



GC/MS를 이용한 식품 중 페놀 분석

강영운 · 안지은 · 서정혁 · 박선희 · 윤혜정*

식품의약품안전평가원 식품위해평가부 오염물질과

Determination of Phenol in Food using GC/MS

YoungWoon Kang, JiEun Ahn, JungHyuck Suh, Sunhee Park, and HaeJung Yoon*

Food Contaminants Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, MFDS, 187,
Osong Health Technology Administration Complex, Chungbuk 363-700, Korea

(Received July 14, 2014/Revised August 20, 2014/Accepted October 21, 2014)

ABSTRACT - The present study demonstrated the development and validation of the method for the quantification of phenol in food using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). After spiking of internal standard (Phenol- d_3) to food, those samples were extracted with organic solvent mixture (acetone : dichloromethane = 1 : 1, v/v) using ultra sonic extractor and cleaned by gel permeation chromatography (GPC) technique. The amount of phenol was determined by GC/MS. To validate the developed method, we evaluated parameters were the selectivity, linearity, accuracy, precision, and recovery. To demonstrate the selectivity of the method, blank samples of rice, corn, and fish(mackerel) were prepared and subjected to GC-MS analysis. To verify the linearity of the method, six different standard concentrations of phenol at 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2.5 mg/kg were evaluated. The correlation coefficient (r^2) of calibration curve was 0.9999. The recovery rate for phenol standard calculated by internal standard method were 82.2~101.5% for samples fortified with 0.25, 0.50, and 1.0 mg/kg, respectively. Also the repeatability and reproducibility for validation of precision were 0.2~5.5%. According to the result of the validation, this established method was suitable for AOAC guideline. The limit of detection (LOD) for phenol analysis were 0.03~0.1 mg/kg, and the limit of quantification (LOQ) were 0.1~0.3 mg/kg. Therefore, we established the optimal analysis method for determination of phenol in food using GPC and GC/MS.

Key words: Phenol, Food, GC/MS, Validation

페놀은 석유에서 추출되는 방향족 유기화합물로서 상온에서 달콤한 냄새가 나는 물질이다¹⁾. 19세기 중반부터 살균 소독약으로 주로 사용되었고 현재에는 비스페놀 A와 페놀수지의 원료로서 주로 사용되고 대부분 대기로 배출된다²⁾. 페놀에 대한 노출경로는 공기를 흡입하거나 피부 접촉에 의해서도 노출되지만, 식수를 포함한 식품 섭취에 의해서도 노출되는 것으로 보고되고 있다³⁾. 체내에 들어온 페놀은 대사되어 주로 소변으로 배설되며, 다량의 페놀에 노출될 경우 상기도 자극, 식욕부진, 체중감소, 두통 및 현기증 등이 발생하고 코나 눈에 자극을 일으키고 피부화상을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다³⁾. 페놀의 발암성에 대해서 국제암연구소(IARC)에서는 인체에 발암 가

능성이 없는 3등급으로 분류하고 있다⁴⁾. 미국환경청(EPA)에서 2002년에 페놀의 독성참고치(RfD, Reference dose)를 0.3 mg/kg b.w./day로 설정⁵⁾하였고, 유럽식품안전청(EFSA)에서는 1984년에 일일노출한계량(TDI, tolerable daily intake)을 1.5 mg/kg b.w./day로 설정한바 있으나, 최근 2013년에 독일연방위해평가원(BfR)에서 0.5 mg/kg b.w./day로 변경하자는 의견이 제출되었다⁶⁾. 앞에서 언급한 바와 같이 페놀은 주로 대기로 배출되나 사고에 의해 수계에 누출되어 악취와 물고기의 몰살을 초래함으로써 안전관리를 위해 주로 수질이나 누출사고 주변 토양에 대한 실태조사에 중점을 두었으나 누출사고에 의한 농수산물의 페놀 잔류 정도 및 위해성에 대한 연구는 매우 제한적이었다. 페놀 분석법은 액체크로마토그래피(HPLC)나 기체크로마토그래피(GC)를 이용한 분석법이 존재한다. 환경부의 페놀류 시험법은 대상매질이 수질 및 토양으로서 복잡한 매질인 식품에 적용하기에는 정제과정이 미흡하며, 폴리페놀 등 페놀류의 구분이 어렵다^{7,8)}. EPA에서 2000년부터 2003

*Correspondence to: Haejung Yoon, Food Contaminants Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, MFDS, 187, Osong Health Technology Administration Complex, Chungbuk, 363-700, Korea

Tel: 82-43-719-4251, Fax: 82-43-719-4250

E-mail: hjyoon@korea.kr

년까지 4년 동안 500개 호수에서 서식하는 어류에 대하여 페놀을 포함한 반휘발성 유기화합물, 중금속, 농약 및 다이옥신 등 오염물질들의 실태조사를 수행하였으며, 페놀 분석을 위해 적용한 시험법은 EPA 1625 시험법이였다⁹⁾. 본 연구에서는 식품 중 페놀의 오염도 조사 및 이행률 조사에 활용할 수 있도록 페놀 정량법을 확립하였으며 시험법 유효성 검증을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

농산물 중 주요 식품인 쌀과 폴리페놀 등 페놀류를 다량 함유하고 있는 옥수수 및 어류 중 다소비 식품인 고등어를 시험법 확립을 위한 대상 식품으로 선정하여 시험법의 유효성을 검증하였다. 검체는 대형마트에서 구입한 후 분쇄하고 균질화하여 폴리에틸렌 지퍼백에 담아 영하 30°C에 보관하였으며 실험시 해동하여 사용하였다.

표준품 및 시약

실험에 사용된 페놀(순도 ≥ 99.5%) 표준물질과 내부표준물질(phenol-d₅, 순도 ≥ 98%)은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 무수황산나트륨은 Wako사(Osaka, Japan)에서 구입하여 450°C에서 최소 1시간 이상 구운 것을 사용하였다. 겔침투크로마토그래피(GPC) 제조를 위한 SX-3(200~400 mesh) Bio-bead는 Bio-RAD사(Hercules, CA, USA)에서 구매하여 사용하였다. 용매로 아세톤, 디클로로메탄을 사용하였는데 모두 HPLC grade를 사용하였다.

표준용액 및 시액의 제조

표준원액은 페놀 표준물질 100 mg을 정확히 취하여 추출용액(아세톤·디클로로메탄, 1:1) 100 mL에 용해하여 1,000 µg/mL가 되도록 조제하여 갈색병에 담아 4°C에서 보관하였다. 표준원액을 추출용액으로 희석하여 0.02, 0.10, 0.20, 1.0, 2.0, 5.0 µg/mL의 농도로 준비하였다. 내부표준원액도 동일한 방법으로 추출용액으로 용해하여 조제·희석하여 1.0 µg/mL의 농도로 조제하여 사용하였다.

겔침투크로마토그래피(GPC) 제조

추출용액 80 mL를 담은 비이커에 SX-3 (200~400메쉬) Bio-bead 20 g을 넣고 12시간 이상 방치한 후, 내경 25 mm, 길이 300 mm의 유리칼럼에 충전시켰다. 충전 후 용매가 마르지 않도록 주의하며 사용하였다.

페놀 분석

시료 중의 페놀을 초음파 추출기를 이용하여 추출한 후 겔침투크로마토그래피(GPC)로 정제하여 기체크로마토그

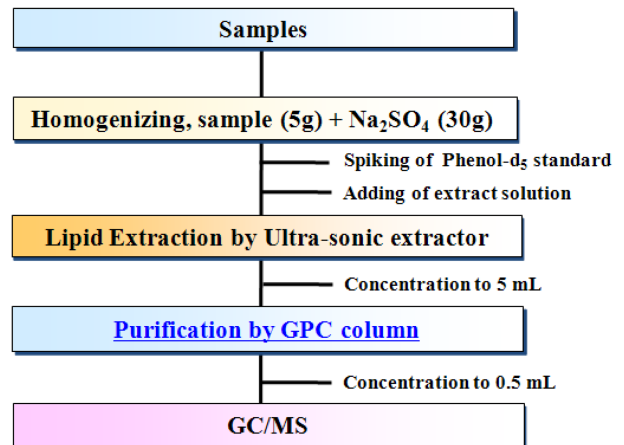


Fig. 1. Flow chart for phenol analysis.

래피/질량분석기(GC/MS)로 분석하였다. 확립된 페놀 시험법을 flow chart로 나타내었다(Fig. 1).

추출

무수황산나트륨 30 g과 균질화된 시료 5 g을 막자사발에 넣고 균질화한 후 250 mL 비이커에 취하였다. 비이커에 내부표준용액(12.5 µg/mL) 100 µl를 첨가(최종농도 0.5 µg/mL)하였다. 추출용액 50 mL를 넣고 혼합한 뒤 초음파추출기로 3분 동안 초음파를 가하여 추출하였다. 상층액을 여과지(Whatman 41)로 여과하여 농축 수기에 옮기고 남은 고형분에 추출용액 50 mL를 넣고 혼합하여 위의 과정을 2회 반복하였다. 마지막 추출과정에서 남은 용질을 추출 용액으로 행구어 여과하고 추출액을 35°C 이하의 수욕상에서 10 mL까지 감압 농축 한 후 질소농축기를 이용하여 5 mL까지 농축하였다.

정제

위의 추출액 1 mL을 정밀하게 취하여 미리 준비된 GPC 칼럼에 넣은 다음 추출용액 100 mL를 약 1 mL/분의 속도로 유출시켜 유출액 30 mL까지는 버리고 이후 부터 20 mL를 취하였다. 위의 유출액을 35°C 이하의 수욕상에서 5 mL까지 감압 농축하고 질소농축기로 최종부피가 0.5 mL되도록 농축하였다.

GC/MS 분석

GC 분석조건으로 컬럼은 DB-5MS (30 m × 250 µm, 0.25 µm, J & W Scientific, Folsom, USA)을 사용하였고, oven 온도는 30°C에서 분당 8°C씩 90°C 까지 승온시킨 다음 6분간 유지한 뒤 분당 12°C씩 300°C 까지 상승시켜 2분간 유지하였다. 캐리어가스는 constant flow mode로 헬륨(helium)을 1.0 mL/min로 흘려주었다. 이때 GC 주입부의 온도는 280°C이고 splitless mode로 시료를 주입하였다. MS 분석조건은 electron impact mode로 70 eV 이온화에너지

Table 1. Analytical conditions of GC/MS to analyze Phenol

Devices	Parameters	Conditions
GC	Column	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)
	Oven program	30°C → raising to 90°C with rate of 8°C/min and holding 6 min → raising to 300°C with rate of 12°C/min and holding 2min
	inletion port temperature	280°C
	Inject mode	splitless
	carrier gas and flow rate	He (1.0 ml/min)
MS	electron impact mode	70 eV
	selected ion	Phenol 94* 66 65 Phenol-d ₅ 99* 71 70
	MS ion source	230°C

*Quantitation ion

를 사용하였고 특성이온(m/z)으로 정성·정량하였다. 이때 ion source 온도는 230°C였다(Table 1).

결과 및 고찰

페놀시험법 확립

페놀 정량을 위한 방법으로 기체크로마토그래피(GC)를 선택하였으며, 검출기로서 질량분석기를 선정하였다. 질량 분석기를 이용한 분석법은 동위원소희석법으로서 구조는 동일하고 수소원자를 중수소로 치환한 내부표준물질 phenol-d₅을 정량에 사용하여 시료전처리 과정에서 소실되는 회수율을 보정함으로써 정확한 분석이 가능하다. 확립된 기기분석 조건으로 분석하였을 때 머무름 시간(Retention time)이 8.4분에서 일정하게 나타남을 확인하였다.

표준물질을 첨가한 쌀, 옥수수 및 고등어를 전처리하여 분석한 GC/MS 크로마토그램 상의 각 정성이온의 피크 머무름 시간(Retention time)이 각 표준물질의 정성이온의 피크 머무름 시간과 일치함을 확인하였다(Fig. 2). 시험용액의 특성이온 m/z 66, 65 그리고 94가 확인되어야 하고 특성이온 m/z 94와 66, 65간 이온세기의 비(Response ratio)를 페놀 표준물질의 선택이온 간 이온세기의 비와 비교하여 이온세기의 비가 국제식품위원회(CODEX)에서 제시하는

± 30%¹⁰⁾이내에서 일치함을 확인하였고, 이온들 중 가장 감도가 높은 m/z 94를 정량이온으로 선택하여 정량하였다. 내부표준물질의 경우에도 특성이온 m/z 71, 70, 99를 확인하였고 반응세기 비가 ± 30%이내에서 일치함을 확인하였다. 이는 질량분석기를 이용한 시험법이 대상 식품 중 페놀의 분석에 적절함을 보여주는 결과이다.

겔침투크로마토그래피(GPC)의 정제조건을 확립하기 위해 GPC 칼럼에 흘려준 용출액의 부피에 따른 페놀의 회

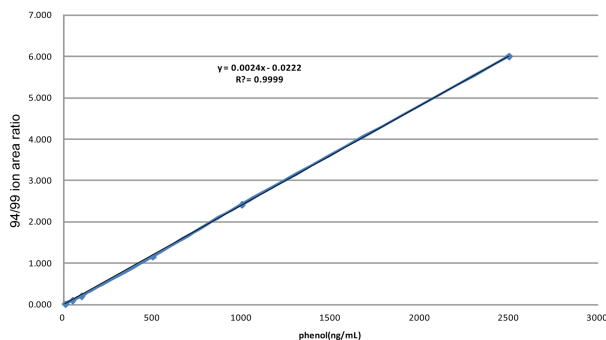


Fig. 2. Calibration curve of phenol standard solutions of concentrations from 10 to 2.5 μg/mL.

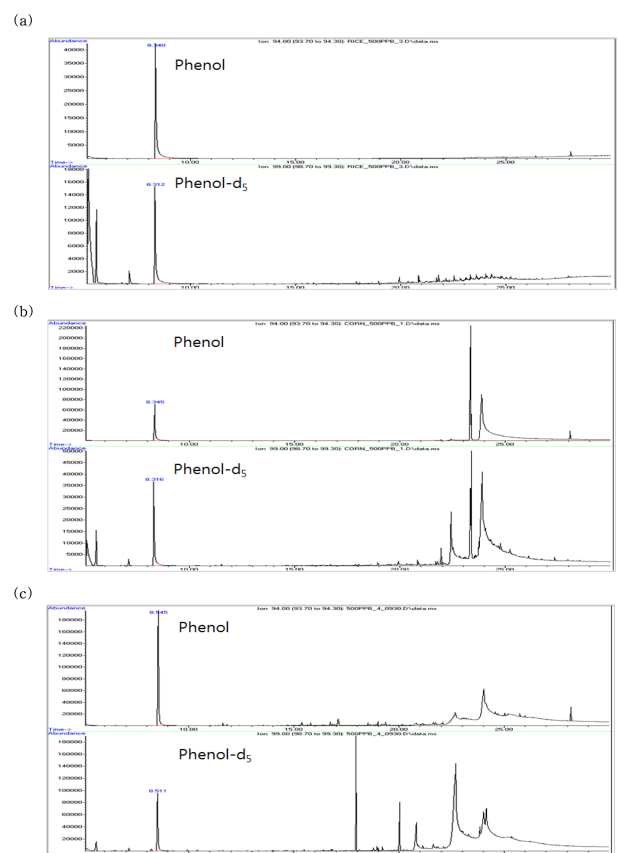


Fig. 3. GC/MS chromatograms(sim mode) of phenol and phenol-d₅ in (a) rice, (b) corn and (c) mackerel fortified with 0.5 mg/kg.

Table 2. Recoveries for phenol in rice, corn, and mackerel

Fortification (mg/kg)	Recovery (%)		
	Rice	Corn	Mackerel
0.25	90.6 ± 2.2 ¹	97.7 ± 1.1	86.8 ± 3.3
0.50	98.3 ± 2.7	101.1 ± 0.7	87.1 ± 0.2
1.00	92.2 ± 5.5	101.5 ± 5.5	82.2 ± 1.5

¹R.S.D.: Relative Standard Deviation

수율을 관찰하였다. 그 결과, 용출액 30 mL 부터 50 mL 구간에서 페놀이 90% 이상 회수됨을 확인하였으며 이 결과를 토대로 하여 각 식품별 추출액에 페놀표준물질 및 내부표준물질을 첨가하여 정제조건을 최적화 하였다.

페놀시험법 유효성 검증

직선성(Linearity)

준비된 표준용액을 내부표준용액 1.0 µg/mL와 각각 1:1로 혼합하여 페놀의 농도가 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 µg/mL가 되고 내부표준물질인 phenol-d₅의 농도가 0.5 µg/mL가 되도록 제조하여 GC/MS로 분석한 결과 검량곡선의 상관관계수(R²)가 0.999이상으로서 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 1).

선택성(Selectivity)

쌀, 옥수수 및 고등어 바탕시료를 전처리한 용액과 표준물질을 첨가하여 전처리한 용액의 크로마토그램을 비교해 보면 페놀 머무름 시간에 어떤 방해물질도 보이지 않는 것을 확인하였으며, 이는 쌀, 옥수수 및 고등어 중 페놀을 분석하기 위한 본 시험법이 좋은 분리능과 선택성을 가지고 있는 것을 보여준다.

정확성과 정밀성(Accuracy and Precision)

쌀, 옥수수 및 고등어 바탕시료에 3개의 농도(0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg)가 되도록 페놀표준물질을 첨가하고 전처리하여 분석하였고, 이 과정을 3회 반복하여 정확성과 정밀성을 확인하였다. 그 결과 각 농도와 식품 종류에서 회수율은 82.2~101.5% 이었다. 이는 AOAC에서 제시하는 회수율 적정범위 75~120%를 만족하며, 3회 반복에 의한 상대표준편차(Relative Standard Deviation)가 최대 5.5%로 나타나 AOAC에서 제시하는 8% 미만으로서 정밀성이 양호한 시험법임을 확인할 수 있었다¹¹⁾.

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

각각의 바탕시료에 표준물질을 첨가하고 시료전처리를 하였다. 이 과정을 7회 반복하여 분석한 후 분석값들의 표준편차에 각각 3.14와 10을 곱하여 검출한계와 정량한계

를 구하였다. 검출한계는 쌀은 0.1 mg/kg, 옥수수와 고등어는 0.03 mg/kg이었고, 정량한계는 쌀은 0.3 mg/kg, 옥수수와 고등어는 0.1 mg/kg으로 나타났다.

요 약

페놀은 보통 대기로 배출되며 반감기가 비교적 짧은 물질로서 환경에 농축되는 경우는 드물다. 하지만, 누출사고가 발생되어 수계나 토양에 오염될 경우 폐놀에 오염된 농수산물의 안전성을 확보하기 위하여 폐놀을 정확하게 검출할 수 있는 시험법을 확립하고자 하였다. 식품 중 폐놀을 초음파추출기로 추출하고 GPC로 정제하여 GC/MS로 분석하는 시험법을 확립하였으며, 시험법의 유효성 확인을 위한 실험 결과들이 AOAC 가이드라인에서 제시하는 Criteria를 만족함으로써 시험법의 신뢰성을 확보할 수 있었다. 확립된 시험법은 식품 중 폐놀의 오염조사 및 이행률 조사에 활용될 수 있다.

참고문헌

1. US Environmental Protection Agency.: Integrated Risk Information System (IRIS) on Phenol. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. Available at <http://www.epa.gov/iris> (1999).
2. 환경부, 화학물질 배출량 조사결과 세부통계. Available at <http://ncis.nier.go.kr/tri> (2010-2012).
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.: Toxicological Profile for Phenol, Public Health Service, U.S. Department of Health Services, Atlanta, GA. (2008).
4. International Agency for Research on Cancer: Phenol, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, V71, 749-768 (1999).
5. US Environmental Protection Agency.: Toxicological review of phenol. Washington, DC. Available at <http://www.epa.gov/iris> (2002).
6. European Food Safety Authority.: Scientific Opinion on the toxicological evaluation of phenol, EFSA Journal, **11**(4), 3189 (2013).
7. 환경부, 토양오염공정시험기준, ES 07553, 186-196 (2009).
8. 환경부, 먹는물수질공정시험기준, ES 05311 (2012).
9. US Environmental Protection Agency. Method 1625C : Semivolatile Organic Compounds by Isotope Dilution GC/MS. Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division, Washington, DC. (1989).
10. CODEX Alimentarius Commission. Guidelines on the use of mass spectrometry (MS) for identification, confirmation and quantitative determination of residues, CAC/GL 56 (2005).
11. AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).