한 시료내의 방해물질 제거 효율에 대한 영향을 검토하기 위하여 각 용매로 용출 전 Table 4와 같이 hexane과 용출용매를 섞은 혼합용매로 컬럼을 전처리 후 회수율을 비교하였다. 이때 시료는 간장으로, Extrelut20을 이용하여 용출하고 HFBI로 유도체화하였다. 그 결과 Table 4와 같이 ethyl acetate와 diethyl ether를 용매로 사용하여 용출시킨 3-MCPD 회수율은 diethyl ether에 비해 ethyl acetate가 상대적으로 우수하였으며, 이 결과는 Spyrès(19) 및 Van Bergen 등(6)의 결과와 일치하고 있다. 한편, 각 용매로 용출 전 비극성 천연방해성분의 제거를 위해 hexane을 포함하는 용매인 hexane + ethyl acetate(9:1), hexane + diethyl ether(9:1)를 제조하여 전처리 후 용출한 결과 회수율은 각각 80.1과 92.1%로 MCPD 유도체 피크의 회수율에 거의 영향을 주지 않았다. Surrogate의 경우도 diethyl ether를 추출용매로 사용하는 경우에만 약간의 증가를 나타냈을 뿐 회수율에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다.

Surrogate 및 내부표준물질

3-MCPD의 분석을 위한 적절한 각각의 surrogate 화합물과 내부표준물질 선택을 위한 분리도 및 유도체화 정도를 시험하기 위

하여 각각의 화합물을 HFBI, PBA 유도체 방법으로 처리하였으며, 또한 GC/MSD, GC/ECD 기기상의 감도를 비교 검토하였다. 최종적으로 제안된 surrogate 및 내부표준물질의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. 본 연구에서는 surrogate 화합물로 3-fluoropropane-1,2-diol과 1,2-propanediol 및 1,2-butanediol을 시험하였고, 내부표준물질로는 1,2-dibromo-3-chloropropane과 1,2-dichlorobenzene을 상대 비교하였다. 3-Fluoropropane-1,2-diol은 유도체 반응을 거치지 않았을 경우, 전혀 관찰되지 않았으며 피크의 response 또한 불량한 것으로 확인되었으며 HFBI, PBA에 의한 각 유도체의 머무름 시간은 각각 3.84 및 11.45분 대였다. 1,2-Propanediol도 마찬가지로 유도체 반응을 거치지 않으면 피크관찰이 불가능하였고, HFBI, PBA에 의한 각 유도체의 머무름 시간은 각각 3.85 및 9.28분대였으며, 1,2-butanediol은 각각 4.75 및 10.67분으로 확인되었다. 세가지 surrogate 가능 화합물 중 3-fluoropropane-1,2-diol은 response 값이 너무 낮아 피크 확인이 어려웠고, 1,2-propanediol은 기기상의 response 값은 비교적 높았으나 유도체화 후 용출시간이 너무 빨라 용매 피크와 겹치는 한계점을 나타내었다. 따라서 가장 적합한 surrogate 표준물질로는 1,2-butanediol이 가능한 것으로 판단되었다. 한편, 내부표준물질은 기기분석 전에 시

Table 5. Optimized reaction condition and detection limits of proposed derivatization methods for 3-monochloropropane-1,2-diol analysis

Derivatization reagent	Reaction media	Reaction temp.	MDL ¹⁾	
			GC/MSD	GC/ECD
HFBI	<i>i</i> -Octane	30 min at 70°C	5.32	2.98
PBA	Ethyl acetate	No heating	10.16 ²⁾	- ³⁾
BSTFA		60 min at 70°C	7.06	-

¹⁾Method Detection Limit (MDL) = SD × 3.14.

²⁾ng/mL (ppb).

³⁾not detected.

료에 첨가되고 유도체 반응을 필요로 하지 않은 1,2-dichlorobenzene과 1,2-dibromo-3-chloropropane 중 머무름 시간이 HFB-MCPD의 용출시간 5.8분대와 겹칠 가능성이 있는 5.67분대에 용출된 1,2-dichlorobenzene을 배제한 1,2-dibromo-3-chloropropane이 적합한 내부표준물질로 평가되었다.

검출한계

본 연구에서 분석을 통하여 검증된 3-MCPD 분석방법으로 적합한 유도체화 시약 PBA, HFBI 및 BSTFA 3가지를 사용하여 3-MCPD가 없는 것으로 확인된 양조간장 시료 약 10g에 3-MCPD를 임의로 첨가하여 최적조건에서 검출한계를 측정된 조건 및 결과는 Table 5와 같았으며 세가지 방법으로 반응시킨 최종 3-MCPD 유도체 피크 면적의 상대표준편차는 1.045%로 상호간 거의 동일하였으며 GC-MSD로 분석할 경우 모두 10 mg/kg 이하의 검출한계를 확인할 수 있었다. 정량한계를 검출한계의 3배로 가정할 경우 0.03 mg/kg 이하 수준으로 모두 우리나라의 규제수준 0.3 mg/kg을 충분히 검출할 만한 수준으로 평가되었다. 그러나 유럽의 허용치 0.02 mg/kg을 만족시키기 위해서는 검출한계 5.32 (GC-MSD) 및 2.98 mg/kg (ECD)을 나타낸 HFBI를 사용한 유도체화 방법만이 가능한 것으로 평가되므로 PBA방법이나 BSTFA를 사용한 유도체화 방법의 경우는 최종 시료 액의 양을 현재의 1 mL에서 200 μ L로 5배 농축하여 분석할 필요가 있다고 사료된다.

요 약

간장 중 3-MCPD 분석을 위한 HFBI, PBA, BSTFA 및 MBTFA를 사용한 유도체화 방법 및 시료 정제를 위한 흡착제, 용출용매 및 surrogate, 내부표준물질 등을 검증한 결과 MBTFA를 이용한 acylation방법을 제외한 나머지 세가지 유도체화 방법 모두 0.01 mg/kg 이하의 검출한계를 확인하였으며 정량한계(검출한계 \times 3배)를 고려하더라도 현재의 국내 0.3 mg/kg 기준을 분석하는데 문제가 없는 것으로 판단되었으나 유럽의 허용치 0.02 mg/kg을 분석하기 위해서는 PBA방법이나 BSTFA를 사용한 유도체화 방법의 경우 최종 시료액을 약 5배 이상 농축할 필요가 있다. 한편, 유도체화를 위한 반응조건으로 가열시간 및 온도는 HFBI와 BSTFA를 사용하는 경우 70°C에서 각각 30 및 60분 그리고 PBA는 첨가 직후부터 가열 없이 반응이 완결되는 것으로 나타났다. 흡착제는 Extrelut20 혹은 Florisil 이 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 흡착제로부터의 3-MCPD 용출용매로는 ethyl acetate가 상대적으로 높은 추출능을 보여 주었다. 또한 고가의 3-MCPD 중수 소치환 동위원소 surrogate 물질을 대체하기 위한 surrogate 표준물질로는 1,2-butanediol이 그리고 내부표준물질로는 1,2-dibromo-3-chloropropane이 가장 적합한 것으로 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 연구용역사업으로 수행된 연구 결과이며 분석에 도움을 준 최혜경씨에게 감사 드립니다.

문 헌

1. Institute of Food Science and Technology Trust Fund. Information Statement. 3-MCPD in Foods. Available from: <http://www.ifst.org/uploadedfiles/cms/store/ATTACHMENTS/3mcpd.pdf>. Accessed May 5, 2007.

- Velissek J, Davidek J. Food Standard Agency. The origin and formation of 3-MCPD in foods and food ingredients (C03017, C03018, and C03019). Available from: <http://www.food.gov.uk/science/research/researchinfo/contaminantsresearch/mycotoxins/c03bprogramme/processacrylamideres/c03017/c03017r>. Accessed May 5, 2007.
- Kim JH, Park JM, Kim SH, Hwang MS, Song CW, Kim JG, Yang KH, Kim OH, Yum YN. Study on general toxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol (III). The Annual Report of KFDA 8: 1250-1255 Korea (2004)
- Crews C, Brereton P, Davies A. The effects of domestic cooking on the levels of 3-monochloropropanediol in foods. Food Addit. Contam. 18: 271-280 (2001)
- Hamlet CG. Analytical methods for the determination of 3-chloro-1,2-propanediol and 2-chloro-1,3-propanediol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. 15: 451-465 (1998)
- Van Bergen CA, Collier PD, Cromie DDA, Lucas RA, Preston HD, Sissons DJ. Determination of chloropropanols in protein hydrolysates. J. Chromatogr. 589: 109-119 (1992)
- Colin G, Hamlet A. Analytical methods for the determination of 3-chloro-1,2-propanediol and 2-chloro-1,3-propanediol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. 15: 451-465 (1998)
- Macarthur R, Crews C, Davies A, Brereton P, Hough P, Harvey D. 3-Monochloropropane-1,2-diol in soy sauces and similar products available from retail outlets in the UK. Food Addit. Contam. 17: 903-906 (2000)
- Brereton P, Kelly J, Crews C, Honour S, Wood R, Davies A. Determination of 3-chloro-1,2-propanediol in foods and food ingredient by gas chromatography with mass spectrometric detection: collaborative Study. J. AOAC Int. 84: 455-465 (2001)
- Rodman LE, Ross RD. Gas-liquid chromatography of 3-chloropropanediol. J. Chromatogr. 369: 97-103 (1986)
- Pesselman RL, Feit MJ. Determination of residual epichlorohydrin and 3-chloropropanediol in water by gas chromatography with electron-capture detection. J. Chromatogr. 439: 448-452 (1988)
- Plantinga WJ, Van Toorn WG, Van der S. Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in liquid hydrolysed vegetable proteins by capillary gas chromatography with flame ionization detection. J. Chromatogr. 555: 311-314 (1991)
- Erik K. Determination of 3-chloropropanediol and related dioxolanes by gas chromatography. J. Chromatogr. 605: 134-138 (1992)
- Boden L, Lundgren M, Stensio KE, Gorzynski M. Determination of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol papers treated with polyamidoamine-epichlorohydrin wet-strength resins by gas chromatography-mass spectrometry using selective ion monitoring. J. Chromatogr. A. 788: 195-203 (1997)
- Li DH, Park JM, Oh JR. Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol a for simultaneous GC/MS determination. Anal. Chem. 73: 3089-3095 (2001)
- Lee BM. Safety and risk assessment of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD). J. Toxicol. Pub. Health 18: 1-11 (2002)
- Jin Q, Zhang Z, Luo R, Li J. Survey of 3-monochloropropane-1,2-diol in soysauce and similar products. J. Hyg. Res. 30: 60-61 (2001)
- Chae HJ, In MJ, Kim MH, Han KS. Analysis of 1,3-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol by solid phase extraction. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 183-187 (1997)
- Spyres G. Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in hydrolyzed vegetable proteins by capillary gas chromatography with electrolytic conductivity detection. J. Chromatogr. 638: 71-74 (1993)