KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 42, No. 4, pp. 390~397 (2010)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

건강기능식품 중 잔류용매 분석법 개발 및 모니터링

이화미*・신지은・장영미・김희연・김미혜
경인지방식품의약품안전청 시험분석센터

Analytical Method Development and Monitoring of Residual Solvents in Dietary Supplements

Hwa-Mi Lee*, Ji-Eun Shin, Young-Mi Jang, Hee-Yun Kim, and Meehye Kim
Center for Food and Drug Inspection, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration

Abstract Residual solvents in foods are defined as organic volatile chemicals used or produced in manufacturing of extracts or additives, or functional foods. The solvents are not completely eliminated by practical manufacturing techniques and they also may become contaminated by solvents from packing, transportation or storage in warehouses. Because residual solvents have no nutritional value but may be hazardous to human health, there is a need to remove them from the final products or reduce their amounts to below acceptable levels. The purpose of this study was to develop and evaluate an analytical method for the screening of residual solvents in health functional foods. Furthermore, the aim of this study was to constitute a reasonable management system based on the current state of the market and case studies of foreign countries. Eleven volatile solvents such as MeOH, EtOH, trichloroethylene and hexane were separated depending on their column properties, temp. and time using Gas Chromatography (GC). After determining the GC conditions, a sample preparation method using HSS (Head Space Sampling) was developed. From the results, a method for analyzing residual solvents in health functional foods was developed considering matrix effect and interference from the sample obtained from the solution of solvents-free health functional foods spiked with 11 standards solutions. Validation test using the developed GC/HSS/MS (Mass Spectrometry) method was followed by tests for precision, accuracy, recovery, linearity and adequate sensitivity. Finally, examination of 104 samples grouped in suits was performed by the developed HSS/GC/MS for screening the solvents. The 11 solvents were isolated from health functional foods based on vapor pressure difference, and followed by separation within 15 minutes in a single run. The limt of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), recovery and coefficient of variation (C.V.) of these compounds determined by the HSS/GC/MS were found to be 0.1 pg/mL, 0.1-125 pg/g, 51.0-104.6%, and less than 15%, respectively. Using the developed HSS/GC/MS method, residual solvent from 16 out of 104 health functional products were detected as a EtOH. This method therefore seems to be a valuable extension of analytical method for the identification of residual solvents in health functional food.

Key words: health functional foods, residual solvents, monitoring

서 론

소비자들의 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 건강에 도움을 주는 기능성을 강조하는 제품에 대한 관심과 수요가 급증하고 있다. 제품수요가 다양하고 시장규모가 지속적으로 성장하고 있는 건강기능식품은 특정한 유효성을 나타내기 위하여 고순도로 정제된 원료의 사용이 반드시 필요하다. 특히, 다양한 기능성 소재의 개발을 위해서 먼저 기능성분을 효율적으로 분리정제 및 가공할 수 있는 용매의 사용이 필수적인데, 이는 건강기능식품으로부터 유효성분을 녹여서 특정한 목적 물질을 분리하기 위해서 추출용매를 사용하기 때문이다(1). 따라서, 추출용매는 독성이 없고 용해성이 뛰어나며 향미와 맛에 영향을 미치지 않는 것을 선정하여야 한다. 그러나, 대부분의 용매는 유기용매이므로 인체에 유해하고 식품에 잔존하는 경향이 많으므로 각 국가에서는 용매 사용에 많은 제한을 두고 있다. 제품에 사용된 용매의 안전성은 제품 중의 잔류하는 용매의 양에 대한 미량 분석 방법을 확립함으로써 안전성을 판단할 수 있다(2).

또한, 현행 규정에 의하면 건강기능식품을 제조하기 위해 사용되는 용매는 통상적으로 일반식품을 제조하는데 사용되는 용매인 물, 주정(발효주정), 에테르, 아세톤, 이소프로필알콜, 헥산, 이산화탄소만을 사용할 수 있다(3,4). 따라서, 건강기능식품은 그 제품의 안전성과 기능성에 근거하여 제품의 순도 규격 및 제품의 안전성 평가를 통하여 관리가 필요한 실정이나 건강기능식품 중 잔류용매 분석에 관한 시험법은 별도의 규정 없이 관련 공정서인 첨가물 공전의 80. 파프리카추출색소의 순도시험 중(4) 잔류용매 시험방법으로 분석할 수 있다(5). 이 방법은 일부 용매에만 적용되고 시료 전처리로서 증류수를 사용하고 있는 제한점이 있다. 따라서, 건강기능식품 중 잔류용매 시험법을 확립하여 건강

*Corresponding author: Hwa-Mi Lee, Hazard Substance Analysis Division, Center for Food and Drug Inspection, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration, Incheon 402-835, Korea
Tel: 82-32-450-3212
Fax: 82-32-429-3388
E-mail: lhm9904@kfda.go.kr
Received November 3, 2009; revised March 1, 2010;
accepted March 2, 2010

기능식품에서의 잔류용매분석에 대한 체계적인 자료를 구축, 과학적이고 체계적인 잔류용매 관리의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

표준액

11종의 용매 표준품은 hexane, heptane, MeOH 그리고 methylene chloride 4종과 ether, acetone, ethylacetate, methylethylketone, isopropanol, ethanol 그리고 trichloroethylene 7종을 2개의 group으로 나누어 톨루엔으로 희석하여 일정한 농도의 표준용액을 제조하였다. 잔류용매분석을 위하여 화학적으로 유사한 용매는 표준용액을 혼합하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용된 용매는 isopropanol(IPA, HPLC grade, Dae Jung, SeouL, Korea), hexane, ethylacetate(EA) 및 methylenechloride (MC) (HPLC grade, Burdick&Jackson, Ulsan, Korea), heptane (HPLC grade, Tedia, OH, USA), acetone, methylethylketone (MEK), ethanol(EtOH), trichloroethylene(TE) 및 ether(HPLC grade, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다. 시료 전처리에 사용되는 물 및 이동상은 초순수를 사용하였다. 모든 실험기구는 분석기기 GC, HSS 및 질량분석기에 영향을 받지 않도록 PP, 테프론 재질 및 환경분석용의 초자 실험기구를 사용하였으며, 초순수로 세척 후 사용하였다.

기기분석조건

본 실험을 수행하는데 사용하는 주요 분석기기는 Gas Chromatograph(GC)와 GC/MS(MS Spectrometer)로서, GC는 GC 2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan)를, 검출기는 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector, FID, Shimadzu, Kyoto, Japan)를, column은 DB-1, DB-5, DB-1701, DB-Wax 그리고 DB-FFAP(0.25 mm I.d. ×30 m, 0.25 μm, Agilent, Palo Alto, CA, USA)와 carrier gas로 99.99% helium gas를 사용하였다. GC/MS의 GC는 CP-3800 (Varian, Palo Alto, CA, USA)을 MS는 1200L(Varian)로서 quadrupole analyzer를 사용하였으며 데이터 처리 및 기기운용 프로그램으로서 Varian MS software 6.6를 사용하였다. 건강기능식품 중 잔류용매 분석법 확립을 위하여 11종의 용매 중 hexane, heptane, MeOH 그리고 MC 4종과 ether, acetone, EA, MEK, IPA, EtOH 그리고 TE 7종을 2개의 group으로 나누어 구분하였다. 분리에 적합한 칼럼을 선정하기 위하여 2개의 그룹으로 나눈 용매 수 ppm 표준용액을 제조하여 용매의 끓는점과 극성도를 고려, 비극성인 DB-1과 DB-5, 중간극성인 DB-1701, 그리고 극성 칼럼인 DB-Wax 과 DB-FFAP에서 각각의 분리도를 확인하였다. 이들의 분리도를 근거로 하여 용매 분석에 적합한 칼럼을 선정한 후 GC 주입기 온도, 칼럼 온도 기울기 조건, 칼럼의 flow 및 split ratio등의 GC 조건을 확립하였다. Column을 포함한 GC의 분리 조건의 최종 확인을 위하여 시료 타입별 메트릭스 효과 및 불순물에 대한 간섭을 확인한 후, 최종 GC 조건을 확립하였다.

또한, head space sampling(HSS) 방법을 확립하기 위하여, GC/MS의 MS 조건을 먼저 확인하고자 용매 11종을 GC/MS 시스템에 주입하여 MS 스펙트럼 및 각 용매의 retention time(R.T.)을 확인하고 용매 cut-off 시간을 정하였다. HSS의 조건을 확립하기 위하여 건강기능식품 중 멀티비타민 파우더, 키토산, 클로렐라 등이 들어있는 gas tight bottle에 용매 각 성분을 syringe로 spike하여 HSS의 파라미터인 가열온도와 시간에 대한 실험을 수행하여 HSS/GC/MS 방법을 확립하였다(6-9). 확립한 HSS/GC/MS 방법을 검증하기 위하여 정밀성, 정확성, 직선성, 회수율 및 감도 등에 관한 실험을 수행한 후 검체 중 잔류용매 모니터링을 실시하였다. 균질화된 영양보충용제품 5 g 시료에 용매 11종 100 μL를 spike하여 HSS 전처리방법으로 5번 시행분석하였다. 감도는 바탕선의 값에 대한 용매의 감도가 3.3이상인 농도를 구하였고, 정밀성은 각 용매 표준품 면적의 표준편차를 피이크 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율 CV(Coefficient of variation, %)로서 구하였고, 정확성(accuracy)은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였다.

Table 1. The number and the name of classified health functional food of purchased samples in markets

Class of health functional food	Name of health functional food	No. of sample
1	Nutritional supplements	20
2	Ginseng products	2
3	Red ginseng products	6
5	EPA & DHA	10
6	Royal jelly	3
7	Yeast products	2
8	Pollen products	2
9	Squalene	3
10	Enzyme	1
11	Lactic acid bacteria products	2
12	Chlorella	2
13	Spirulina	4
14	Gamma linolenic acid	7
15	Germ oil	1
17	Lecithin	1
18	Octacoanol	2
20	Grape seed oil	2
21	Plant extract fermented food	1
22	Mucopolysacharides	1
23	Chlorophyll products	1
24	Mushroom products	1
25	Aloe and aloe vera	3
26	Plum extract	1
27	Soft-shelled turtle products	1
28	β-carotene	2
29	Chitosan	1
30	Chito-oligosaccharide	1
31	Glucossamine	9
32	Propolis	1
33	Green tea extract	1
35	Phytosterole	1
36	Fructooligosaccharides	1
	Banaba*	1
	Co Q10*	1
	Dietary fiber*	6
	Total	104

*Product-specific

시료의 처리

정・과립・환제품은 시료의 균질화를 위해 막자사발로 분쇄하여 시료를 채취하고 분말제품이나 액상제품은 일정량을 바로 취

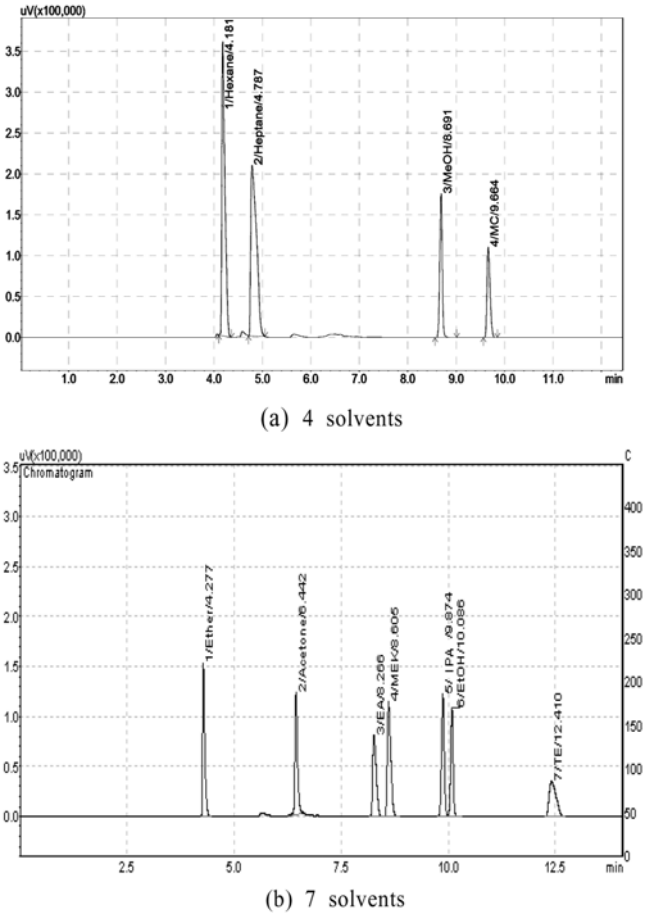


Fig. 1. Gas chromatograms of 11 solvents within 13 min with the DB-wax column

하고 캅셀제품은 캅셀 안의 내용물 일정량을 취하였다. 시료는 무게 약 2 g을 취하여 HSS용 20 mL vial에 넣고, 이미 확립한 HSS의 조건 80°C에서 10분간 가열한 후, vial 상층부에 있는 vapour 100 μL를 주입하여 실험을 수행하였으며, 분석 조건 검증을 위하여 총 104건의 건강기능식품 시료를 분석하였다. 이들 시료는 40개 품목의 제품군으로서 고시형 제품을 주로 구입하였고, 판매처와 제품 다양성으로 서울경기지역을 중심으로 제품을 수거하였으며, 시료의 목록은 Table 1에 나타내었다. 건강기능식품의 제품형태는 건강기능식품공전(4)에 수록하고 있는 정제품, 캅셀제품, 환제품, 과립제품, 액상 및 분말 형태로서 프로폴리스 제품의 경우 액상, 정제품 및 캅셀제품을 포함하여 6종 제품 유형의 검체를 분석하였다.

결과 및 고찰

Column 및 GC 분리 조건 확립

용매의 분리를 위해 GC 분석을 수행하였으며, 비극성, 중간 극성, 극성 칼럼을 사용하여 비교 실험을 수행하였다. 분리하고자 하는 용매 중 hexane, ether, TE, MC 그리고 EA가 비극성이므로 먼저 비극성 칼럼에 대한 분리도 실험을 수행하였다. 비극성 칼럼 DB-1, DB-5는 용매간의 분리가 거의 일어나지 않았으며, 중간극성인 DB-1701의 경우에도 ether와 EA가 겹쳐 하나의 peak처럼 보였다. 또한, acetone, hexane, IPA, MC, MEK는 거의 겹쳐 나오는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 비극성 칼럼은 11종의 용매를 분석하기 위한 적당한 칼럼이 아님을 알 수 있었다. 이는 극성이 큰 용매는 비극성 칼럼에서 분리되지 않은 채 용리되고, 비극성인 성분은 극성도와 용매의 끓는점 및 분자간 결합력에 의하여 기인한 것으로 설명되어질 수 있다.

Table 2. Elution order of 11 solvents at the DB-Wax and DB-FFAP column

Solvent	Gravity	R.T. (min)/Elution order	
		DB-Wax column	DB-FFAP column
Hexane	0.66	4.17	2.379
Ether	0.71	4.25	2.418
Heptane	0.68	4.77.	2.715
Acetone	0.79	6.42	4.011
EA	0.90	8.24	5.421
MeOH	0.79	8.66	5.697
MEK	0.81	8.59	5.796
IPA	0.79	9.86	6.554
MC	1.33	9.64	6.782
EtOH	0.79	10.06	6.824
TE	1.46	12.37	8.547

극성인 칼럼 DB-Wax와 DB-FFAP에 2그룹으로 나눈 11종의 용매를 분석한 결과, alcohols, hexane 및 heptane의 분리 조건을 좀 더 개선하면 용매 분석에 대한 적합성을 나타낼 것으로 예측되어 최적 조건을 찾기 위한 칼럼 온도, 유속 등에 한 변수를 변경하여 실험을 수행하였다. 용리 순서는 hexane-ether-heptane-acetone-EA-MeOH-MEK-IPA-EtOH-MC-TE로서 7분대에서 나오는 heptane 과 MEK 피크는 broadening이 나타나고 EtOH과 MC는 겹쳐(overlap) 보였다. 분리도 개선을 위하여 GC 주입기의 flow와 split ratio를 변경하여 DB-Wax 칼럼에서 용매 11종을 분석한 결과, 극성인 칼럼 DB-Wax에서의 분석결과는 Fig. 1에서와 같이 11개의 용매가 4분 이후부터 13분 이내에 모두 검출되었다. DB-Wax에서의 용리순서는 hexane-ether-heptane-acetone-EA-MEK-MeOH-MC-IPA-EtOH-TE로서 Table 2에 그 결과를 나타내었다.

극성인 칼럼 DB-Wax에서의 분석조건은 초기온도 33°C를 시작으로 하여 초기를 설정하고 5분간 유지를 하였으며, 50°C까지 5°C/min의 승온한 후 5분간 유지하면서 용매를 분리하였다.

HSS/GC/MS 조건 확립

위의 결과를 바탕으로 GC의 극성 칼럼 온도 및 시간 등의 분리 조건을 적용하여 각 용매에 대한 GC/MS 조건을 확립하고 최종적으로 HSS 조건을 확립하는 실험을 수행하였다. 먼저, 극성인 칼럼 DB-FFAP로 전환하고 이 칼럼에 적합한 온도조건을 확립하여 11종의 용매를 확인하였다. 용리 순서는 극성도가 같으므로 DB-Wax에서의 결과와 순서는 같고 초기온도는 FFAP의 분석 가능 범위로서 DB-Wax칼럼보다 조금 높은 40°C부터의 조건을 바탕으로 하여 DB-FFAP의 조건을 확립하였다. 용리시간은 DB-Wax보다 빨라져서 9분이내로 나타났으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. DB-Wax column을 장착하여 flame ionization detector (FID)를 검출기로, DB-FFAP column을 장착하여서는 quadrupole MS Spectrometer로 확인하였으며, 위의 결과를 바탕으로 HSS의 조건 확립을 위한 실험을 수행하였다.

분리하고자 하는 용매는 모두 formula weight(F.W.) 150 이하, 끓는점 100°C 이하이며, 용매 11종을 녹이는 용매로서 톨루엔은

Table 3. MS condition of GC/MS at the DB-FFAP column

MS parameter	Analytical condition	HSS parameter	Analytical condition
Detector	Quadrupole	Syringe temp.	100
Ionization	EI	Agitator temp.	80
MS range	30-250 Da	Incubation time	10 min
Analytical time	0-15 min	Sample agitator	Agitate & Heat

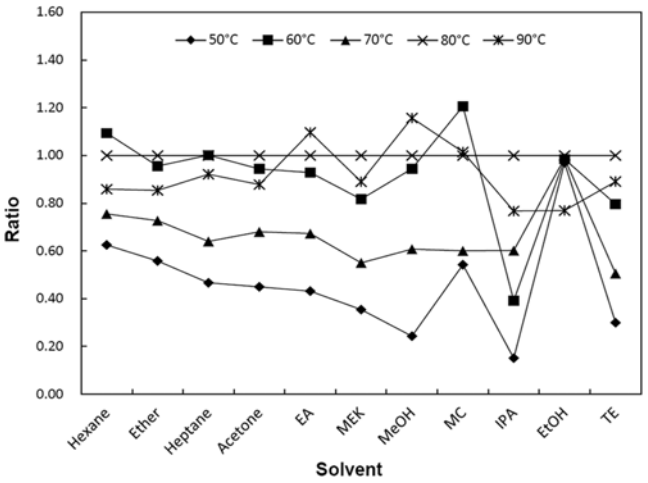


Fig. 2. Relative comparison of responses of 11 solvents at the various temp. based on the gas chromatograms acquired at 80°C of HSS

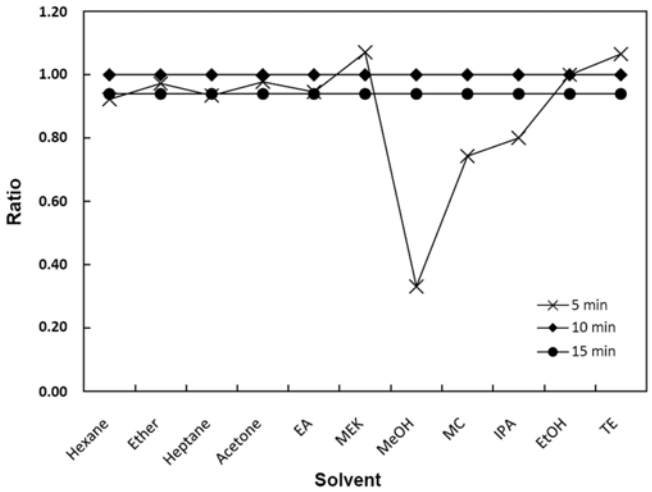


Fig. 3. Relative comparison of responses of 11 solvents at the various time based on the gas chromatograms acquired at 10 min of HSS

극성 칼럼에서 분석물질인 11종 용매보다 나중에 나오는 것을 확인하고 MS Spectrometer(MS)의 분석 범위를 확립하였다. 그 결과, DB-FFAP column에서 용매 11종을 GC/MS에서 질량분석기의 분석범위는 30-250 Da, 분석시간은 15분까지 0.5초마다 scan하는 조건을 확립하였으며 그 조건에 대한 데이터는 Table 3에 나타내었다.

건강기능식품이 들어있는 gas tight bottle에 용매 각 성분을 syringe로 spike하여 HSS의 온도별, 시간별 변수에 따른 결과를 확인하여 HSS의 조건 확립 실험을 수행하였다.

HSS의 파라미터로서 온도와 시간 중에 먼저 온도에 대한 실험으로서 용매의 물리적 성질을 근거로 11종 용매 약 100 ppm 농도의 혼합용액 100 μL를 주입하고 50, 60, 70, 80, 및 90°C에서 온도별 5회씩 총 45회의 실험을 수행하였다. 온도별 얻은 크로마토그램을 비교한 결과 80°C에서 가장 높은 감도를 보이는 것을 알 수 있었다. HSS의 조건 중 온도 80°C에서 얻은 크로마토그램에서 각 용매 11종의 면적 값을 기준으로 하여 다른 온도에 따른 검출값의 비교 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, 5번의 평균값을 통해서도 HSS 조건 중 80°C가 제일 적합한 파라미터임을 알 수 있었다. 이는 용매의 물리적 성질에서 용매의 끓는점이 제일 높은 heptane, TE의 경우에서 알 수 있듯이 높은 온도 80°C가 vapour 생성에 유리하고 오히려 90°C는 vapour의 운동성을 증가시켜 용매 소실의 우려가 있을 수 있는 가능성을 시사해 준다.

HSS의 파라미터로서 시간에 대한 실험으로서 앞서 HSS 온도 조건 실험 수행 결과를 근거로 80°C의 온도를 고정하고 11종 용매 약 100 ppm 농도의 혼합용액 100 μL를 주입하고 5, 10, 및 15분에서 실험을 수행하였다. 시간별 비교한 결과 10 min에서 가장 높은 감도를 보이는 것을 알 수가 있었다. HSS 조건 80°C, 10분에서의 데이터를 기준으로 하여 온도에 따른 검출값 비교를 Fig. 3에 나타내었으며, HSS 조건 중 시간은 10분이 제일 적합한 파라미터임을 알 수 있었다.

HSS/GC/MS를 이용하여 잔류용매에 대한 분석조건을 최적화함으로서 각 잔류용매성분에 대한 peak의 width를 줄이고 hight를 높이는 조건을 찾은 결과는 Table 3에 나타내었고, 총 11종에 대한 분리 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. HSS/GC/MS 시스템에서 HSS는 시료의 전처리 장치이자 자동주입기이며 GC는 성분 분리, MS는 분리된 성분을 확인하는 역할을 수행하는 것이다.

시료의 처리는 메트릭스 효과 및 불순물에 의한 간섭을 파악하여 주위환경 및 분석 여건에 크게 영향을 받지 않는 분석 조건을 최종 확립하고자 메트릭스별 HSS를 통해 얻어진 MS Chromatogram을 비교 검토하였다. HSS는 가열되어 발생한 vapour를 분석하는 것으로서(10-12), Fig. 7과 같이 메트릭스에 상관없이 바탕선에 영향을 주지 않는 것으로 확인 되었다. 이는 휘발성 물질만이 GC 시스템에 도입됨으로써 GC 시료 주입구, 검출기 그리고 컬럼을 보다 오래 동안 깨끗하게 사용할 수 있어 일반적인 GC 유지 보수 횟수와 시간을 현저히 줄일 수 있는 장점을 가진다는 것을 통해서도 알 수 있었다(10-15).

HSS/GC/MS의 method validation

앞서 설명한 시료의 처리에서와 같이 HSS/GC/MS로 분석하였을때 얻어진 전형적인 크로마토그램은 Fig. 6과 같았다. 성분 11종에 대한 머무름 시간은 Table 2에서와 같이 2분에서 9분이내에 검출되고, 사용한 톨루엔의 MS로의 검출을 막기 위하여 분석시간을 15분이내로 제한하였다. 얻은 크로마토그램을 용매가 들어있지 않은 블랭크 검체의 크로마토그램, Fig. 5과 비교하여 볼 때 확립한 HSS/GC/MS 분석조건에서 용매 성분 11종에 대한 분리 상태가 양호함을 알 수 있었다.

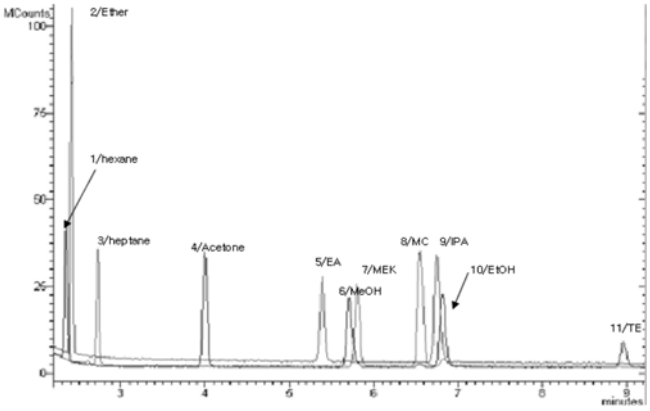


Fig. 4. MS chromatogram of 11 solvents using HSS/GC/MS

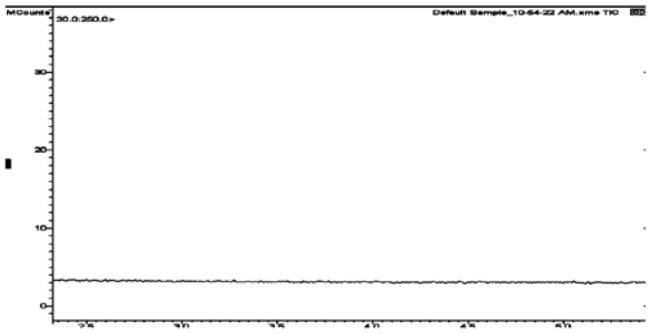


Fig. 5. MS chromatogram of blank sample

또한, 각 시간대에 나오는 용매에 대한 크로마토그램은 MS spectrum 정보가 있으며 각 11종에 대한 정성확인이 되며 아래 Fig. 7a에서와 같이 MS chromatogram은 2 min 근처의 MS spectrum 확인결과 hexane임을, Fig. 7b에서는 MC임을 알 수 있도록 정보를 제공하는 장점이 있다. 이는 MS가 시간에 따른 세기의 정보와 더불어 각 세기에 해당하는 기체 이온에 대한 정보를 갖는 검출기로서 분자확인에 대한 정보를 제공하는 것을 알 수 있었다(16).

실험방법 중 표준액에서와 같이 4종, 7종으로 분류된 용매 각각을 1mL씩 혼합한 후, 혼합액을 10, 20, 50, 100, 및 500배 희석하였다. 영양보충용제품 시료 5 g이 든 HSS vial에 희석한 용액 4종은 0.25, 2.50, 12.50, 25.00, 62.50 및 125.00 pg/g이 되도록, 7종은 0.14, 1.43, 7.14, 14.29, 35.71 및 71.43 pg/g이 되도록 100 μL를 spike하였다. Table 3에서와 같은 HSS 조건으로 시료를 처리하여 HSS/GC/MS로 분석하여 11종 용매의 검량선을 구하였다. Hexane의 검량선의 계산식은 y=1458.7E+04X+1.12E+09 (r^2=0.9793)로서, 0.1-125 pg/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었으며, 나머지 10종의 결과에서도 평균 상관계수(r^2)는 0.9961로 직선성을 나타내었다. Table 4은 용매 11종에 대한 검량선의 기울기, y 절편 및 상관계수를 나타내었다. Table 4에서와 같이 HSS/GC/MS 분석방법은 정량성이 뛰어남을 알 수 있었다. 또한, 이 방법은 잔류용매의 정량에 대한 분석법으로 활용될 가능성을 보여주었다. 기존 식품 첨가물공전의 증류두 방법(5)은 ppm level에서 분석을 수행하지만 제한된 용매를 사용하고 비중에 따라 증류두를 다르게 사용하며, 냉각탑의 효율에 따라 회수된 용매의 소실이 우려된다. 그러나, 본 연구에서 수행하는 HSS/GC/MS 방법은 closed system으로서 증기화된 용매를 주입하여 정량하는 분석방법이다. 따라서, HSS/GC/MS 방법은 잔류용매 분석에 관한

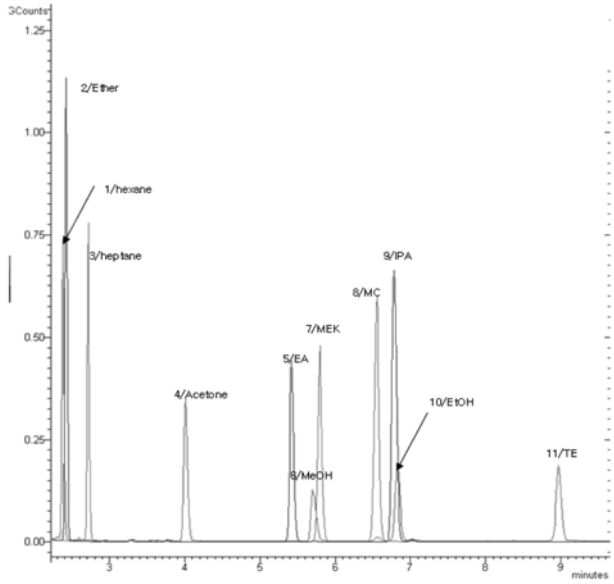


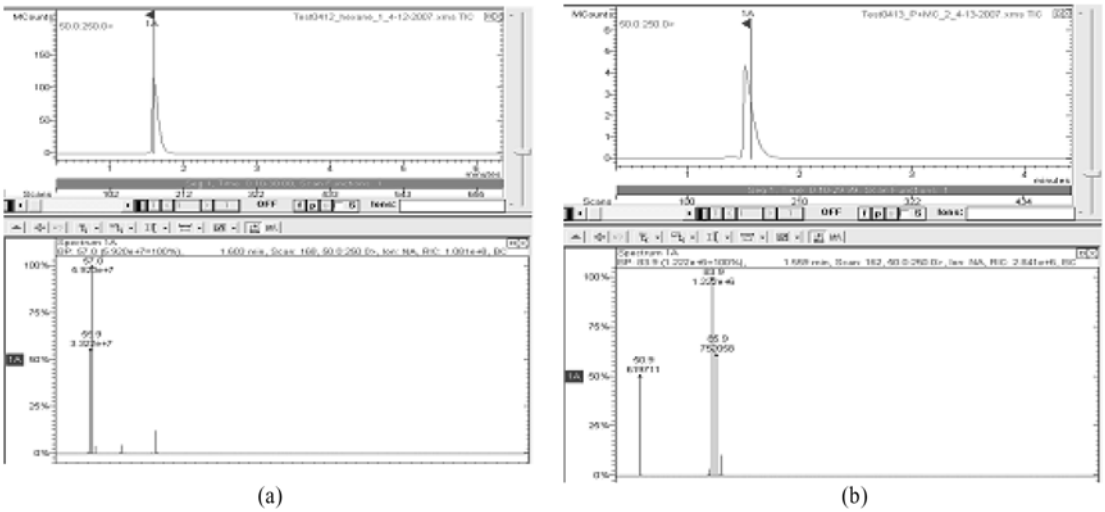
Fig. 6. MS chromatogram of 11 solvents spiked into blank sample

정량 및 정성 그리고 스크리닝 할 수 있는 가능성을 시사해 줌을 알 수 있었다. 또한, 이러한 가능성이 미량의 유해물질이 혼입되었을 경우에도 검출이 용이하게 될 수 있음을 시사해 준다. 이러한 HSS/GC/MS 방법은 유해물질의 정량방법에 이미 널리 사용되고 있다(10-15,17-20).

검체별 평가는 균질화된 영양보충용제품 5 g 시료에 11종의 표준품 100 μL를 주입하여 5번 시행하였다. 정밀성은 각 용매 표준품 면적의 표준편차를 피이크 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율 CV(coefficient of variation, %)로서 구하였고, 정확성(accuracy)은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였다. Table 4는 용매 11종에 대한 정확성과 정밀성을 나타내었다. 정확성의 평균치는 100.4%로서 용매 11종에 대하여 정밀성과 정확도를 구하였고, overall mean CV(%)와 overall mean accuracy(%)를 Table 4에 나타내었다.

감도는 크로마토그램상에서 얻어진 peak의 신호대 잡음비(S/N ratio)를 3.3으로 검출한계로 하고, 신호대 잡음비 10을 정량한계로 하여 구하였으며, Fig. 8a는 정량한계를 구하고자 하는 크로마토그램이다. 아래 Fig. 8a는 TE의 신호대 잡음비를 구하는 것으로서 TIC(Total ion chromatogram)에서 8.9 min대의 바탕선과 peak의 세기를 구하는 방법을 소개하였다. 4종의 경우 0.25 ppm 농도의 S/N ratio를 나타낸 것이 Fig. 8b이고, 7종의 0.143 ppm 농도의 S/N ratio를 나타낸 것이 Fig. 8c이다. 데이터를 비교분석한 결과 EtOH를 제외하고 S/N ratio가 모두 10 이상으로 용매의 정량한계는 ppm level임을 확인 할 수 있었다. GC/FID와 GC/MS의 검출한계를 비교분석하기 위하여 0.1 ppm의 용매 4종, 7종 표준액의 검출한계를 구하였다. 구한 결과를 Table 5에 나타내었고 두 기기간의 정량한계는 오히려 GC의 검출기가 더 낮은 것을 알 수 있으며 두 기기 모두 ppm level에서 정량성을 가짐을 알 수 있었다.

시료 5 g에 용매 7종 혼합액과 4종 혼합액 각각을 100 μL씩 주입하여 11종의 HSS의 회수율을 구하였다. 회수율 결과는 Fig. 9과 같이 90.4%정도 나타내는 것을 알 수 있었으며, 알코올 종류 중 MeOH의 회수율이 가장 낮았다. 이는 시료 타입별 회수율 결과인 Fig. 10에서와도 유사한 결과를 나타내었다.

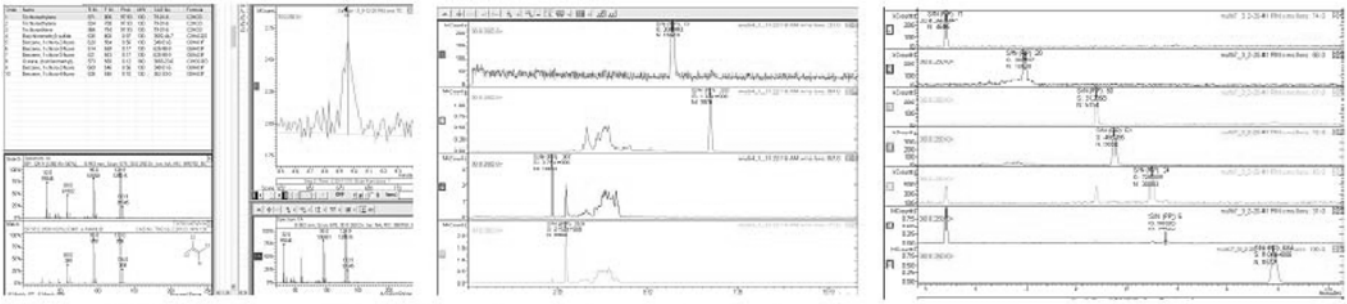


(a) (b)

Fig. 7. (a) Chromatogram (upper) and MS spectrum (lower) of hexane and (b) chromatogram (upper) and MS spectrum (lower) of MC using HSS/GC/MS

Table 4. Linearity, reproducibility and accuracy data of 11 solvents using HSS/GC/MS

Solvent	Slope	Intercept	R^2	Mean CV (%)	Accuracy (%)
Hexane	14587000	1.12E+09	0.9793	1.7	100.9
Ether	21368000	4.64E+08	0.9939	2.7	100.1
Heptane	16697000	4.54E+08	0.9969	1.7	101.6
Acetone	19180000	2.56E+08	0.9979	5.1	101.5
EA	24156000	6.23E+06	1	9.3	99.3
MEK	21941000	4.63E+07	0.9999	10.5	98.1
MeOH	17690000	2.78E+08	0.9986	1.9	102
MC	24589000	1.04E+09	0.9923	3.2	103.6
IPA	24367000	2.70E+08	0.9987	13.9	97.4
EtOH	20573000	1.34E+08	0.9996	12.5	100.9
TE	36169000	-1.77E+08	0.9997	10.5	98.4
	Overall mean		0.9961	6.6	100.4



(a) (b) (c)

Fig. 8. (a) Library search data (left), MS spectrum (below of right) and signal to noise (upper of right) of TE, (b) 4 solvents and (c) 7 solvents in MS chromatogram

HSS의 전처리로 인한 회수율은 Fig. 9과 같이 용매별 회수율의 편차가 적고 회수율이 높은 것으로 보아 이는 closed system에서의 휘발된 용매의 소실이 적은 것으로 이해될 수 있으며 Table 6에 그 결과를 나타내었다. HSS로 용매를 spike한 시료의 전처리 결과, 회수율은 51.0-104.6%, 평균값은 87.9% 그리고 CV(%)는 0.0-38.1%이고 CV 평균값은 6.9%였다. 시료 전처리 HSS의 회수율의 저하는 MeOH를 제외하고 거의 없음을 알 수 있다. 그러나 MeOH에 대한 회수율을 높이기 위한 연구가 요구된다.

확립한 HSS/GC/MS법에 대한 용매 11종의 머무름 재현성을 살펴 보았다. 앞서, 각 성분에 대한 세기의 재현성을 이미 Table 6에서 CV(%)로 고찰하였으므로, 여기서는 머무름의 재현성을 분석하였다. 용매 11종의 멀티비타민 제품에서 각 용매별 5회씩, 총 55회의 결과를 통하여 각 성분을 분석하였으며, 각 성분의 표준 농도에서 머무름의 CV(%)는 0.15-0.55이고 평균치는 0.32였다. 따라서, 건강기능식품 중 용매 11종에 대한 본 HSS/GC/MS 분석법은 건강기능식품 중 잔류용매 검사 방법에 이용될 수 있는 충분

Table 5. Signal to noise ratio (S/N) of GC and GC/MS at 0.1 ppm

Solvent	S/N ratio	
	GC	GC/MS
Hexane	95	84.2
Ether	46	21.8
Heptane	53	66
Acetone	94	12.8
EA	25	23.4
MEK	46	19.8
MeOH	65	25.2
MC	23	29.2
IPA	34	8
EtOH	28	4.8
TE	11	30.6

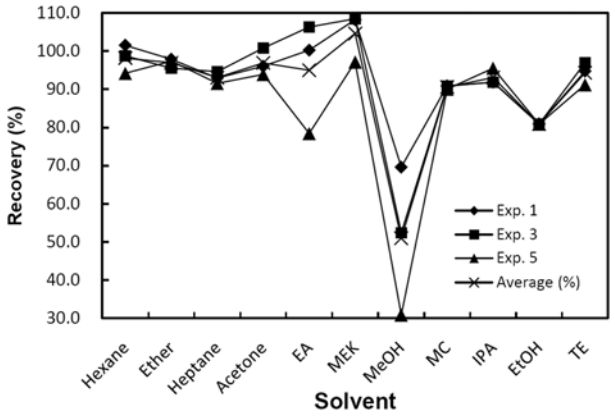


Fig. 9. Recovery data of 11 solvents in HSS/GC/MS chromatograms

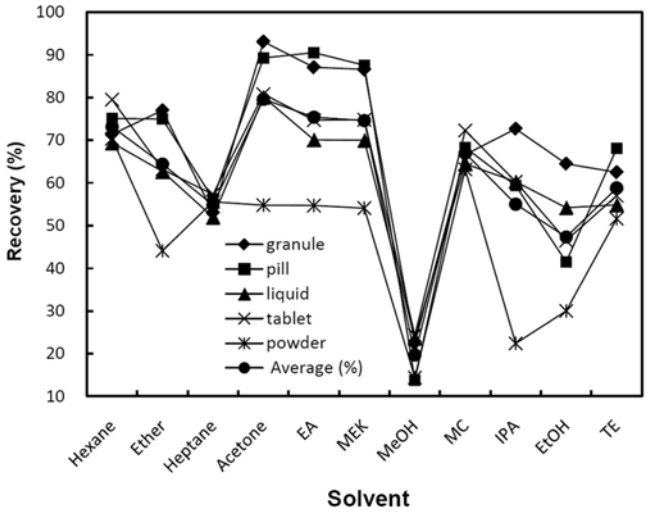


Fig. 10. Recovery data of 11 solvents in HSS/GC/MS chromatograms

한 감도, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 회수율을 갖고 있음을 알 수 있었다.

건강기능식품 중 잔류용매 분석방법 검증 실시

확립한 분석 방법을 통해 104건의 건강기능식품의 용매 분석을 실시하였다. 모든 시료에 대하여 확립한 HSS/GC/MS을 적용하여 11종에 대한 스크리닝을 실시하여 분석한 결과를 Table 7에 나타내었다. 시료분석 결과, 18건에서 에탄올로서 발효주정이 검출되었으며, 18건의 검체를 제외한 나머지 검체에서는 용매가 검출되지 않았다.

Table 6. Recovery data of 11 solvents in HSS/GC/MS chromatograms

Solvent	Recovery mean (%)	CV (%)
Hexane	98.2	3.8
Ether	97.0	1.3
Heptane	93.1	1.7
Acetone	96.9	3.7
EA	95.0	15.4
MEK	104.6	6.2
MeOH	51.0	38.1
MC	90.6	0.5
IPA	93.1	2.3
EtOH	80.9	0.0
TE	94.3	3.1
Overall mean	90.4	6.9

Table 7. HSS results of the EtOH in the detected samples

Class of health functional food	EtOH (ppm)
Nutritional supplements	1.2
	3
	6
	7
	8
	8
Red ginseng products	9.7
Royal jelly	0.2
Yeast products	0.8
Gamma linolenic acid	0.4
Pollen products	1.7
Lecithin	18.9
Spirulina	21.4
Lactic acid bacteria products	2.1
Octacoanol	5.0
Aloe and aloe vera	9.6
Glucossamine	21.5
	31.6

결 론

본 연구에서 용매 총 11종에 대한 HSS/GC/MS 분석 방법을 개발하였다. 확립한 용매 11종에 대한 HSS/GC/MS 잔류용매 분석 방법은 검출한계(LOD)는 0.1 pg/g이고, 정량범위는 0.1-125 pg/g으로서 평균 상관계수(R^2)는 0.9961로서 ppm수준에서 정량성을 가지며, 회수율은 51.0-104.6%, 변동계수는 15%이하임을 확인 할 수 있었다. 또한, 확립한 시험방법 HSS/GC/MS를 이용하여 104건의 건강기능식품 중의 잔류용매 검증을 실시한 결과, 주정의 경우 에탄올로서 18건이 검출되었고, 그 외는 검출되지 않았다.

건강기능식품 중의 주정과 같은 용매를 포함한 11종의 잔류용매에 대한 분석 방법으로 HSS/GC/MS 방법을 개발하였고, 이 방법은 잔류용매에 대한 분석법의 확대와 잔류용매 실태관리를 위한 가치있는 방법이라고 사료된다. 건강기능식품 중 잔류용매의

신속 검사체계 방법을 확립하였으며, 이 검사방법은 ppm level의 미량 성분까지도 분석이 가능하였다. 또한, 이 검사 방법은 정량성이 확보된 분석 방법으로서, 공정시험법의 제개정 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

문 헌

1. Liu Y, Hu C-Q. Establishment of a knowledge base for identification of residual solvents in pharmaceuticals. Anal. Chim. Acta 575: 246-254 (2006)
2. Otero R, Carrera G, Dulsata JF, Fbregasa JL, Claramunta J. Static headspace gas chromatographic method for quantitative determination of residual solvents in pharmaceutical drug substances according to European Pharmacopoeia. J. Chromatogr. A 1057: 193-201 (2004)
3. KFDA. Food Code. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2008)
4. KFDA. Health Functional Food Code. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2008)
5. KFDA. Food Additive Code (II). Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 1035-1036 (2009)
6. Kim HN, Cristina N, Laura LM. Gas-phase analysis of trimethylamine, propionic and butric acids, and sulfur compounds using solid-phase microextraction. Anal. Chem. 74: 1054-1060 (2002)
7. Ha JH. Analysis of volatile organic compounds in kimchi absorbed in SPME by GC-AED and GC-MSD. J. Food Sci. Nutr. 31: 543-545 (2002)
8. Park GB, Lee SG. Determination of volatile organic compounds (VOCs) in drinking water using solid phase microextraction (SPME). Korean Anal. Sci. 13: 277-281 (2000)
9. Legrand S, Dugay J, Vial J. Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products. J. Chromatogr. A 999: 195-201 (2003)
10. Ruchatz F, Kleinebudde P, Mller BW. Residual solvents in biodegradable microparticles: Determination by a dynamic headspace gas chromatographic method. Int. J. Pharm. 142: 67-73 (1996)
11. Park S, Park SK, Park Y, Ryu JB. Studies on measuring volatile terpenoids in carrots using the direct head space sampling method. Agric. Chem. Biotechnol. 40: 536-540 (1997)
12. Ha JH. Analysis of volatile in sesame oil collected by simultaneous distillation/extraction (SDE) and dynamic headspace sampling (DHS). Anal. Chem. 9: 399-405 (1996)
13. Pavn JLP, Snchez MDN, Laespada MEF, Pinto CG, Cordero BM. Analysis of class 1 residual solvents in pharmaceuticals using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-MS spectrometry. J. Chromatogr. A 1141: 123-130 (2007)
14. Kim HN, Nochetto C, McConnel LL. Gas-phase analysis of trimethylamine, propionic and butric acids, and sulfur compounds using solid-phase microextraction. Anal. Chem. 74: 1054-1060 (2002)
15. Ha JH. Analysis of volatile organic compounds in kimchi absorbed in SPME by GC-AED and GC-MSD. J. Food Sci. Nutr. 31: 543-545 (2002)
16. Pavn JLP, Snchez MDN, Laespada EF, Pinto CG, Cordero BM. Use of MS spectrometry methods as a strategy for detection and determination of residual solvents in pharmaceutical products. Anal. Chem. 78: 4901-4908 (2006)
17. Zander A, Bishop AG, Prenzler PD. A solid phase microextraction method to fingerprint dissolved organic carbon released from *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh.) (River Red Gum) leaves. Anal. Chim. Acta 530: 325-333 (2009)
18. EDQM EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Identification and Control of Residual Solvents. pp. 121-125. In: EDQM EUROPEAN PHARMACOPOEIA version 6. EDQM EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Strasbourg, France (2006)
19. Park GB, Lee SG. Determination of volatile organic compounds (VOCs) in drinking water using solid phase microextraction (SPME). Korean Anal. Sci. 13: 277-281 (2000)
20. Urakami K, Higashi A, Umemoto K, Godo M. Matrix media selection for the determination of residual solvents in pharmaceuticals by static headspace gas chromatography. J. Chromatogr. A 1057: 203-210 (2004)