

유당 과자 모델에서 결합형 3-monochloropropane-1,2-diol 생성에 영향을 미치는 요인

강준혁¹ · 정우영¹ · 노회진² · 백형희^{1,*}
¹단국대학교 식품공학과, ²(주)오리온 글로벌연구소

Factors affecting the formation of bound 3-monochloropropane-1,2-diol in a fried snack model

Jun-Hyuk Kang¹, Woo-Young Joung¹, Hoi-Jin Rho², and Hyung-Hee Baek^{1,*}

¹Department of Food Engineering, Dankook University

²Global R&D Center, ORION Corp.

Abstract The 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) is a contaminant that occurs in foodstuffs in its free form as well as in its bound form. The objective of this study was to evaluate the effects of emulsifier, frying temperature, and the amounts of salt and oil on the formation of bound 3-MCPD in a fried snack model. Emulsifier affected the formation of bound 3-MCPD; furthermore, it was observed that the largest amount of bound 3-MCPD was detected in the fried snack model when glycerin esters of fatty acids were used as emulsifiers. Frying temperature also affected the formation of bound 3-MCPD, which increased significantly as the frying temperature increased from 145 to 190°C. In addition, salt affected the formation of bound 3-MCPD. As the amount of salt increased, the amount of bound 3-MCPD also increased significantly. Moreover, it was observed that the amount of oil did not affect the formation of bound 3-MCPD. These results will aid in the reduction of bound 3-MCPD in fried snacks.

Keywords: bound 3-MCPD, 3-MCPD, GC-MS, fried snack, validation

서 론

3-MCPD (3-Monochloropropane-1,2-diol)는 chloropropanol류의 화합물로 지방산이 붙어 있지 않은 3-MCPD와 한 개 혹은 두 개의 지방산이 결합되어 있는 결합형 3-MCPD로 분류되며 결합형 3-MCPD는 지방산의 종류에 따라 수많은 화합물이 존재할 수 있다(Woo 등, 2010). 3-MCPD는 천연 식품에서 발견된 사례는 없으며, 가공 식품에서는 산을 사용한 식물단백질가수분해물(Hydrolyzed Vegetable Protein, HVP)에서 Velek 등(1978)에 의해 처음 보고되었다. 3-MCPD는 식품 가공 중 글리세롤 또는 아실글리세롤이 염소 이온과 반응하여 생성되며, 식물단백질을 산 가수분해하는 과정에서는 트리아실글리세롤과 염산이 반응하여 생성된다고 알려져 있다(Velek 등, 2003). 3-MCPD는 HVP를 함유하는 간장과 소스류 뿐 아니라 영아용 조제식, 빵 및 시리얼과 같은 다양한 식품에서 발견되고 있다(Breitling-Utzmann 등, 2005; Zelinkov 등, 2009). 우리나라에서는 1985년 8월 및 1996년 2월에 발생한 소위 '산분해간장 파동'의 원인 물질로 알려져 있다. 현재 식품의약품안전처의 식품공전에 3-MCPD의 잔류허용기준이

산분해간장 및 혼합간장에서 0.3 mg/kg 이하, HVP에서 1.0 mg/kg 이하로 설정되어 있다. 하지만 산분해간장 및 혼합간장의 경우 2020년 7월 15일부터 0.1 mg/kg 이하, 2022년 1월 1일부터는 0.02 mg/kg 이하로 기준이 강화될 예정이다. 외국의 경우에도 HVP 및 간장을 대상으로 관리하고 있으며, 각국의 규제현황을 보면 CODEX는 HVP가 포함된 소스에 대해 0.4 mg/kg, EU는 간장과 HVP에 대해 0.02 mg/kg, 오스트리아와 캐나다는 굴소스에 대해 각각 0.2과 1.0 mg/kg 이하로 관리하고 있다(ANZFA, 2018; FAO, 2018; Government of Canada, 2018; OJ, 2018).

3-MCPD의 독성에 대해서는 정자수의 감소와 정자 기능의 감퇴 등의 생식독성이 있다고 알려져 있다(Homonnai 등, 1975). 3-MCPD는 생물체내에서 대사과정을 거쳐 독성을 나타내는데, 먼저 alcohol dehydrogenase에 의해 β-chloroacetaldehyde로 산화되어 생물체의 당 대사를 억제하며, chlorolactic acid로 전환되어 호흡장애와 신장독성 등을 일으킨다. 3-MCPD의 최종산물인 oxalic acid는 calcium oxalate로 변하여 신장 기능 부전을 일으킬 수 있다(Jones, 1975; Jones 등, 1981). 또한 WHO 산하 기구인 국제암연구소(IARC)는 3-MCPD를 인간에 암을 유발할 수 있는 물질을 의미하는 group 2B의 발암물질로 분류하고 있으며(IARC, 2018), 미국 캘리포니아주의 환경건강유해성 평가국(OEHA)은 3-MCPD를 체장암, 선천적 장애 및 생식기 손상을 유발할 수 있는 물질인 proposition 65로 분류하고 있다(OEHA, 2018).

결합형 3-MCPD는 3-MCPD와 마찬가지로 트리아실글리세롤을 염산과 함께 가열하면 생성된다고 알려져 있다(Seefelder 등, 2008). 외국의 연구 결과에 따르면 결합형 3-MCPD는 산분해단백질을 사용하지 않은 가공식품에서도 검출되었으며, 빵류, 과자

*Corresponding author: Hyung-Hee Baek, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan, Chungnam 31116, Korea

Tel: +82-41-550-3565

Fax: +82-41-559-7868

E-mail: baek@dankook.ac.kr

Received August 18, 2020; revised October 5, 2020;

accepted October 10, 2020

류, 소스류, 영아용 조제식, 감자튀김, 탈취 공정을 거친 유지류 및 커피를 포함한 식품 등에서도 결합형 3-MCPD 존재 가능성이 보고되었다(Zelinkov 등, 2006, 2008, 2009). 또한 일부 식품에서는 결합형 3-MCPD의 검출 수준이 비결합형 3-MCPD의 수백 배 이상인 것으로 보고되었다(Divinova 등, 2004; Weißhaar, 2011). 식품에서 결합형 3-MCPD는 3-MCPD로 전환되지 않은 중간 물질이라고 할 수 있으며, 식품의 형태로 결합형 3-MCPD를 섭취했을 때, 소화기관에서 위산과 소화효소 등의 대사 작용에 의해 3-MCPD로 전환될 수 있다는 가능성이 제기되었다. 57차 JECFA 회의에서 처음으로 3-MCPD에 대한 일일최대섭취한계량(provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI)을 2 µg/kg bw로 설정하였고(JECFA, 2002), 결합형 3-MCPD의 위해 가능성이 제기됨에 따라 83차 회의에서는 3-MCPD와 결합형 3-MCPD에 대한 group PMTDI를 4 µg/kg bw (3-MCPD로 환산한 값)로 설정하였다(JECFA, 2017). 현재 결합형 3-MCPD의 기준을 따로 설정하여 관리하고 있는 나라는 없으며 우리나라 역시 관리 기준이 정해져 있지 않은 상태이다. 독일연방위해평가원(BfR)은 만약 결합형 3-MCPD가 3-MCPD로 100% 전환된다면, 영유아 식품의 경우 TDI (tolerable daily intake)의 20배 내지 30배를 넘는 수준의 위해도가 있다고 평가하고, 결합형 3-MCPD의 저감화가 필요하다고 보고하였다(BfR, 2018; Larsen, 2009).

결합형 3-MCPD 관련 연구로는 Woo 등(2010)이 결합형 3-MCPD의 분석법을 확립하여 기름과 소금이 섞여 튀겨진 5건의 유당 과자를 분석하여 모두에서 결합형 3-MCPD를 검출하였다. Reece(2005)는 식품 중 결합형 3-MCPD의 생성요인을 연구하였으며, 가공온도, pH, 소금 양 및 식품첨가물이 결합형 3-MCPD의 생성에 영향을 준다고 보고하였다. 그 중 식품첨가물의 경우 식품첨가물 자체에 결합형 3-MCPD가 존재할 수도 있으며 지방이 함유된 식품첨가물은 결합형 3-MCPD의 전구체로 작용할 수 있다고 보고하였다. Sadowska-Rociek 등(2017)은 shortbread 모델을 이용하여 감미료가 결합형 3-MCPD의 생성에 미치는 영향을 연구하였으며, 감미료가 pH에 따라 결합형 3-MCPD 생성에 영향을 준다고 보고하였다.

본 연구에서는 가공식품 중 결합형 3-MCPD의 잠재적인 생성 가능성이 있을 것으로 생각되는 유당 과자 모델에서 결합형 3-MCPD의 생성에 영향을 미치는 요인에 대해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

결합형 3-MCPD 분석에 사용된 시약은 3-MCPD (98.0%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 3-MCPD-d₅ (99.7%, Sigma-Aldrich), 1,2-bis-palmitoyl-3-chloropropanediol (98.0%, TRC Inc, Toronto, Canada), heptafluorobutyric anhydride (HFBA, 99.0%, Sigma-Aldrich), isooctane (99.5%, Sigma-Aldrich), dichloromethane (99.8%, J.T. Baker, Central Valley, CA, USA), tetrahydrofuran (99.5%, TCI chemical, Tokyo, Japan), diethyl ether (99.8%, J.T. Baker), H₂SO₄ (95.0%, Daejung, Siheung, Korea), NaHCO₃ (99.0%, Daejung), 메탄올(99.9%, J.T. Baker), 무수황산나트륨(sodium sulfate anhydrous) (99.0%, Duksan, Korea), NaCl (99.0%, Samchun, Pyeongtaek, Korea) 및 aluminum oxide (Sigma-Aldrich)이었으며, 추출단계 중 solid phase extraction은 Extrelut® NT-3 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 구입하여 사용하였다.

유당 과자 제조

유당 과자는 Lanner 등(2000)의 특허를 참조하여 제조하였다. 유당 과자를 만들기 위해 밀가루(㈜CJ제일제당, Yangsan, Korea), 천일염(㈜CJ제일제당, Shinan, Korea), 튀김유(㈜CJ제일제당, Incheon, Korea) 및 triolein (>80.0%, TCI Chemical, Tokyo, Japan)을 구매하여 사용하였다. 유화제 6종은 글리세린지방산에스테르(Kao Corp., Tokyo, Japan), 레시틴(Bunge North America Inc., Chesterfield, MO, USA), 폴리소르베이트20(Kao Corp.), 폴리소르베이트80(Kao Corp.), 자당지방산에스테르(Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) 및 소르비탄지방산에스테르(Kao Corp.)를 구매하여 사용하였다. 유당 과자는 배합 비율에 맞춰 재료를 반죽하고 반죽을 일정하게 성형한 후 튀김기(DK-205, Delki, Goyang, Korea)를 이용하여 제조하였다. 결합형 3-MCPD 분석을 위해 유당 과자는 막자사발을 이용하여 마쇄한 후 분석 전까지 냉동고(-20°C)에 보관하였다.

가공 조건 별 유당 과자 배합

유당 과자 모델에서 결합형 3-MCPD의 생성에 영향을 주는 요인들을 알아보기 위해 유당 온도, 소금 함량, 유지 함량 및 유화제의 종류를 달리하여 유당 과자를 제조하였다(Table 1). 유당 온도가 결합형 3-MCPD 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 145, 160, 175와 190°C로 튀김유의 온도를 달리하여 유당 과자를 제조하였다. 소금 함량이 결합형 3-MCPD 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 천일염의 배합비율을 0, 2, 3, 4와 5%로 달리하여 유당 과자를 제조하였고, 유지 함량이 결합형 3-MCPD 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 유지의 배합비율을 0, 2, 3, 4와 5%로 달리하여 유당 과자를 제조하였다. 유화제는 과자 제조에 사용되는 유화제 6종을 2%의 비율로 첨가하였다. 유당 시간은 모두 5분으로 하였으며 소금, 유지 혹은 유화제를 함유하지 않는 유당 과자를 각 실험군의 대조군으로 하였다.

3-MCPD 분석

결합형 3-MCPD 분석을 위해서는 3-MCPD 분석이 선행되어야 하며, 본 연구에서 적용한 3-MCPD 분석법은 Yang 등(2018)의 방법을 사용하였다. 3-MCPD 표준용액은 3-MCPD 표준품 1 mg을 100 mL의 ethyl acetate에 녹여 stock solution을 만들고, 각 농도로 단계 희석하여 사용하였으며, 3-MCPD-d₅ 표준용액은 3-MCPD-d₅ 표준품 1 mg을 ethyl acetate 100 mL에 녹여 10,000 µg/mL의 농도로 만든 후 10 µg/mL로 희석하여 분석에 사용하였다.

3-MCPD 분석은 물추출, solid phase extraction (SPE), 농축 및 유도체화 단계로 나눌 수 있다. 물추출 단계에서는 검체 5 g을 5 M NaCl 용액으로 30 mL가 되도록 정용하고 진탕기에서 250 rpm의 속도로 10분간 추출하고 원심분리기를 이용하여 4°C에서 4,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. SPE 단계에서는 Extrelut® NT-3 컬럼에 물추출 용액 2 mL와 내부표준물질(3-MCPD-d₅, 10 µg/mL) 50 µL를 spike하여 10분간 흡착시켰다. 3-MCPD가 흡착된 컬럼 상단에 무수황산나트륨 약 1 g을 가한 뒤, dichloromethane 60 mL를 분당 2 mL의 속도로 용출하였다. 농축 단계에서는 용출액을 회전증발농축기를 이용하여 35°C에서 약 1 mL까지 농축한 후 농축액을 마개가 있는 작은 시험관으로 옮기고 dichloromethane 3 mL로 농축플라스크를 씻어내어 남은 용액을 회수하였다. 그리고 N₂ 기체를 이용하여 100 µL까지 농축하였다. 유도체화 단계에서는 농축액 100 µL에 isooctane 900 µL와 HFBA 150 µL를 첨가하고 마개를 닫은 후 60°C의 항온수조에서

Table 1. Composition of fried snack model

Sample	Frying temp. (°C)	Oil (%)	Flour (%)	Emulsifier		Water (%)	Salt (%)	Total (%)
				Name	Content (%)			
Control			63	No emulsifier	0			
GLE				Glycerin ester of fatty acids				
SUE				Sucrose ester of fatty acids				
SOE	170	3.5	61	Sorbitan ester of fatty acids	2	30	3.5	100
PS20				Polysorbate 20				
PS80				Polysorbate 80				
LEC				Lecithin				
Control	No frying							
T1	145							
T2	160	3.5	61	Glycerin ester of fatty acids	2	30	3.5	100
T3	175							
T4	190							
Control			64.5				0	
F1			62.5				2	
F2	170	3.5	61.5	Glycerin ester of fatty acids	2	30	3	100
F3			60.5				4	
F4			59.5				5	
Control		0	64.5					
O1		2	62.5					
O2	170	3	61.5	Glycerin ester of fatty acids	2	30	3.5	100
O3		4	60.5					
O4		5	59.5					

교반하면서 30분간 반응시켰다. 상온에서 10분간 방치한 후 증류수 5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 상층의 유기용매 층을 취하여 약 1 g의 무수황산나트륨이 들어 있는 시험관에 넣어 수분을 제거한 후 시험용액으로 사용하였다.

3-MCPD 정량

3-MCPD 함량은 3-MCPD 표준물질로 검량선을 작성하여 정량하였다. 3-MCPD 검량선은 3-MCPD의 농도를 각각 10, 20, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000과 20,000 ng/mL가 되도록 조제하여 작성하였다. 표준시험용액은 각 농도의 3-MCPD 표준용액 50 µL, 내부표준물질용액(3-MCPD-d₅, 10 µg/mL) 50 µL, isooctane 900 µL와 HFBA 150 µL를 혼합하고, 3-MCPD 분석법과 같은 유도체화 조건으로 반응시킨 후 GC-MS로 분석하였다. 검량선은 3-MCPD 정량 ion (m/z 253)과 3-MCPD-d₅ 정량 ion (m/z 257)의 피크면적 비를 y축으로, 3-MCPD 농도를 x축으로 하여 작성하였다. 3-MCPD는 다음 식을 이용하여 정량하였다.

$$3\text{-MCPD 함량 } (\mu\text{g/g}) = M \times V \times D \times \frac{1}{S} \times \frac{1}{1000} \quad (1)$$

- M: 검량선에서 계산된 3-MCPD 농도 (ng/mL)
- V: 유도체화를 거친 최종 시험용액의 부피 (mL)
- D: 물추출 단계에서 전체 시험용액 양에 대한 분석에 사용한 시험용액 양의 비
- S: 검체 채취량 (g)

결합형 3-MCPD 분석

결합형 3-MCPD 분석은 Woo 등(2010)의 방법을 이용하였다. 결합형 3-MCPD 표준용액은 1,2-bis-palmitoyl-3-chloropropanediol

표준품 1 mg을 ethyl acetate 100 mL에 녹여 stock solution을 만들고 각 농도로 단계 희석하여 사용하였다. 포화 탄산수소나트륨 (NaHCO₃)은 과량의 탄산수소나트륨을 증류수에 녹여 사용하였고 2% H₂SO₄는 H₂SO₄ 2 g을 메탄올 98 g에 녹여 사용하였다.

결합형 3-MCPD 분석법은 크게 지방 추출, 가수분해와 3-MCPD 분석단계로 구분된다. 지방 추출 단계는 지방에 들어있는 결합형 3-MCPD를 추출하는 단계로 검체 5 g에 diethyl ether 30 mL를 첨가한 후 진탕기에서 250 rpm의 속도로 1시간 동안 지방을 추출하였다. 추출효율을 높이기 위해 지방추출은 2회 진행하였다. 지방을 추출한 diethyl ether는 회전증발농축기(35°C)를 사용하여 약 1 mL까지 농축하였다. 다음 단계로 농축액을 마개가 있는 작은 시험관으로 손실을 최소화하여 옮긴 후 tetrahydrofuran 1 mL와 메탄올에 녹인 2% H₂SO₄ 2 mL를 첨가하여 항온수조(60°C)에서 4시간 동안 가수분해하였다. 이후 포화 탄산수소나트륨 0.5 mL를 첨가하여 가수분해를 중지시켰다. 이 때 생긴 흰색 침전물을 제거하기 위해 4°C에서 4,500 rpm로 10분간 원심분리하고 상층액 1 mL을 3-MCPD 분석 시료로 사용하였다. 가수분해 이후에는 앞에서 언급한 3-MCPD 분석 방법과 동일하게 처리하여 분석하였다.

결합형 3-MCPD 정량

결합형 3-MCPD 분석은 결합형 3-MCPD를 가수분해하여 3-MCPD를 정량 분석하는 것으로, 식품에 함유된 비결합형 3-MCPD와 결합형 3-MCPD가 모두 3-MCPD로서 정량된다. 총 3-MCPD 함량은 가수분해 희석배수를 고려하여 다음 식과 같이 구하였다.

$$\text{총 3-MCPD 함량 } (\mu\text{g/g}) = M \times V \times D_1 \times D_2 \times \frac{1}{S} \times \frac{1}{1000} \quad (2)$$

M: 검량선에서 계산된 3-MCPD 농도(ng/mL)

- V: 유도체화를 거친 최종 시험용액의 부피(mL)
 D₁: 물추출 단계에서 전체 시험용액 양에 대한 분석에 사용한 시험용액 양의 비
 D₂: 가수분해 단계에서 전체 시험용액 양에 대한 분석에 사용한 시험용액 양의 비
 S: 검체 채취량(g)

결합형 3-MCPD의 함량은 총 3-MCPD 함량에서 비결합형 3-MCPD 함량을 제외하였고, 결합형 3-MCPD 및 비결합형 3-MCPD 분석의 공시험을 각 3회 반복하여 공시험 값을 결합형 3-MCPD 함량에서 제외하였다.

$$\text{결합형 3-MCPD 함량}(\mu\text{g/g}) = \text{총 3-MCPD 함량}(\mu\text{g/g}) - \text{비결합형 3-MCPD 함량}(\mu\text{g/g}) \quad (3)$$

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

3-MCPD 분석은 Agilent 6890N/Agilent 5973N mass selective detector (MSD) (Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, GC 컬럼은 DB-5ms (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm: J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. 오븐 온도는 50°C에서 5분간 유지 후 2°C/분의 속도로 90°C까지 올린 다음 5분간 유지하였고, 30°C/분의 속도로 280°C까지 올린 다음 3분간 유지하였다. 인젝터 온도는 250°C로 하였으며 주입모드는 비분할(splitless)로 하였다. 운반기체(He)의 유속은 0.8 mL/분으로 하였고 이온화 전압은 70 eV로 하였다. MS 모드는 SIM (selected ion monitoring)으로 하여 정성 및 정량 분석하였다.

유도체화 된 3-MCPD의 정성 분석을 위해 253, 275, 289, 291과 453 (m/z)을 정성 ion으로 하였다. 정성 ion 중 가장 감도가 높은 ion을 정량 ion으로 선택하였으며 3-MCPD는 253 (m/z) 그리고 3-MCPD-d₅는 257 (m/z)을 선택하였다.

분석법 비교와 검증

3-MCPD 분석 시 흡착 컬럼으로 aluminium oxide를 사용한 Woo 등(2010)의 방법과 Extrelut[®] NT-3를 사용한 Yang 등(2018)의 방법을 비교하였다. 과자 반죽을 만들어 검체로 사용하였으며 검체에 3-MCPD 표준물질을 500 ng/g의 농도로 첨가하고 각 분석법으로 추출한 후 GC-MS에 주입하여 크로마토그램을 확인하였다. 결합형 3-MCPD 및 3-MCPD 분석법 검증을 위해 검출한계, 정량한계, 직선성, 정확성 및 정밀성을 확인하였다(MFDS, 2016).

통계분석

본 연구에서 얻어진 결과는 SPSS 20 (Statistical Package for Social Science) 프로그램을 이용하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타내었으며 요인간의 유의성은 일원배치분산분석으로 분석하고 p<0.05 수준에서 던킨의 다중검정을 이용하여 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

3-MCPD 분석법 비교

3-MCPD 분석 시 SPE 단계에서 흡착 컬럼으로 aluminum oxide를 사용한 방법과 Extrelut[®] NT-3를 사용한 방법을 비교한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 두 방법 모두 3-MCPD는 16.8분, 3-MCPD-d₅는 16.6 분에서 검출되었으며 분석대상물질 피크 주변은 외부 물질로부터의 간섭이 없는 것으로 확인되었다. 하지만 흡착 컬럼으로 Extrelut[®] NT-3를 사용한 방법이 aluminum oxide를 사용한 방법보다 약 5배 높은 피크 면적을 보였다(Fig. 1). 따라서 흡착 컬럼으로 Extrelut[®] NT-3를 사용하는 방법이 3-MCPD 분석에 더 적합할 것으로 생각되었다.

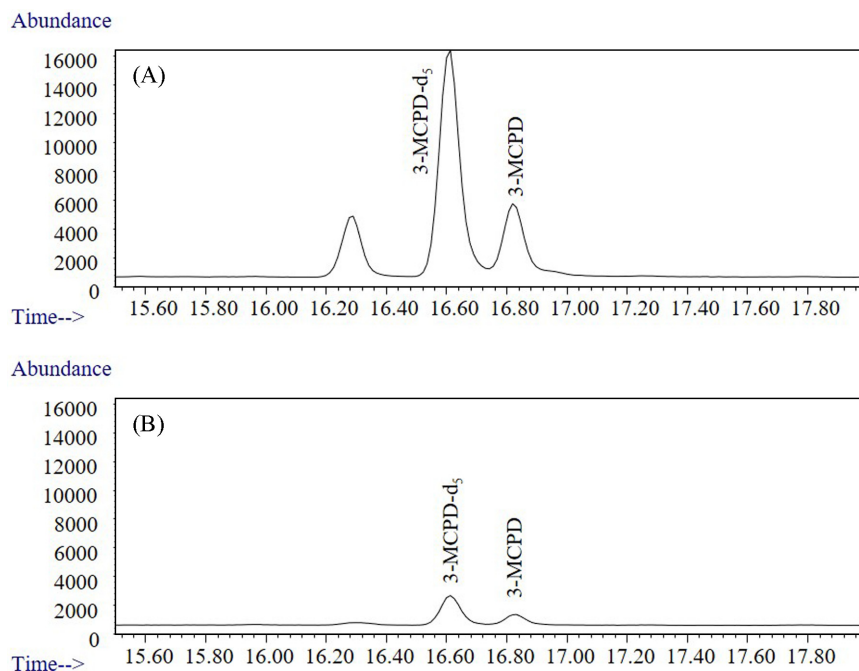


Fig. 1. Selective ion monitoring (SIM) chromatograms of 3-MCPD and 3-MCPD-d₅ extracted from snack dough model (ion: 253, 257 m/z). (A) Extrelut[®] NT-3 and (B) aluminum oxide.

분석법 검증

분석법 검증을 위해 검출한계, 정량한계, 직선성, 정확성 및 정밀성을 구하였다. 분석기기의 검출한계 및 정량한계를 검증하기 위해 3-MCPD 표준물질을 1, 2, 5, 10 및 20 ng/mL의 농도가 되도록 제조하고 각 농도마다 5 회씩 GC-MS로 분석하여 저농도 검량선을 작성하였다. 저농도 검량선의 기울기와 y절편의 표준편차에 근거하여 분석기기의 검출한계와 정량한계를 산출하였다. 검출한계는 0.86 ng/mL이며 정량한계는 2.61 ng/mL로 산출되었다 ($R^2=0.9936$). 직선성을 확인하기 위해 3-MCPD 표준물질을 10, 20, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000 및 20,000 ng/mL의 농도로 제조하고 각 농도당 5 회씩 GC-MS로 분석하였다. 3-MCPD 표준용액을 주입하여 얻은 chromatogram에서 3-MCPD-d₅ 피크면적에 대한 3-MCPD 피크면적의 비를 y축으로, 3-MCPD 표준용액의 농도를 x축으로 하여 검량선을 작성하였다. 10-20,000 ng/mL의 농도 범위에서 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9997로 양호한 직선성을 보였다.

정확성과 정밀성을 측정하기 위해 3-MCPD와 결합형 3-MCPD를 각각 과자 반죽에 spike하였다. Matrix 효과를 고려하여 유당 과자와 유사한 과자 반죽을 검증 matrix로 사용하였다. 3-MCPD는 과자 반죽에 3-MCPD 표준물질을 30, 100 및 200 ng/g의 농도가 되도록 첨가하고 3-MCPD 분석법에 따라 분석하였다. 결합형 3-MCPD는 과자 반죽에 결합형 3-MCPD 표준물질을 100, 300 및 600 ng/g의 농도가 되도록 첨가하고 결합형 3-MCPD 분석법에 따라 분석하였다. 3-MCPD와 결합형 3-MCPD의 각 3가지 농도를 3회씩 3일간 분석하였으며, 일내와 일간 정밀성 및 정확성을 검증하였다.

3-MCPD의 경우 일내 정확성은 81.3-94.0% 그리고 일간 정확성은 82.1-89.0% 수준이었다(Table 2). 결합형 3-MCPD는 과자 반죽에서 일내 정확성이 84.1-99.3%, 그리고 일간 정확성은 87.7-91.1%의 수준이었으며 3-MCPD와 유사한 정확성을 보였다. FDA 가이드 라인에 따르면 정확성은 농도가 10-100 ng/g일 경우 60-115%, 100-1,000 ng/g일 경우 80-110% 이내로 허용하고 있다. 따라서 3-MCPD 및 결합형 3-MCPD 분석법의 일내 및 일간 정확성 모두 허용 범위 내에 포함되어 분석법이 유효하다고 생각된다(HHS, 2015).

3-MCPD는 과자 반죽에서 일내 정밀성이 1.5-7.8% Relative Standard Deviation (RSD), 그리고 일간 정밀성은 1.1-5.6% RSD로 확인되었다(Table 2). 결합형 3-MCPD의 과자 반죽에서 일내 정밀성은 2.8-8.9% RSD, 일간 정밀성은 5.0-6.8% RSD로 확인되었다. FDA 가이드 라인에 따르면 정밀성은 농도가 10-100 ng/g 일 경우 22%, 100-1,000 ng/g일 경우 11% 이내로 허용하고 있다. 따라서 3-MCPD 및 결합형 3-MCPD 분석법의 일내 및 일간 정

밀성 모두 허용 범위 내에 포함되어 분석법이 유효하다고 판단할 수 있다(HHS, 2015).

유화제 종류에 따른 결합형 3-MCPD의 생성

유화제가 결합형 3-MCPD의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 유화제 6종(글리세린지방산에스테르, 자당지방산에스테르, 소르비탄지방산에스테르, 폴리소르베이트20, 폴리소르베이트80 및 레시틴)을 각각 첨가하여 반죽을 제조한 후 170°C에서 가공하여 유당 과자를 제조하였으며, 유화제를 첨가하지 않은 반죽으로 같은 조건에서 유당과자를 제조하여 대조군으로 사용하였다. 유화제 종류를 달리하여 제조한 유당 과자의 결합형 3-MCPD 함량은 Fig. 2A에 나타내었다.

비결합형 3-MCPD의 경우 레시틴을 첨가한 시료에서 0.034±0.004 µg/g 생성되었으며, 다른 유화제를 첨가한 시료에서는 검출되지 않았다. Velíšek 등(2003)은 3-MCPD의 전구체에 대한 연구에서 글리세롤류와 레시틴이 3-MCPD를 생성한다고 보고하였는데, 특히 레시틴이 가장 높은 3-MCPD 생성 능력을 보였다고 하였다. 본 연구의 결과도 이와 유사한 경향을 보였다.

결합형 3-MCPD의 경우 글리세린지방산에스테르를 첨가한 시료에서 3.40±0.40 µg/g, 자당지방산에스테르를 첨가한 시료에서 1.70±0.21 µg/g, 소르비탄지방산에스테르를 첨가한 시료에서 2.03±0.10 µg/g, 폴리소르베이트20을 첨가한 시료에서 1.22±0.07 µg/g, 폴리소르베이트80을 첨가한 시료에서 1.54±0.22 µg/g, 그리고 레시틴을 첨가한 시료에서 1.76±0.08 µg/g 검출되었다. 대조군에서도 1.38±0.07 µg/g의 결합형 3-MCPD가 검출되었는데 이는 유당 과자 반죽에 포함된 소금과 유지가 높은 온도의 튀김유에서 반응하여 생성된 것으로 보인다. 사용된 유화제 종류에 따라 결합형 3-MCPD의 함량에 차이가 있었으며 글리세린지방산에스테르를 첨가한 시료에서 가장 높은 함량을 보였다. 즉, 유화제 종류는 결합형 3-MCPD의 생성에 영향을 주었으며 글리세린지방산에스테르를 유화제로 사용 시 결합형 3-MCPD의 생성이 증가할 것으로 생각된다. Reece(2005)는 글리세롤 혹은 부분 glyceride된 식품첨가물을 사용할 경우 결합형 3-MCPD를 생성할 수 있다고 보고하였으며, Shimizu 등(2012)은 모노 혹은 다이아실글리세롤이 존재할 경우 결합형 3-MCPD가 생성될 수 있다고 보고하였다. 글리세린지방산에스테르는 지방산과 글리세린 또는 폴리글리세린의 에스테르 및 유도체로 정의되며 본 연구에서 사용된 글리세린지방산에스테르는 glycerin monostearate가 주성분이었다. 글리세린지방산에스테르를 첨가한 시료에서 결합형 3-MCPD가 가장 많이 생성된 것은 glycerin monostearate가 전구체로 작용하여 결합형 3-MCPD가 생성되었기 때문인 것으로 생각된다.

Glycerin monostearate에서 결합형 3-MCPD가 생성되는 기작은

Table 2. Accuracy and precision of 3-MCPD and bound 3-MCPD from snack dough model spiked at three different concentrations

Compound name	Conc. (ng/g)	Intra day 1		Intra day 2		Intra day 3		Inter day	
		Accuracy (%)	Precision (% RSD)	Accuracy (%)	Precision (% RSD)	Accuracy (%)	Precision (% RSD)	Accuracy (%)	Precision (% RSD)
3-MCPD	30	89.1	7.8	85.7	6.4	82.0	1.5	85.6	4.6
	100	83.1	3.0	81.3	2.2	81.8	2.8	82.1	1.1
	200	84.6	2.7	94.0	1.9	88.3	3.2	89.0	5.6
Bound 3-MCPD	100	89.0	7.0	94.5	2.8	89.7	5.3	91.1	5.0
	300	84.1	3.3	99.3	3.7	92.1	7.9	87.7	5.0
	600	86.2	4.7	89.4	6.9	87.5	8.9	88.7	6.8

RSD means relative standard deviation

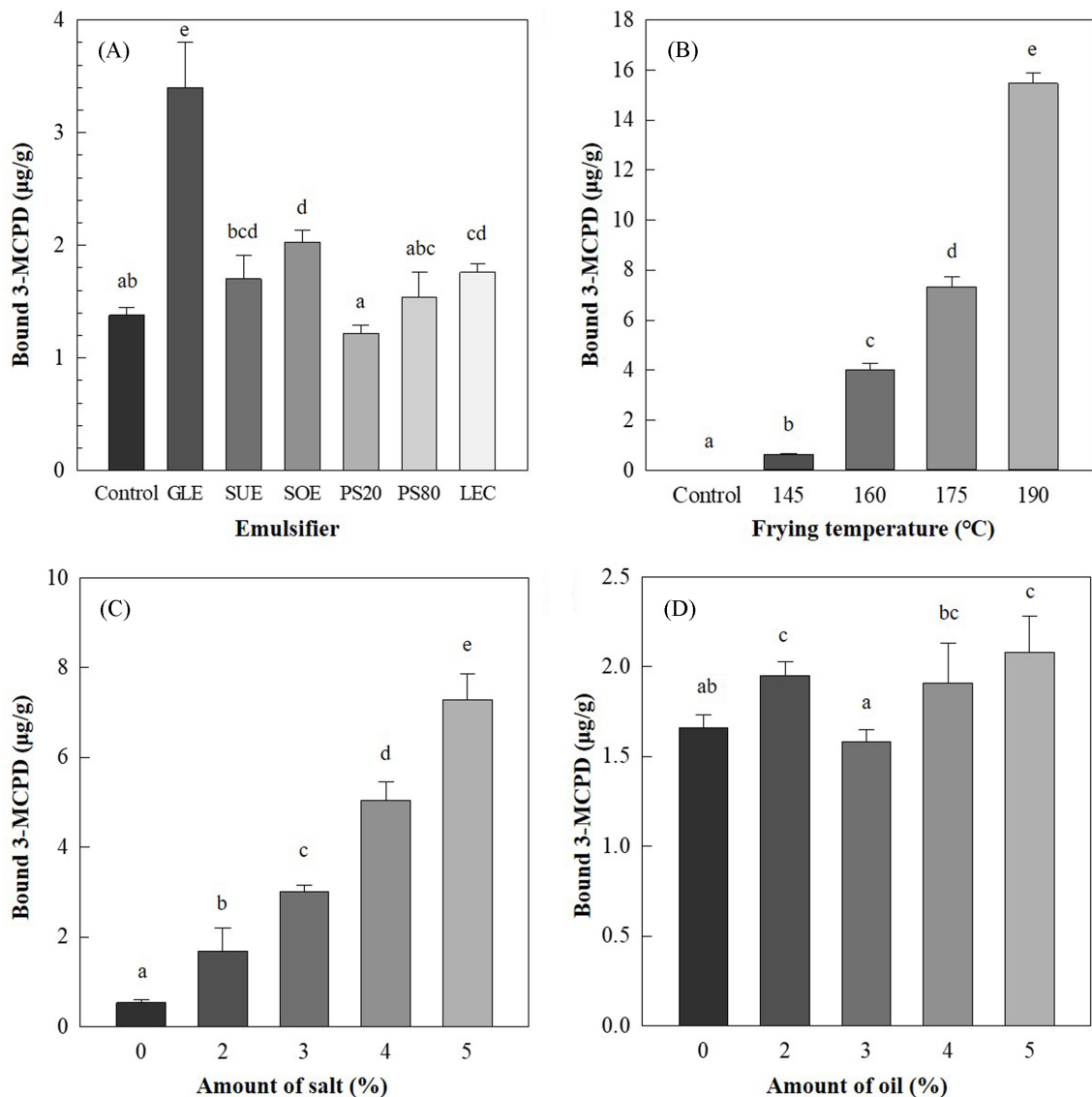


Fig. 2. Effects of emulsifier, frying temperature, salt, and oil on the formation of bound 3-MCPD in fried snack model. (A) Effect of emulsifier, GLE: glycerin ester of fatty acids, SUE: sucrose ester of fatty acids, SOE: sorbitan ester of fatty acids, PS20: polysorbate 20, PS80: polysorbate 80, LEC: lecithin; (B) Effect of frying temperature; (C) Effect of salt; and (D) Effect of oil. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Zhao 등(2016)에 의해 제안되었다. 즉, 가열에 의해 모노아실글리세롤(monoacylglycerol)의 C-3에서 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical)이 제거되면서 탄소 중심 라디칼(carbon-centered radical)이 생성되고, 이 라디칼과 C-1에 있는 에스테르의 카보닐기가 반응하여 cyclic acyloxonium free radical 중간체를 생성한 후 염소 라디칼이 반응하여 결합형 3-MCPD를 생성한다는 것이다.

유탕 온도에 따른 결합형 3-MCPD의 생성

유탕 온도가 결합형 3-MCPD의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 145, 160, 175 및 190°C의 기름에서 유탕 과자를 제조하여 실험군으로 사용하였다. 대조군은 튀기지 않은 반죽을 상온에서 보관한 것으로 하였다. 유탕 온도를 달리하여 제조한 시료에서 결합형 3-MCPD를 분석하였으며 그 결과는 Fig. 2B에 나타내었다.

비결합형 3-MCPD는 모든 실험군에서 검출되지 않았는데 이

는 유화제로 글리세린지방산에스테르를 사용하였기 때문으로 생각된다. 결합형 3-MCPD는 대조군에서는 검출되지 않았고, 145°C에서 0.64 ± 0.03 µg/g, 160°C에서 4.00 ± 0.26 µg/g, 175°C에서 7.34 ± 0.41 µg/g, 그리고 190°C에서 15.6 ± 0.41 µg/g이 검출되었다. 유탕 온도가 증가할수록 결합형 3-MCPD의 함량은 유의적으로 증가하여, 유탕 온도가 190°C일 때는 유탕 온도가 145°C일 때에 비해 결합형 3-MCPD가 약 24배 많이 생성되었다. 따라서 유탕 과자에서 유탕 온도는 결합형 3-MCPD의 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. Chai 등(2018)은 beef flavor에 소금을 첨가하고 가열을 하였을 때, 가열 온도가 높을수록 결합형 3-MCPD의 생성량도 증가한다고 보고하였다.

소금 함량에 따른 결합형 3-MCPD의 생성

소금 함량이 결합형 3-MCPD의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 소금을 2, 3, 4 및 5% 첨가한 반죽을 170°C에서 가공하

여 유당 과자를 제조하였으며, 소금을 첨가하지 않은 반죽으로 같은 조건에서 유당과자를 제조하여 대조군으로 사용하였다. 소금 함량을 달리하여 제조한 유당 과자의 결합형 3-MCPD 분석 결과는 Fig. 2C에 나타내었다.

비결합형 3-MCPD는 모든 실험군에서 검출되지 않았고, 결합형 3-MCPD는 대조군에서 $0.54 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$, 2%의 소금을 첨가한 시료에서 $1.69 \pm 0.51 \mu\text{g/g}$, 3%의 소금을 첨가한 시료에서 $3.00 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$, 4%의 소금을 첨가한 시료에서 $5.05 \pm 0.41 \mu\text{g/g}$, 그리고 5%의 소금을 첨가한 시료에서 $7.29 \pm 0.58 \mu\text{g/g}$ 검출되었다. 대조군에서도 결합형 3-MCPD가 검출되었는데 Reece(2005)는 유화제와 밀가루개량제 등 식품첨가물을 사용 시 결합형 3-MCPD가 생성될 수 있다고 보고하였고, Shimizu 등(2012)은 튀김유로 사용된 대두유가 탈취 과정을 거치면서 결합형 3-MCPD를 함유할 수 있다고 하였으며, Tiong 등(2018)은 식물성 기름에 포함된 유기염소에 의해 결합형 3-MCPD가 생성될 수 있다고 보고하였다. 따라서 소금이 첨가되지 않더라도 결합형 3-MCPD가 생성될 수 있는 것으로 보인다. 실험군의 경우 사용된 소금 함량에 비례하여 결합형 3-MCPD의 생성량이 증가하는 경향을 보였으며, 2%의 소금을 첨가하였을 때에 비해 5%의 소금을 첨가하였을 때 결합형 3-MCPD가 약 4배 많이 생성되었다. Chai 등(2018)은 beef flavor에 소금의 양을 변화시켜 결합형 3-MCPD의 생성량을 측정하였는데 첨가된 소금 함량이 증가할수록 결합형 3-MCPD의 생성량도 증가하는 경향을 보인다고 보고하였다. 따라서 유당 과자에 첨가되는 소금 함량은 결합형 3-MCPD의 생성에 크게 영향을 미치는 것으로 생각된다.

유지 함량에 따른 결합형 3-MCPD의 생성

유지 함량이 결합형 3-MCPD의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 triolein을 2, 3, 4 및 5% 첨가한 반죽을 170°C 기름에서 튀겨 유당 과자를 제조하였으며, triolein을 첨가하지 않은 반죽으로 유당 과자를 제조하여 대조군으로 사용하였다. 유지 함량을 달리하여 제조한 시료의 결합형 3-MCPD 분석 결과는 Fig. 2D에 나타내었다.

비결합형 3-MCPD는 모든 실험군에서 검출되지 않았으며, 결합형 3-MCPD의 경우 대조군에서는 $1.66 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$, 2%의 유지를 첨가한 시료에서 $1.95 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$, 3%의 유지를 첨가한 시료에서 $1.58 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$, 4%의 유지를 첨가한 시료에서 $1.91 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$, 그리고 5%의 유지를 첨가한 시료에서 $2.08 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ 이 검출되었다. 즉, 사용된 유지 함량과 결합형 3-MCPD 생성량 사이에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 유지를 첨가하지 않은 대조군에서도 결합형 3-MCPD가 검출되었는데, 이는 유지가 첨가되지 않더라도 유당 과자에 포함된 소금, 튀김유와 유화제 등에 의해 결합형 3-MCPD가 생성될 수 있음을 나타낸다. 즉, 유지 함량은 결합형 3-MCPD의 생성에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 유당 과자 모델에서 4가지 요인(유화제 종류, 유당 온도, 소금 함량, 유지 함량)이 결합형 3-MCPD의 생성에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 먼저 3-MCPD 분석법 검증에 위해 검출한계, 정량한계, 직선성, 정밀성 및 정확성을 구하였고, 분석 시 흡착 컬럼으로 사용한 aluminum oxide와 Extrelut® NT-3 컬럼을 비교하였다. Aluminum oxide에 비해 Extrelut® NT-3 컬럼으로 추출하였을 때 피크 면적이 약 5배 더 높아, 흡착 컬럼으로 Extrelut® NT-3를 사용하는 방법이 3-MCPD 분석에 더 적합

할 것으로 생각되었다.

직선성은 3-MCPD 표준용액 검량선의 상관계수가 0.9997 이상의 양호한 직선성을 보였다. 기기의 검출한계는 0.86 ng/mL , 정량한계는 2.61 ng/mL 이었다. 분석법의 정밀성 및 정확성은 과자 반죽을 이용하여 비교하였다. 3-MCPD 분석법의 일내 정확성은 81.3-94.0%, 일간 정확성은 82.1-89.0% 수준이었으며, 결합형 3-MCPD 분석법의 일내 정확성은 84.1-99.3%, 일간 정확성은 87.7-91.1% 수준이었다. 3-MCPD 분석법의 일내 정밀성은 1.5-7.8% RSD, 일간 정밀성은 1.1-5.6% RSD 수준이었으며, 결합형 3-MCPD 분석법의 일내 정밀성은 2.8-8.9% RSD, 일간 정밀성은 5.0-6.8% RSD 수준이었다.

유당 과자 모델에서 유화제 종류는 결합형 3-MCPD 생성에 영향을 주어 유화제 6종 중 글리세린지방산에스테르를 첨가한 시료에서 가장 많은 결합형 3-MCPD가 검출되었다. 유당 온도에 따른 결합형 3-MCPD 생성량을 분석한 결과 온도가 증가함에 따라 결합형 3-MCPD의 함량도 증가하였다. 190°C로 가열하였을 때 145°C에 비해 결합형 3-MCPD 함량은 약 24배 높았다. 소금 함량 또한 결합형 3-MCPD 생성에 영향을 주어 소금 함량에 비례하여 결합형 3-MCPD의 생성량이 유의적으로 증가하였다. 유지 함량에 따른 결합형 3-MCPD 생성량을 분석한 결과 유지 함량이 증가하여도 결합형 3-MCPD의 생성량에는 유의적인 차이가 없었다. 본 연구를 통해 유당 과자에서 유화제 종류, 유당 온도와 소금 함량이 결합형 3-MCPD의 생성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

References

- ANZFA. Maximum limit for chloropropanols in soy and oyster sauces. Available from: http://www.foodstandards.gov.au/code/proposals/documents/P243_FAR.pdf. Accessed Nov. 20, 2018.
- BfR. Infant formula and follow-up formula may contain harmful 3-MCPD fatty acid esters, BfR Opinion No. 047/2007, 11 December. Available from: https://www.bfr.bund.de/cm/349/infant_formula_and_follow_up_formula_may_contain_harmful_3_mcpd_fatty_acid_esters.pdf. Accessed Nov. 20, 2018.
- Breitling-Utzmann CM, Hrenn H, Haase NU, Unbehnd GM. Influence of dough ingredients on 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) formation in toast. Food Addit. Contam. 22: 97-103 (2005)
- Chai Q, Hayat K, Karangwa E, Duhoranimana E, Zhang X, Xia S, Yu J. Investigating the optimum conditions for minimized 3-chloropropane-1, 2-diol esters content and improved sensory attributes during savory beef flavor preparation. Food Chem. 243: 96-102 (2018)
- Divinova V, Svejtkovska B, Dolezal M. Determination of free and bound 3-chloropropane-1, 2-diol by gas chromatography with mass spectrometric detection using deuterated 3-chloropropane-1, 2-diol as internal standard. Czech J. Food Sci. (Czech Republic) (2004)
- FAO. Request for comments to the draft maximum levels for 3-MCPD in liquid condiments containing acid-hydrolyzed vegetable proteins (excluding naturally fermented soy sauce) (N08-2004). Available from: http://www.fao.org/tempref/codex/Circular_Letters/CxCL2007/cl07_29e.pdf. Accessed Nov. 20, 2018.
- Government of Canada. Health Canada's maximum levels for chemical contaminants in foods. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html#a1>. Accessed Nov. 20, 2018.
- HHS. Guidelines for the validation of chemical methods for the FDA FVM program (2015)
- Homonnai ZT, Paz G, Sofer A, Yedwab GA, Kraicer PF. A direct effect of α -chlorohydrin on motility and metabolism of ejaculated human spermatozoa. Contraception 12: 579-588 (1975)

- IARC. Agents classified by the IARC monographs, Volumes 101. Available from: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono-101-010.pdf>. Accessed Nov. 17, 2018.
- JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants (Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 909 (2002)
- JECFA. Evaluation of certain contaminants in food (Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 1002 (2017)
- Jones AR. The metabolism of 3-chloro-, 3-bromo- and 3-iodopropane-1, 2-diol in rats and mice. *Xenobiotica* 5: 155-165 (1975)
- Jones AR, Porter K, Stevenson D. The renal toxicity of some halogenated derivatives of propane in the rat. *Naturwissenschaften* 68: 98-99 (1981)
- Lanner DA, Chang DS-J, Hsieh Y-PC. Fried snack. Google Patents (2000)
- Larsen JC. 3-MCPD esters in food products. Summary Report of a Workshop held in February 2009 in Brussels, Belgium (2009)
- MFDS. Guidelines on standard procedures for preparing analysis method. B2-2016-1-001 (2016)
- OEHHA. 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD; α -chlorohydrin) California Environmental Protection Agency. Available from: <https://oehha.ca.gov/media/downloads/proposition-65/crn/comments/ihpc3mcpd.pdf>. Accessed Nov. 19, 2018.
- Official Journal of the European Union (OJ). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>. Accessed Nov 19, 2018.
- Reece P. The origin and formation of 3-MCPD in foods and food ingredients (final project report). Food Stand. Agency, London (2005)
- Sadowska-Rociek A, Cielik E, Sieja K. Mitigation role of erythritol and xylitol in the formation of 3-monochloropropane-1, 2-diol and its esters in glycerol and shortbread model systems. *Eur. Food Res. Technol.* 243: 2055-2063 (2017)
- Seefelder W, Varga N, Studer A, Williamson G, Scanlan FP, Stadler RH. Esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD. *Food Addit. Contam.* 25: 391-400 (2008)
- Shimizu M, Vosmann K, Matthus B. Generation of 3-monochloro-1, 2-propanediol and related materials from tri-, di-, and monoolein at deodorization temperature. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 114: 1268-1273 (2012)
- Tiong SH, Saparin N, Teh HF, Ng TLM, Md. Zain MZ bin, Neoh BK, Md Noor A, Tan CP, Lai OM, Appleton DR. Natural organochlorines as precursors of 3-monochloropropanediol esters in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 66: 999-1007 (2018)
- Velišek J, Calta P, Dolezal M, Crews C, Hasnip S. 3-Chloropropane-1, 2-diol in models simulating processed foods: precursors and agents causing its decomposition. *Czech J. Food Sci.* 21: 153-161 (2003)
- Velišek J, Davidek J, Hajlov J, Kubelka V, Janek G, Mnkov B. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Z. Lebensm. Unters. For.* 167: 241-244 (1978)
- Weißhaar R. Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 113: 304-308 (2011)
- Woo S, Oh JH, Jang YM, Kim MH. Analysis method development for bound-MCPD. *J. Food Hyg. Saf.* 25: 294-302 (2010)
- Yang S, Kwon K, Choi J, Jo C H. Improvement of a GC - MS analytical method for the simultaneous detection of 3-MCPD and 1,3-DCP in food. *Food Sci. Biotechnol.* 27(3): 859-866 (2018)
- Zelinkov Z, Doleal M, Velek J. Occurrence of 3-chloropropane-1, 2-diol fatty acid esters in infant and baby foods. *Eur. Food Res. Technol.* 228: 571-578 (2009)
- Zelinkov Z, Novotn O, Schrek J, Velek J, Hajlov J, Doleal M. Occurrence of 3-MCPD fatty acid esters in human breast milk. *Food Addit. Contam.* 25: 669-676 (2008)
- Zelinkov Z, Svejkovsk B, Velek J, Doleal M. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils. *Food Addit. Contam.* 23: 1290-1298 (2006)
- Zhao Y, Zhang Y, Zhang Z, Liu J, Wang YL, Gao B, Niu Y, Sun X, Yu L. Formation of 3-MCPD fatty acid esters from monostearoyl glycerol and the thermal stability of 3-MCPD monoesters. *J. Agric. Food Chem.* 64: 8918-8926 (2016)