

LC-MS를 이용한 수용액중의 3-MCPD 정량

박교범¹ · 김용화² · 김진성² · 정자영³ · 김충용² · 이석근^{1*}

¹한국화학연구원 화학분석센터, ²안전성평가연구소 독성연구부,

³식품의약품안전청 국립독성연구원 독성병리과

(2007. 4. 2. 접수, 2007. 4. 23. 승인)

Quantitative analysis of 3-MCPD in water using LC-MS

Gyo-Beom Park¹, Yong-Hwa Kim², Jin-Sung Kim², Ja-Young Jeong³,
Choong-Yong Kim² and Sueg-Geun Lee^{1*}

¹Center for Chemical Analysis, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusung, Taejeon 305-343, Korea,

²Toxicology Research Division, Korea Institute of Toxicology, P.O. Box 123,
Yusung, Taejeon 305-606, Korea,

³Department of Toxicologic Pathology, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration 5Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul, 122-704, Korea

(Received April 2, 2007; Accepted April 23, 2007)

요 약: 수용액상에 존재하는 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD)의 LC-MS를 이용한 분석방법을 개발하였다. 수용액 시료에 수산화나트륨 용액을 첨가하여 강알칼리 상태를 유지시킨 후, 3-MCPD의 유도체화를 위하여 benzoyl chloride 25 μ L을 넣어 직접 반응시켰다. 반응 후 유도체를 pentane으로 추출하여 LC-MS의 selected ion monitoring (SIM) 법으로 정량하였다. 분석결과 검량선은 1.0-100 μ g/mL 농도범위에서 $r^2 = 0.992$ 의 상관관계 계수를 갖는 좋은 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 0.01 μ g/mL 이하였다. LC-MS에 의한 분석방법의 회수율은 92.3-98.0%이었다.

Abstract: The analysis method of 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) compound in water was developed using liquid chromatography with mass spectrometric detection. Aqueous solution was controlled in strong basic condition with sodium hydroxide, and then 25 μ L of benzoyl chloride was added to the solution for the derivatization of 3-MCPD. The derivative was extracted using pentane and analyzed by the selected ion monitoring (SIM) method of LC-MS. The results of analyses showed that the calibration curves was in the range of 1.0 to 100 μ g/mL with a good linearity (correlation coefficient of $r^2 = 0.992$) and limit of detection was below 0.01 μ g/mL. The recoveries of this analysis method by LC-MS were 92.3-98.0 %.

Key words : 3-Monochloropropane-1,2-diol, 3-MCPD, LC-MS, benzoyl chloride.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-860-7710 Fax : +82-(0)42-860-7794

E-mail: leesg@pado.kriict.re.kr

1. 서 론

3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD)은 무색 또는 옅은 황색의 발암성 물질로서 식물성 단백질이 아미노산과 지방으로 분해될 때 잔존하는 지방이 글리세린과 지방산으로 가수분해 되는 과정에서 미량의 글리세린이 염산과 반응하여 생성 되는 chloropropanols 계열의 일종이다.¹⁻³ 이 과정에서 생성되는 독성오염물질은 3-MCPD가 가장 많이 생성되며, 다음으로 2-chloro-1,3-propanediol, 1,3-dichloro-2-propanol(1,3-DCP) 및 2,3-dichloro-1-propanol(2,3-DCP) 등으로 생성된다.⁴

특히 3-MCPD는 전자형성을 억제하고 유전독성을 가지고 있어⁵⁻⁷ 식품조성 성분에서 3-MCPD의 양을 엄격히 규제하고 있으며,⁸ 유럽에서는 0.02 mg/kg 까지 제한하고 있다. 이러한 성분규제를 대응하기 위하여 3-MCPD 양을 검출하고 정량하는 것이 매우 중요하다.

3-MCPD는 휘발성이 낮고 극성이 커서 회수율이 좋지 않으며 GC에 직접 주입할 때 주입구나 컬럼 등에 흡착되어 감도가 매우 낮은 단점이 있기 때문에 대부분 유도체화시킨 후 분석한다. 일반적으로 널리 알려진 3-MCPD의 유도체화 방법은 *N*, *O*-bis-(trimethyl silyl)trifluoroacetamide⁹를 이용한 silylation 방법과 phenylboric acid를 이용한 alkylation¹⁰⁻¹¹ 및 butaneboronic acid¹²나 heptafluorobutyric acid¹³⁻¹⁴의 유도체화법을 이용한 GC 분석방법들이 있다.

Hamlet 등¹⁵⁻¹⁶은 조미료나 식품첨가물에 존재하는 3-MCPD를 GC-MS를 이용하여 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 측정범위로 분석하는 방법을 개발하였고, Meichans 등¹⁷은 3-MCPD를 위한 GC-MS 방법을 보다 더 발전 시켰다.

그러나 위의 유도체화 방법들은 수용액상태의 3-MCPD를 먼저 유기용매로 추출하여 농축한 후 유도체화 과정에서 실험의 오차가 크게 나타날 수 있으며, 많은 시간과 노동력이 소비된다. 따라서 3-MCPD와 같은 극성을 가진 화합물을 직접 추출하는 방법보다 먼저 유도체화 반응을 통하여 극성을 나타내는 3-MCPD의 수산화(OH)기를 비극성 기로 치환 시키면, 그 유도체는 극성이 줄어들어 물에 대한 용해도가 감소하므로 추출효율을 높일 수 있으며 휘발성과 분리능이 증가할 뿐만 아니라 열적으로 안정하여 감도와 선택성이 향상 된다.

본 연구에서는 동물에게 투여하기 위하여 30, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 3 가지 농도로 조제된 3-MCPD 수용액의 균질성을 측정하기 위하여 benzoyl chloride에 의한 유도체화법과¹⁸⁻¹⁹ LC-MS를 이용한 새로운 분석

방법을 시도하였다. 즉, 수용액 상태의 3-MCPD 시료를 직접 유도체화하기 위하여 수산화나트륨 용액을 첨가하여 강알칼리 상태로 조절한 후 benzoyl chloride와 반응시켜 유도체화 한 후, 유기용매인 pentane을 사용하여 3-MCPD의 유도체를 추출한 후 selected ion monitoring 법의 LC-MS를 사용하여 정량하였다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 사용된 표준물질과 내부표준물질인 3-MCPD(99.7%)와 ethylene glycol(99.7%)은 Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였고 수산화나트륨은 Merck (Darmstadt, Germany)로 부터 구입하였다. 유도체화 시약인 benzoyl chloride(99.8%)는 Sigma-Aldrich(Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 유도체를 추출하기 위해 사용한 pentane은 Berdick & Jackson(Muskegon, MI, USA)에서 구입하였다. 표준 용액을 만들기 위하여 사용된 물은 Milli-Q(Millipore, Bedford, USA) 증류장치를 통과시킨 증류수를 사용 하였다.

2.2. MS기기 및 조건

본 연구에서 사용한 LC-MS system은 HP-1100 Series liquid chromatograph/HP 1100 Series mass selective detector(Agilent Technologies, Palo, Alto, CA, USA)와 HP-1100 Series diode array 검출기(model 996, Agilent)로 구성된 것을 사용하였으며 MS의 이온화 방식은 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI)법을 이용한 역상 HPLC에 의하여 분석하였다.

HPLC 분석조건으로 Luna-C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm i.d., ×5 μm)을 사용하였으며, isocratic 용매 조건으로써 methanol(용매 A)와 10 mM ammonium acetate(용매 B)를 A : B = 85% : 15%의 조성을 사용하였으며, 유속은 0.5 mL/min 이었다.

전자분무이온화법(electrospray ionization, ESI)의 분석조건은 유속 10 L/min의 액체질소(99.99%)를 drying gas(350 °C)로 사용하였으며, 이때 분사압력은 30 psi이고 fragmentor voltage는 ethylene glycol(ISTD)과 3-MCPD에 대하여 각각 40 V와 80 V를 적용하였다. Capillary voltage는 3,500 V였으며, 양이온 모드의 특징이온을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring (SIM)법을 사용하였다. 그리고 시료 주입방법은 autosampler를 이용하여 10 μL 을 주입하여 분석하였다.

Table 1. Retention time, quantitation and confirmation ions

Compounds	Retention time (min)	Characteristic ions (m/z)	
		Quantitation ion	Confirmation ion
ISTD ^a (derivative)	6.61	271.4	288.4
3-MCPD(derivative)	9.57	283.4	

^a Internal standard(ethylene glycol).

LC-MS에 사용된 표준물질과 내부 표준물질의 머무름 시간 및 특성이온은 Table 1에 나타났다.

2.3. 표준용액의 제조 및 회수율 측정

3-MCPD의 표준용액 제조는 위에서 구입한 표준품을 0.1 mg까지 무게를 달아 증류수를 사용하여 1000 µg/mL의 표준원액으로 만들고 검정용액은 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도범위로 표준원액을 희석하여 만들었다.

내부표준용액의 조제는 ethylene glycol를 3차 증류수에 녹여 1,000 µg/mL의 표준원액이 되도록 만들었으며, 표준용액들은 4°C 이하의 냉장고에 보관하여 사용하였다.

회수율 측정을 위하여 3-MCPD의 농도는 1.0 µg/mL와 50 µg/mL의 두 가지 용액을 조제하여 사용하였다.

2.4. 시료

3-MCPD를 30, 100 및 200 µg/mL의 농도로 각각 조제한 후, 1,000 mL 용량의 유리병에 넣은 후 균질성을 확인하기 위하여 각 농도에 해당하는 유리병의 수용액을 상, 중, 하층의 3 등분으로 나누어 직접 채취하여 농도를 측정 하였다.

2.5. 유도체화 방법

검정곡선을 작성하기 위한 1.0-100 µg/mL의 농도범위로 조제한 3-MCPD 표준용액과 회수율 측정을 위한 1.0, 50 µg/mL의 두 가지 용액의 시료를 1 mL씩 취하여 5 mL vial에 각각 넣고, 여기에 1000 µg/mL의 내부표준용액을 50 µL 씩 첨가하였다. 이 혼합용액에 30% 수산화나트륨 용액을 700 µL 씩 넣어 알칼리성 조건으로 만든 다음 benzoyl chloride를 25 µL 첨가하고 10분간 초음파 진동기(Fisher Scientific state/ultrasonic FS-28)를 사용하여 유도체화 반응을 진행시켰다. 유도체화가 종료된 후 실온에서 10분간 정지한 다음 pentane을 각각 2 mL 씩 넣고 초음파 진동

기를 다시 10분 동안 작동시켜서 유도체를 추출하였다. 추출물 중에서 1 mL만 취하여 pentane 용매를 질소로 휘발시키고 여기에 50% methanol 수용액 1 mL를 첨가하여 메이크업한 후 LC-MS에 10 µL을 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

1.0-100 µg/mL의 농도 별로 만든 3-MCPD 표준물질을 LC-MS의 전자분무 이온화방법으로 분석하여 얻어진 상관 관계식은 $y = 0.040x + 0.053$ 이었고 이때 r^2 값이 0.992이상을 나타냄에 따라 직선성이 좋고 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

Table 2. Recovery(%) obtained from the samples of 3-MCPD spiked into water using LC-MS

Compound	Spiked level (µg/mL)	Mean ^a	
		Recovery(%)	R.S.D(%)
3-MCPD	1.0	92.3	6.3
	50	98.0	3.0

^aMean value from 5 measurements.

3.2. 회수율 측정

3-MCPD의 회수율을 측정하기 위하여 1.0 µg/mL와 50 µg/mL의 두 용액에 대하여 위와 같은 유도체화 과정을 적용하였으며, 회수율 측정결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 보느냐와 같이 1.0 µg/mL의 낮은 농도의 회수율은 92.3%이었고, 50 µg/mL의 회수율은 98.0%로 나타나, 높은 농도의 회수율이 더 좋은 것을 알 수 있었다. 또한 두 농도에 대한 상대표준편차(relative standard deviation, R.S.D)의 평균값은 각각 6.3%와 3.0%로 나타나 재현성이 매우 좋았으며, 검출한계는 0.01 µg/mL로 나타났다.

3.3. 액체크로마토그래피의 분리 및 유도체화

수용액상에 들어있는 3-MCPD를 낮은 농도까지 검출하기 위하여 감도와 선택성을 높이고 전처리 시간을 단축하기 위하여 수용액상에서 benzoyl chloride로 직접 유도체화를 하였다.

알려진 바와 같이 유도체화를 하기 위해서는 수분이 없어야 하며 분석물질이 물에 존재하면 일반적으로 유기용매를 사용하여 물에서 추출 후 농축하여 분

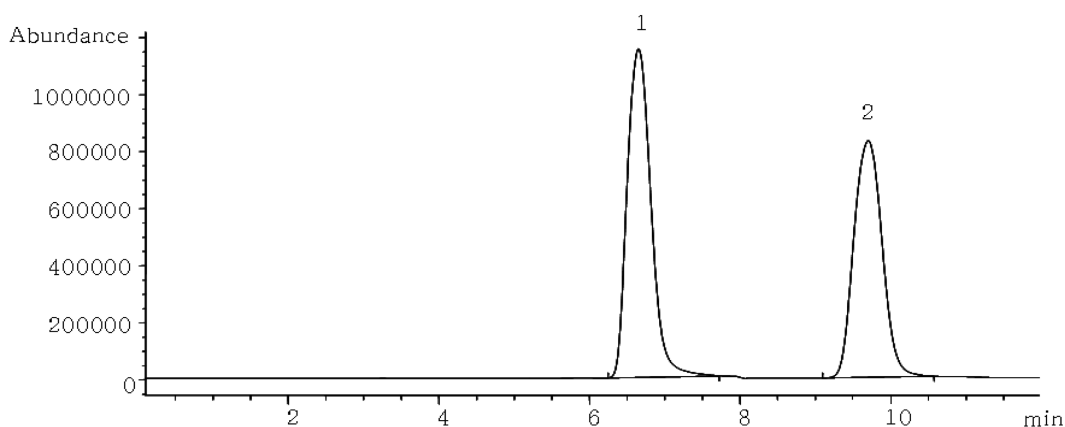


Fig. 1. Total ion chromatogram (TIC) of the derivatives of standard obtained by LC/MS-ESI (positive). The numbered peaks are: 1 = Ethylene glycol (ISTD); 2 = 3-MCPD.

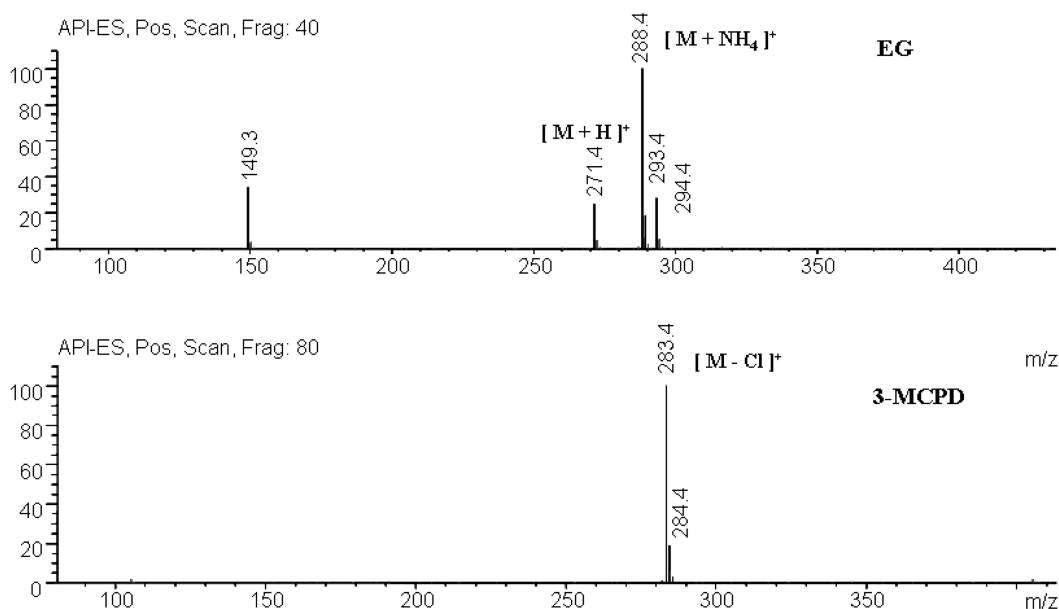


Fig. 2. Mass Spectra for the derivatives of 3-MCPD and ISTD (ethylene glycol) using LC/MS-ESI.

석물질에 존재하는 수분을 제거 한 후 유도체화를 해야 한다.

그러나 본 연구에서는 이러한 번거로운 과정을 생략하고 쉽고 간편하게 유도체화를 하기 위하여 물에 들어 있는 3-MCPD와 ethylene glycol(ISTD)를 benzoyl chloride를 사용하여 직접 유도체화 하였다. 또한 benzoyl chloride는 반응성이 커 공기와 접촉하거나 오래 보관하였을 경우 미량의 benzoic acid anhydride가 내부적으로 생성되어 유도체화 하기 전 시약 자체에서 검출되는 것이 확인되었다.

위 그림은 표준물질(3-MCPD) 및 내부표준물질(ethylene glycol)을 benzoyl chloride를 사용하여 유도체화 후 얻은 이온크로마토그램 및 질량스펙트럼을 Fig. 1과 Fig. 2에 각각 나타내었다.

Fig. 1은 유도체화 된 표준물질(3-MCPD)과 내부표준물질(ethylene glycol)에 대한 이온크로마토그램으로서 LC/MS-ESI의 positive scan mode를 사용하여 m/z 100-450의 mass range에서 분석하여 얻어진 결과이다. 이온크로마토그램에서 보는 바와 같이 표준물질 및 내부표준물질은 본 실험의 분리 컬럼에 적용한 조건

에 의하여 모두 12분 이내에 완전히 분리되어 나왔으며, 두 봉우리 모양이 모두 비극성 물질에서 볼 수 있는 것과 같이 뾰족한 대칭형태를 나타내었다.

Fig. 2는 표준물질과 내부표준물질의 유도체에 대한 질량스펙트럼을 나타낸 것으로서, 유도체화 되기 전의 내부표준물질로 사용한 ethylene glycol의 분자이온은 62 Da이었으나 유도체화 하고난 후의 스펙트럼에서 ethylene glycol의 OH 기의 수소대신 2개의 benzoyl 기 $C_6H_5CO^+$ (105 Da)가 결합하여 210 Da 만큼 질량이 증가하여 $[M + H]^+ = 271$ Da의 분자이온이 생성된 것을 볼 수 있었으며, 그 뒤에 검출된 $[M + NH_4]^+ = 288$ Da과 $[M + Na]^+ = 293$ Da의 adduct 이온을 확인할 수 있었다.

이 결과는 LC-MS의 전자분무 이온화방법의 전형적인 스펙트럼으로 $[M + H]^+$ 뿐만 아니라 $[M + NH_4]^+$ 과 $[M + Na]^+$ 와 같은 금속이온이 결합된 adduct 분자이온이 함께 측정됨으로써 유도체화 반응이 잘 진행되었음을 확인할 수 있었다.

3-MCPD의 분자이온은 110 Da이며 2 개의 OH에 결합되어 있는 수소대신 2개의 benzoyl 기 $C_6H_5CO^+$ (105 Da)가 결합하여 210 Da 만큼 증가하여 318 Da의 유도체가 생성된 후, 여기에서 Cl 원자가 떨어진 $[M - Cl]^+ = 283$ Da의 분자이온이 검출되었다.

3.4. 시료의 분석

1,000 mL 유리병 속의 30, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 3-MCPD 수용액을 각각 농도별로 상, 중, 하층의 3등분으로 나누어 채취한 시료를 분석하였으며, 결과는 Table 3에 나타내었다. Table 3에서와 같이 3-MCPD의 함량이 각각의 농도 별로 상, 중, 하층의 농도가 유사함을 알 수 있었으며, 이는 3-MCPD가 수용액상에서 균질하게 용해되어 있는 것을 알 수 있었다.

표준편차는 30 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 상층이 0.7이었고 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 하층농도에서 9.4를 나타남에 따라 좋은 재현성을 얻었다.

Table 3. Concentration ($\mu\text{g/mL}$) of 3-MCPD in water

Samples	Mean ^a ±S.D.		
	Upper	Middle	Lower
30 mg/mL	32.1±0.7	31.4±1.0	33.9±0.8
100 mg/mL	101.7±5.1	97.4±3.9	97.4±1.5
200 mg/mL	201.9±3.3	198.6±1.8	191.5±9.4

^aMean value from 5 measurements.

4. 결 론

수용액에 존재하는 3-MCPD를 분석하기 위한 방법으로 지금까지는 유기용매를 사용하여 3-MCPD를 추출 후 유도체화 하여 GC 및 GC-MS로 분석하는 방법이 대부분이었으나 이러한 방법은 번거롭고 노동력이 많이 소요되며 회수율이 낮은 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 수용액상의 시료에 benzoyl chloride를 직접 사용하여 유도체화한 결과 반응시간이 10분 정도로, 기존의 유도체화 분석방법들 보다 간단하며, LC-MS를 이용하여 분석한 결과 정량범위 1.0-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $r^2 = 0.992$ 의 상관관계 계수를 갖는 좋은 직선성을 나타내었고 회수율은 92.3-98.0%로 매우 높았으며 상대표준편차는 평균 3.0%와 6.3% 사이의 값을 얻을 수 있었다.

각각의 농도별로 상, 중, 하층의 농도차가 비슷한 것으로 나타난 결과에 의하면 3-MCPD가 수용액 상태에서 균질하게 용해되어 있다는 균질성을 확인할 수 있었으며, 본 연구의 LC-MS를 이용한 방법이 수용액에 존재하는 3-MCPD를 정량하기 위한 기존의 방법들 보다 우수함을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 연구사업(06132독관리378)으로 수행되었으며 분석에 도움을 주신 유승룡 선생께 감사드립니다.

참고문헌

1. J. B. Conant and O. R. Quayle, *Organic Syntheses Collective*, **I**, 294-296 (1941).
2. J. Velisek, J. Davidek, V. Kubelka, G. Janicek, Z. Svobodova, Z. Simicova, *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1142-1144 (1980).
3. P. D. Collier, D. D. O. Cromine, A. P. Davies, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 785-790 (1991).
4. C. A. Van Bergen, P. D. Collier, D. D. O. Cromine, R. A. Rucas, H. D. Preston, and D. J. Sissons, *J. Chromatogr.* **589**, 109-119 (1992).
5. K. T. Kirton, R. J. Ericsson, J. A. Ray, A. D. Forbes, *J. Reprod. Fert.* **21**, 275 (1970).
6. E. K. Weisburger, B. M. Uliand, J. Nam, J. J. Gart, J. H. Weisburger, *J. Natl. Cancer* **67**, 75-88 (1981).

7. L. Silhankova, F. Smid, M. Cerna, J. Davidek, J. Velisek, *Mutat. Res.* **103**, 77-81 (1982).
8. Position Paper on Chloropropanols for the Thirty-third Session of the Code Commit-tee on Food Additives and Contaminants, Joint FAO/WHO Food Standard program, 2001.
9. E. Kissa, *J. Chromatogr.* **605**, 134-138 (1992).
10. L. E. Rodman, R. D. Ross, *J. Chromatogr.* **369**, 97-103 (1986).
11. W. J. Plantinga, W. G. van Toorn, G. H. D. van der Stegen, *J. Chromatogr.* **555**, 311-314 (1991)
12. R. L. Pesselman, M. J. Feit, *J. Chromatogr.* **439**, 448-452 (1988).
13. W.-C. Chung, K.-Y. Hui, S.-C. Cheng, *J. Chromatogr. A* **952**, 185-192 (2002).
14. C. A. van Bergen, P. D. Collier, D. D. O. Cromie, R. A. Lucas, H. D. Preston, D. J. Sissons, *J. Chromatogr.* **589**, 104-109 (1992).
15. C.G. Hamlet, P.G. Sutton, *Rapid Commun. Mass Spectrum.* **11**, 1417(1997).
16. C.G. Hamlet, *Food Addit. Contam.* **15**, 451(1998).
17. D.C. Meierhans, J. Bruehlmann, J. Meili, C. Taeschler, *J. Chromatogr. A* **802**, 325-333(1998).
18. M. Holcapek, H. Virelizire, J. Chamot-Rooke, P. Jandera, and C. Moulin, *Anal. Chem.* **71**, 2288-2293 (1999).
19. 박교범, 이석근, *한국분석과학회지*, **17**(6), 527-531 (2004).