

< Original Article >

LC-MS/MS를 이용한 소시지 중 보존료 동시분석

고바라다 · 김지연 · 장미선 · 서두리 · 정보람 · 신지현 · 임진택 · 김용환* · 김은선

광주광역시보건환경연구원

Simultaneous determination of preservatives in sausages using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry

Ba-Ra-Da Koh, Ji-Yeon Kim, Mi-Sun Jang, Doo-Ri Seo, Bo-Ram Jung, Ji-Hyun Shin,
Jin-Taek Lim, Yong-Hwan Kim*, Eun-Sun Kim

Health & Environment Research Institute of Gwangju, Gwangju 500-210, Korea

(Received 20 June 2015; revised 23 June 2015; accepted 25 June 2015)

Abstract

A simultaneous determination method was developed for nine preservatives (benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, methyl-, ethyl-, isopropyl-, propyl-, isobutyl- and butyl-parabens) in sausage by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). Each parameter was established by multiple reaction monitoring in negative mode. Separation was achieved on a phenyl-hexyl (2.5 μ m, 2.1 \times 150 mm, Waters) with A-20 mM ammonium acetate containing 0.1% acetic acid in water, B-Acetonitrile as mobile phase with gradient mode at a flow rate of 0.3 mL/min. The developed method was validated for specificity, linearity, accuracy and precision in sausages samples. Linearity was over 0.998 with calibration curve of the mixed standards. The mean recoveries from sausages fortified at the level of 2.0~10.0 mg/L were in range of 98.60~109.16% with RSDs lower than 8.93%. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) were in the range between 0.0003~0.085 mg/L and 0.01~0.257 mg/L, respectively. Intra-day precision and inter-day precision were 0.45~6.16% and 2.81~13.33%, respectively. Using presently developed determination method, 33 field sausage samples from Gwangju city in Korea were screened over nine preservatives. As a result, no preservatives were detected in all samples.

Key words : Sorbic acid, Paraben, Preservative, Sausage, LC/ESI-MS/MS

서 론

우리나라에서 가장 많이 사용하는 보존료는 소르빈산(sorbic acid, SA)이다. 보존료 중 SA 및 그 염류는 세균에 대한 정균 작용이 있어 오래 전부터 세계 여러 나라에서 식육가공품을 비롯한 가공품의 부패방지의 목적으로 사용하고, 인체에 대한 위해가 적어 감미성과 유통기한을 늘리고자 하는 경우에 사용된다(식품의약품안전처, 2014a&2014b; Kim과 Lho, 1999).

이들 대부분 보존료는 안전한 첨가범위에서 효과가 적고 처리효과가 있는 농도 수준에서 잔류독성이 문제되고 있으며, 아질산과 병용 시 변이성을 가진 화합물이 생성될 수 있는 것으로 보고되고 있다(Hayatsu 등, 1975).

보존료는 미생물의 증식으로 일어나는 식품의 부패나 변패를 방지하기 위해 사용되는 식품첨가물이다. 현재 우리나라의 식품첨가물공전에서 사용이 허용된 보존료는 SA, 데히드로초산(dehydroacetic acid, DHA), 안식향산(benzoic acid, BA), 파라옥시안식향산 에스테르류(paraben), 프로피온산(propionic acid)이며,

*Corresponding author: Yong-Hwan Kim, Tel. +82-62-613-7640,
Fax. +82-62-613-7649, E-mail. vetkyh@korea.kr

그 사용기준과 검사방법은 식품공전과 축산물의 가공기준 및 성분규격에서 정하고 있다(식품의약품안전처, 2014a&2014c).

우리나라에서 축산물가공품 중 보존료 분석은 high performance liquid chromatograph (HPLC) (Lee 등, 2003)와 gas chromatography (GC) (Lee 등, 2008) 분석법이 보고되었다. 이들 방법 중 Lee 등(2003)의 HPLC 분석법은 축산물의 가공기준 및 성분규격에 등재되었다(식품의약품안전처, 2014c). 최근에는 LC-mass spectrometry (MS)를 이용한 정성 및 정량 분석법 개발이 확대되는 추세이다(Horiyama 등, 2008; Lv 등, 2012; Tsuruda 등, 2013; Ujiie 등, 2007; Zu-xiang 등, 2011). 국내에서는 축산물가공품의 보존료 분석을 위한 LC-MS/MS 분석법에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

우리나라 식품공전에 피로피온산을 제외한 BA 등에 대한 보존료 시험법은 다성분 시험법으로 HPLC와 GC법이 등재되어 있으며, 축산물의 가공기준 및 성분규격에서는 개별 시험법과 다성분 스크리닝 시험법으로 구성되어 있다. 후자의 검사법은 HPLC를 이용한 동시분석법이지만 정성 검사 목적으로만 사용하고 정량법은 개별 시험법으로 이용하여야 한다(식품의약품안전처, 2014a&2014c).

식품공전에서 다성분 시험법 중 HPLC 분석을 위한 시료 전처리방법은 수증기 증류법으로 농축과정 없이 정성 및 정량분석에 사용한다(식품의약품안전처, 2014a). 하지만 축산물의 가공기준 및 성분규격에서 동시분석법의 시료 전처리방법은 에탄올을 이용한 추출법으로 식품공전의 방법보다 단순하고 시간이 절약되는 장점이 있지만, 부적합일 경우에는 개별 분석법 즉, Sep-Pak[®] C₁₈ 카트리지를 이용한 확인검사를 실시해야 하는 등 분석시간이 많이 걸리는 단점이 있다(식품의약품안전처, 2014c). 여기서 문제는 축산물의 가공기준 및 성분규격에는 BA와 파라옥시안식향산에스테류의 개별분석법이 없다는 것이다. 2013년 3월 정부조직법 개정으로 식품안전관리가 식품의약품안전처로 일원화되었으나 동일한 보존료에 대한 상이한 시험법이 존재하여 혼란이 발생할 수 있다.

따라서 이번 연구는 식품공전과 축산물의 가공기준 및 성분규격에 기재되어 있는 시험용액의 조제 방법을 비교하고 LC-MS/MS를 이용하여 9종의 보존료(SA, BA, DHA 및 6종 paraben) 동시분석법을 확립하여 시중 유통 중인 축산물가공품을 대상으로 그 함유 실태를 조사하였다.

재료 및 방법

시료

시료는 2014년 11월에 광주지역에서 유통 중인 소시지 33건을 구매하여 사용하였다. 대상 시료는 4°C에 냉장보관 후 실험 전 분쇄하여 사용하였다.

표준품 및 시약

이번 연구에 사용한 표준물질 BA, SA, DHA, butyl-(BP), ethyl-(EP), methyl-paraben (MP)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, isobutyl-(IBP), isopropyl-(IPP), propyl-paraben (PP)은 Tokyo chemical industry (Tokyo, Japan)에서 구매하였다. Methanol과 acetonitrile 등의 용매는 Merck (Darmstadt, Germany)사 LC급으로 사용하였으며, 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 특급 또는 분석용을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 조제한 3차 증류수를 사용하였다.

표준원액 및 표준용액

표준물질은 BA 등 9가지 보존료를 각각 정밀히 달아 메탄올에 용해하여 표준원액(1.0 mg/mL)을 만들었으며, 실험 전까지 -20°C에 냉동 보관하였다. 각각의 표준용액을 메탄올/증류수(85/15, v/v)로 희석하여 BA와 DHA는 1.0 µg/mL, SA는 8.0 µg/mL, 6종의 paraben은 0.1 µg/mL가 되도록 혼합하여 9종의 보존료 혼합 표준용액을 제조하였다.

시료 전처리

시료 전처리는 축산물의 가공기준 및 성분규격과 식품공전에 따라 에탄올을 이용한 추출법(EtOH screening), Sep-Pak[®] C₁₈ 카트리지를 이용한 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE), 수증기 증류법(distillation method)을 비교하여 실험하였다(식품의약품안전처, 2014a&2014c). 한편, 이번 실험에서 EtOH screening에 의한 추출된 시료에 대한 LC-MS/MS 분석 peak 중 IPP와 PP간 그리고 IBP와 BP간의 peak가 분리되지 않고 합쳐져서 용출되어 에탄올 대신 85% MeOH를 이용한 추출실험(MeOH screening)을 병행하였으며, 시험용액 제조절차는 Fig. 1과 같다. 축산물

의 가공기준 및 성분규격에 따른 EtOH screening과 SPE 시험용액 조제에 각각 1 g과 5 g의 시료를 사용하였다. 식품공전에 기재된 HPLC 분석을 위한 수증기 증류법에는 시료 50 g을 사용하였다.

분석기기 및 분석조건

보존료 분석을 위해 사용한 분석장비는 QTRAP[®] 4500 (AB Sciex, MA, USA) 질량분석기와 Agilent Technologies 1290 infinity LC system (Agilent, Böblingen, Germany)를 사용하였다. 칼럼은 Xselect[™] CSH[™] phenyl-hexyl (2.5 mm, 2.1×150 mm, Waters Ltd., Watford, USA)을 사용하였으며, 그외 이동상의 농도 구배 조건 등과 질량분석기기의 조건은 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

분석법의 검증

9종 보존료에 대한 동시분석법을 식품의약품안전처(2013) 가이드라인에 따라 직선성, 정확성, 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ) 및 회수율을 측정하여 유효성을 검증하였다. 직선성은 혼합 표준용액 농도 BA와 DHA 0.031~

1.0 mg/L, SA 0.25~8.0 mg/L 및 6종 paraben 0.003~0.1 mg/L 범위 내에서 6 단계 농도로 희석한 후 LS-MS/MS에 주입하여 얻어진 피크면적으로 검량선(calibration curve)을 작성하여 구하였다. 정확성과 정밀성은 보존료가 전혀 검출되지 않은 시료에 2 mg/L, 5 mg/L 및 10 mg/L 농도로 표준용액을 첨가한 후 4 가지 시료 전처리 방법에 따라 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)를 측정하였다. LOD는 신호대 잡음비(signal to noise, S/N) 3.3배 이상인 농도로 계산하였으며, LOQ는 S/N비가 10배 이상인 농도로 계산하였다. LOD와 LOQ는 혼합 표준용액을 단계적으로 희석하여 6회 반복 분석하여 얻은 검량선의 기울기와 y-절편의 표준편차를 이용하여 축산물 유해물질 분석법 편람(식품의약품안전평가원, 2014)에 따라 값을 구하였다. 회수율과 매질효과는 Matuszewski 등(2003)의 방정식에 따라 측정하였다.

Table 1. Condition of LC for the analysis of preservatives

Description	Condition		
Column	Xselect [™] CSH [™] phenyl-hexyl (2.5 μm, 2.1×150 mm)		
Column temperature	40°C		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	0.3 mL/min		
Mobile phase	A: 20 mM ammonium acetate containing 0.1% acetic acid in water B: Acetonitrile		
Gradient	Time	A (%)	B (%)
	0	85	15
	5.5	65	35
	13.5	65	35
	14.0	20	80
	16.0	20	80
	16.1	85	15
	18.0	85	15

Table 2. Main operating parameters of the LC-MS/MS

Parameters	Value
Ion source	Turbo spray
Ion polarity	ESI negative
Curtain gas	12.0
Collision gas	Medium
Ionspray voltage	-4,500 V
Temperature	500°C
Ion source gas 1	35.0
Ion source gas 2	40.0
Entrance potential	-10

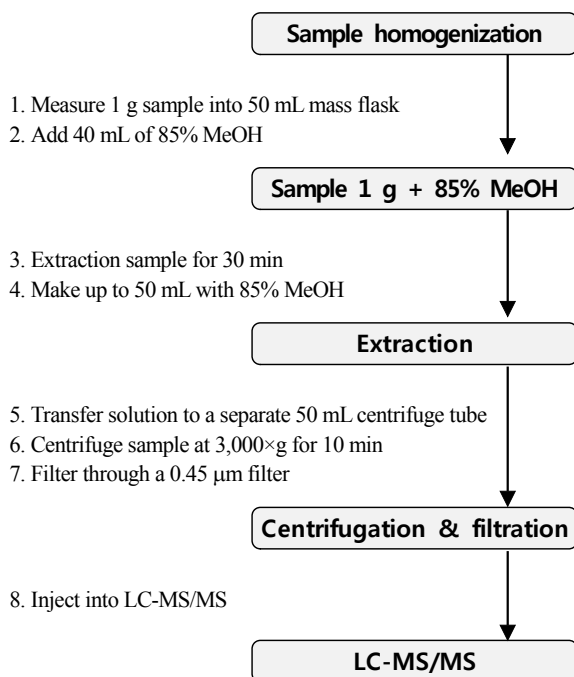


Fig. 1. A schematic overview of 85% methanol screening method.

Table 3. MRM transitions and analyte-related mass spectrometry parameters

Analyte	RT (min)	Ion transition (m/z)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)	Ion ratio (%RSD) [†]
Benzoic acid	4.00	120.9 > 76.9*	-25	-18	-13	2.5 (18.0)
		120.9 > 92.8	-25	-16	-15	
Sorbic acid	4.34	111.0 > 66.9	-40	-12	-7	806.1 (14.7)
		111.0 > 83.0	-40	-12	-7	
Dehydroacetic acid	5.43	166.8 > 82.9	-20	-18	-21	35.3 (3.1)
		166.8 > 122.9	-20	-14	-17	
Methyl paraben	5.45	150.8 > 91.8	-70	-28	-7	70.8 (2.3)
		150.8 > 135.8	-70	-18	-9	
Ethyl paraben	7.04	164.8 > 91.8	-60	-28	-17	81.3 (1.6)
		164.8 > 136.9	-60	-16	-5	
Isopropyl paraben	8.73	178.9 > 92.9	-88	-18	-11	35.8 (2.4)
		178.9 > 136.9	-88	-30	-20	
Propyl paraben	9.11	178.9 > 91.9	-80	-28	-7	52.3 (2.5)
		178.9 > 135.8	-80	-22	-9	
Isobutyl paraben	12.09	192.9 > 91.9	-65	-32	-15	60.2 (1.4)
		192.9 > 135.8	-65	-22	-20	
Butyl paraben	12.54	192.9 > 91.9	-68	-30	-9	56.1 (1.7)
		192.9 > 135.9	-68	-22	-11	

*Transition in bold : MRM used for quantification. [†]Qualifier/quantifier transition ratios. Average ion ratio%±relative standard deviation%, base on n=18 for each analyte.

결과 및 고찰

LC-MS/MS 분석조건 검토

축산식품에서 보존료 분석 조건을 검토하기 위해 표준용액(1.0 mg/L)을 개별적으로 질량분석기에 직접 주입하여 electrospray ionization (ESI) positive와 negative mode에서 이온화 조건을 비교하였다. BA 등 9종의 보존료는 negative mode에서 좋은 감도를 나타내었으며, 다른 연구결과와 일치하였다(Horiyama 등, 2008; Lv 등, 2012; Tsuruda 등, 2013; Zu-xiang 등, 2011; Ujiie 등, 2007). 각 보존료는 전체주사 방식(full scan mode)에서 질량 스펙트럼을 확인한 다음 선구 이온(precursor ion)을 선택하여 multiple reaction monitoring (MRM) 방식으로 정량 분석하기 위한 생성 이온(product ion) 선정과 collision energy (CE) 등을 검토한 결과는 Table 3과 같았다. 감도가 좋은 생성 이온을 정량이온으로 분석하였으며, 나머지 이온은 정성이온으로 활용하였다.

Tsuruda 등(2013)과 Ujiie 등(2007)은 BA (121→77)와 SA (111→67)에서 이온을 하나 밖에 얻을 수 없기 때문에 정량 이온만 활용하였다. Zu-xiang 등(2011)은 SA 정량이온으로 111→80.2를 이용하였는데, 이번 연구에서는 111.0→83.0을 정량이온으로 111.0→66.9을

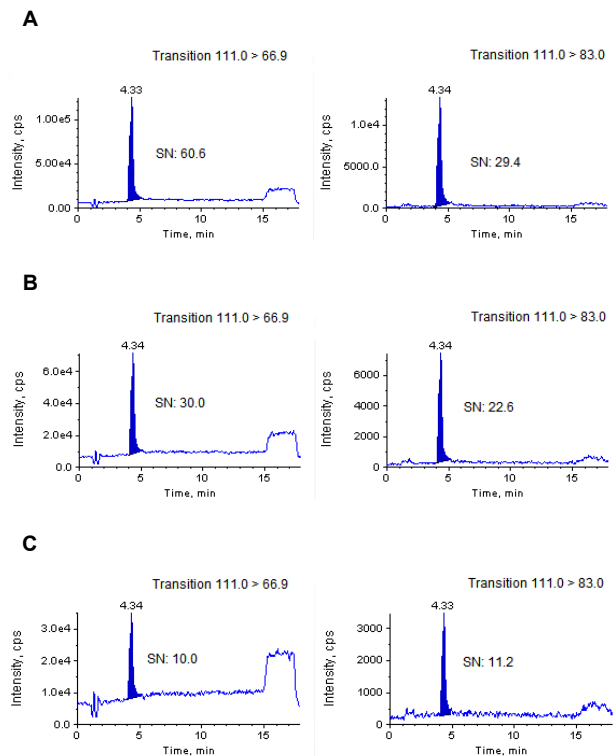


Fig. 2. Selected ion chromatograms of sorbic acid spiked in a blank sausage sample at 10 mg/L (A), 5 mg/L (B) and 2 mg/L (C).

정성이온으로 활용하였으며, 111.0→80.8은 감도가 좋지 않았다. SA의 정성이온(111.0→66.9)은 고농도에서는 S/N비가 정성이온(111.0→83.0)의 것보다 우수하지만, 저농도에서는 Fig. 2에서처럼 S/N비가 저하되는 것이 관찰되었다.

이동상을 결정하기 위하여 메탄올과 아세트니트릴을 비교한 결과 차이는 없지만, 칼럼의 길이에 따라 선택하는 용매가 달라졌다. 칼럼의 길이가 50 mm 이하인 칼럼을 사용할 경우에 Lv 등(2012)은 메탄올을 선택하여 peak의 분리시간을 충분히 확보하였다. 길이가 50 mm 이하의 칼럼에서 아세트니트릴을 사용하면 이성질체 간의 머무름 시간 짧아져서 peak 분리가 현저히 저하된다. Zu-xiang 등(2011)은 BA와 SA만 분석하기 위해 길이 50 mm 칼럼에 아세트니트릴을 사용하였다. 100 mm 이상 길이의 칼럼을 사용할 경우에는 아세트니트릴을 사용하는 것이 좋다. 아세트니트릴을 사용하면 paraben의 머무름 시간을 단축할 수 있어 분석시간 절약에 도움이 된다.

강산성 물질인 보존료를 분석하는데 사용하는 용리액의 수소이온 농도는 pH 4.0~5.0을 유지하는 것이 중요하다(Ujii 등, 2007). 이번 실험에서 용리액의 pH를 조절하기 위해서 acetic acid와 formic acid를 비교하였다. Formic acid를 사용한 경우에는 DHA에서만 감도 저하와 피크 깨짐 현상이 발생하였고, 그 이외의 보존료에서는 acetic acid와 formic acid에 상관없었다. Tsuruda 등(2013)은 SA 분석에서 formic acid 보다는 acetic acid를 사용하면 감도가 더 높다고 보고하였다. 따라서 이번 실험에서는 용리액의 pH 조절을 위해서 acetic acid를 사용하였다.

ESI negative mode에서 주로 사용하는 용매로 ammonium acetate와 ammonium formate에 대해서도 검토하였다. Noise 제거, 머무름, 분리도 및 감도를 고려하여 ammonium acetate를 선택하였으며, 순차적으로 ammonium acetate 농도를 변화시키면서 적정농도를 확인한 결과 20 mM이 가장 적합하였다. Lv 등(2012)이 20 mM ammonium acetate-0.1% acetic acid가 함유된 용매를 사용하여 10종의 paraben 분석을 하였으며, 이번 연구에서도 이와 유사한 조건의 이동상을 실험에 사용하였다. Tsuruda 등(2013)은 10 mM acetic acid-ammonium acetate 용매를 이용하여 12종의 인공감미료와 9종의 paraben을 분석하였다. Ujii 등(2007)은 0.01% formic acid-2 mM ammonium acetate 용매를 이용하여 BA, SA 및 7종의 paraben과 인공감미료인 saccharin을 분석하였다.

보존료의 분리능과 감도 등을 검사하기 위해서 C₁₈ 칼럼과 CSHTM phenyl-hexyl 칼럼을 비교하였다. 이번 실험에 길이가 100 mm인 C₁₈ 칼럼에서 paraben류 이성질체 간의 peak 분리능이 좋지 않아서 길이가 150 mm인 CSHTM phenyl-hexyl 칼럼을 선택하였다. 하지만 이 칼럼을 이용한 DHA 분석 peak에서 꼬리꼬림(tailing) 현상이 크게 나타났다. 이 현상은 Tsuruda 등(2013)도 보고하였으며, SA의 분리능이 좋아서 이 칼럼을 선택하였다. 이번 연구에서 보존료 9종 혼합 표준용액을 85% MeOH로 희석하여 분석한 크로마토그램은 Fig. 3과 같았다.

시료 전처리 비교

보존료 9종 동시다성분 분석법을 확립하기 위해서 시료 전처리 방법과 보존료 음성 시료에 2.0, 5.0 및 10.0 mg/L의 농도로 첨가하여 회수율을 비교하였다. 수증기 증류법을 이용하여 증류액 500 mL을 취한 다음, 이를 여과하여 LC-MS/MS로 평균회수율을 분석하였다. 이중 10.0 mg/L의 농도로 첨가한 BA, SA 및 DHA의 회수율은 각각 88.25%, 94.46% 및 99.59%로 양호하였으며, RSD%는 각각 8.68, 8.43 및 6.56로 조사되었다. 그리고 10.0 mg/L의 농도로 첨가한 MP, EP, IPP, PP, IBP 및 BP의 회수율은 29.45%, 52.20%, 73.68%, 65.18%, 76.42% 및 73.61%로 조사되어 앞선 3종류 보존료의 회수율보다 낮았다(Fig. 4A). 9종 보존료의 평균회수율은 다음과 같았다. BA 67.88~88.25%, SA 82.78~94.46%, DHA 89.99~99.59%, MP 14.83~29.45%, EP 27.11~52.2%, IPP 41.49~65.18%, PP 41.49~65.18%, IBP 55.85~76.42% 및 BP 46.95~73.61%로 조사되었다(Fig. 4A).

SPE 전처리 방법에 의한 평균회수율은 다음과 같았다. BA 84.23~104.73%, SA 98.17~106.73%, DHA 76.94~100.66%, MP 60.43~78.94%, EP 48.29~75.29%, IPP 34.10~60.65%, PP 30.03~60.99%, IBP 17.14~48.53% 및 BP 15.74~44.77%로 조사되었다(Fig. 4B). 10.0 mg/L의 농도로 첨가한 BA, SA 및 DHA의 회수율은 각각 97.14%, 106.73% 및 98.91%로 양호하였으며, RSD%는 각각 12.07, 7.97 및 9.79로 조사되었다. 그리고 10.0 mg/L의 농도로 첨가한 MP, EP, IPP, PP, IBP 및 BP의 회수율은 78.94%, 75.29%, 60.65%, 60.99%, 48.53% 및 44.77%로 조사되었다(Fig. 4B). 따라서 우리나라에서 paraben에 대한 축산물의 가공기준 및 성분규격은 불검출로 규정하고 있어 회

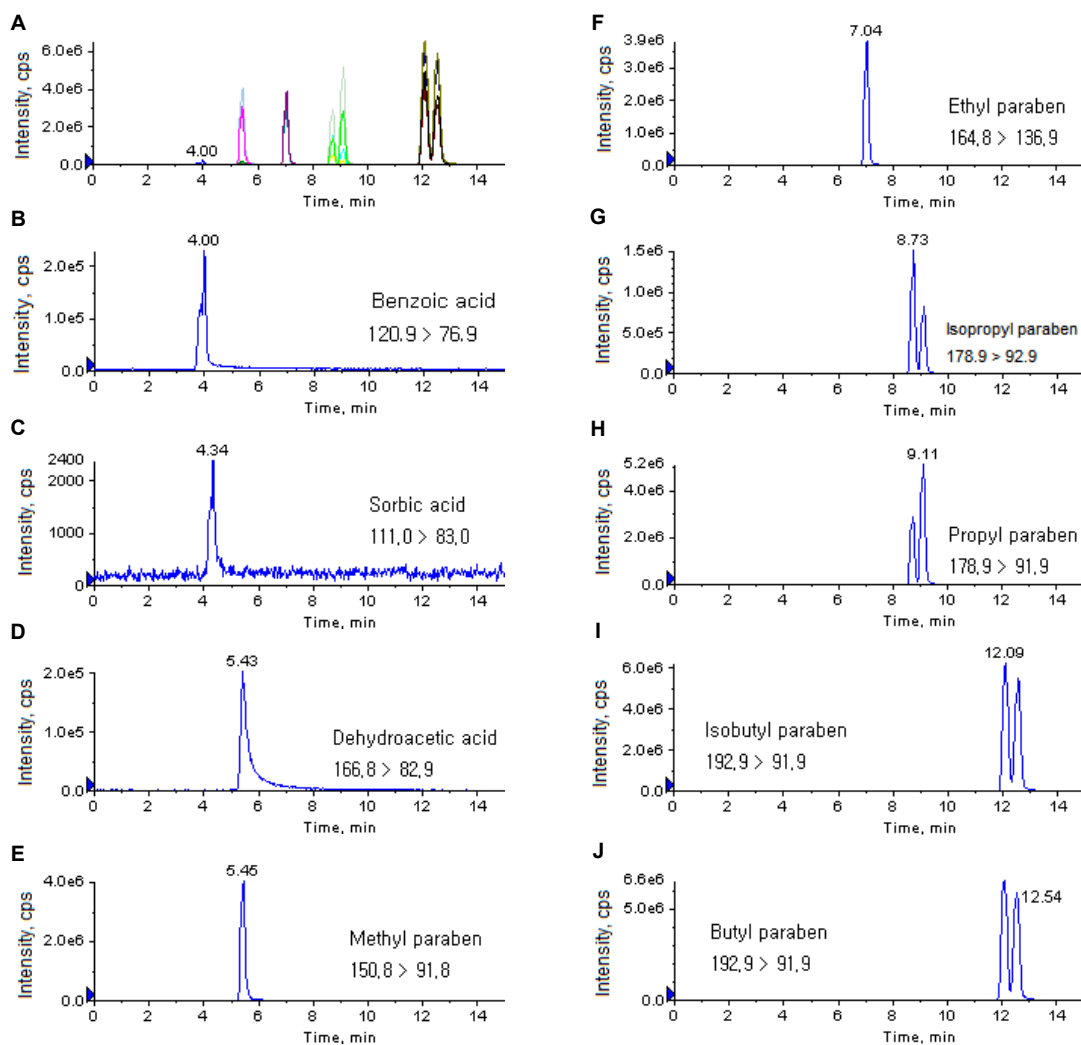


Fig. 3. Chromatogram of preservatives by LC-MS/MS. Total ion chromatogram of nine preservatives (A), benzoic acid (B), sorbic acid (C), dehydroacetic acid (D), methyl paraben (E), ethyl paraben (F), isopropyl paraben (G), propyl paraben (H), isobutyl paraben (I), butyl paraben (J) obtained by injecting a standard mix solution at 1.25 mg/L concentration level.

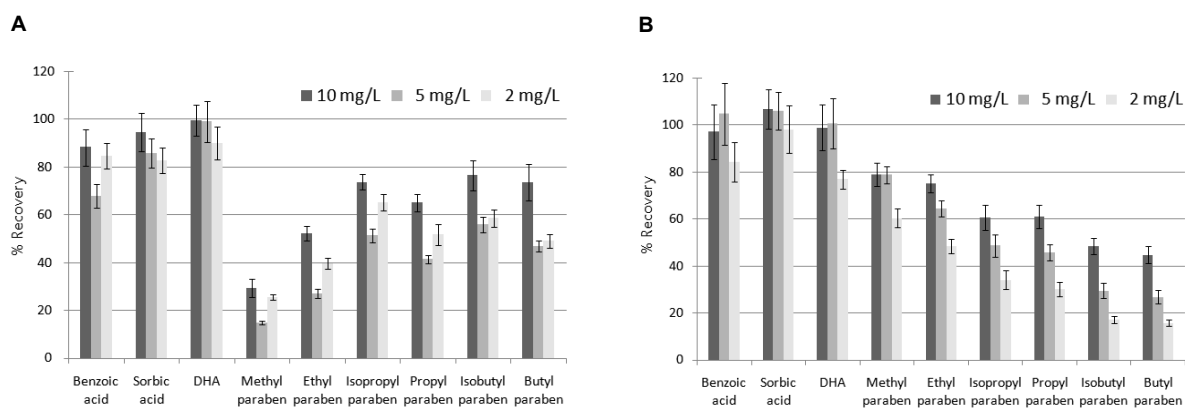


Fig. 4. Recovery data and % matrix effects data for nine preservatives obtained using extraction procedure with distillation method (A) and SPE method (B) ($n=6$). Mean % recovery for preservatives spiked in sausage at 10 mg/L, 5 mg/L and 2 mg/L concentrations. The error bars are standard deviations.

수율을 고려하여 시료 전처리 방법을 개선해야 할 것으로 생각한다.

이번 연구에서 수증기 증류법과 SPE 전처리 방법에 대한 실험한 결과 BA, SA 그리고 DHA가 비교적 좋은 회수율로 조사되었으며, 6종 paraben은 회수율이 좋지 않았다. 수증기 증류법에 의한 시료 전처리에서 MP의 회수율은 첨가농도 2 mg/L의 시료에서 14.83%로 이번 연구에서 가장 낮은 회수율로 조사되었다. 수증기 증류법에서 가장 좋은 회수율은 89.99~99.59%로 조사된 DHA이었고, SPE 전처리 방법에서 가장 좋은 회수율은 98.17~106.73%로 조사된 SA이었다. Tsuruda 등(2013)이 소시지에 대해서 이번 실험과 동일한 보존료를 20 mg/kg 첨가하여 Oasis-WAX 카트리지를 이용한 시료 전처리 방법에 의한 회수율은 BA 82.8%, SA 102.8%, DHA 94.7% 그리고 6종의 paraben 87.0~100.3%로 보고하였다. 이번 실험에서 Sep-Pak[®] C₁₈ 카트리지를 이용한 paraben의 회수율 15.74~78.94%보다 Tsuruda 등(2013)이 보고한 Oasis-WAX 카트리지를 이용한 회수율이 좋은 결과를 보였다. 이것은 분석대상이 산성물질이기 때문에

역상-약한 음이온 교환 혼합 방식 칼럼인 Oasis-WAX를 이용한 정제조건이 Sep-Pak[®] C₁₈ 카트리지보다 paraben 분석에 더 효율적일 것으로 생각한다.

한편, 축산물의 가공기준 및 성분규격에 기재된 EtOH screening을 이용한 시료 전처리 방법에서 IPP와 PP 그리고 IBP와 BP간의 피크가 분리되지 않아 회수율 조사에서 제외하고 나머지 5종 보존료에 대해서만 회수율을 조사하였다(Fig. 5). BA의 평균회수율 108.33~110.28%, 매질효과 1.87~5.48%, SA의 평균회수율 105.41~120.42%, 매질효과 1.17~6.50%, DHA의 평균회수율 108.02~114.27%, 매질효과 1.13~10.61%, MP의 평균회수율 108.61~114.03%, 매질효과 2.47~8.78%, EP의 평균회수율 103.61~110.88%, 매질효과 1.82~10.77%이었다.

에탄올 대신 85% MeOH을 이용한 시료 전처리 방법에서는 에탄올을 이용했을 때 나타났던 이성질체간의 피크 broadening과 겹침 현상이 나타나지 않았다. 따라서 9종의 보존료에 대한 평균회수율은 98.60~109.16%, 상대표준편차는 0.80~8.93% 그리고 매질효과는 -5.64~10.26%로 조사되었으며, 다른 시료 전

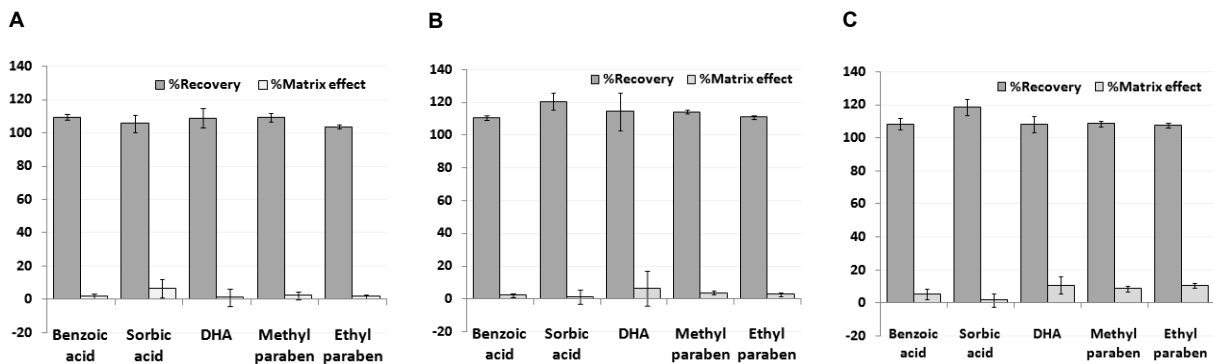


Fig. 5. Mean recovery and matrix effects obtained using ethanol extraction (n=6). Mean % recovery and matrix effects for preservatives spiked in sausage at 10 mg/L (A), 5 mg/L (B) and 2 mg/L (C) concentrations. The error bars are standard deviations.

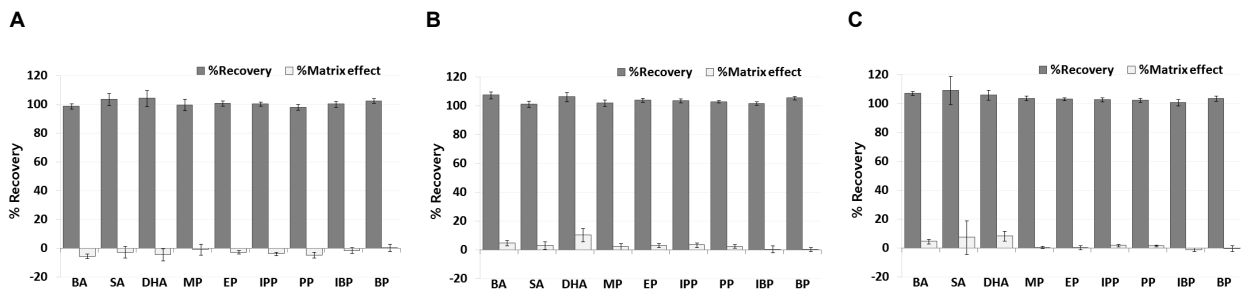


Fig. 6. Mean recovery and matrix effects obtained using ethanol extraction (n=6). Mean % recovery and matrix effects for preservatives spiked in sausage at 10 mg/L (A), 5 mg/L (B) and 2 mg/L (C) concentrations. The error bars are standard deviations. BA: benzoic acid, SA: sorbic acid, DHA: dehydroacetic acid, MP: methyl paraben, EP: ethyl paraben, IPP: isopropyl paraben, PP: propyl paraben, IBP: isobutyl paraben, BP: butyl paraben.

처리 방법보다 가장 우수한 회수율을 보였다(Fig. 6). Lv 등(2012)은 이번 연구와 동일한 85% MeOH를 이용한 시료 전처리에 의한 6종 paraben의 회수율은 89.41~99.3% 범위로 이번 실험결과와 유사한 결과를 보고하였다. 시료 전처리를 위한 초음파 처리시간은 20분 정도가 적절하다고 보고하였으며, 이번 실험에서는 관련 규정에 따라 30분 동안 시료를 전처리하였다. Zu-xiang 등(2011)은 BA와 SA의 회수율은 84~98%와 82~96%로 보고하였다.

유효성 검증

보존료 9종의 표준용액을 LC-MS/MS로 분석하여 검량선을 작성한 결과 Table 4와 같이 각 검량선의 결정계수(r^2)는 0.998 이상으로 좋은 직선성을 나타내었다. LOD와 LOQ는 BA 0.008 mg/L, 0.025 mg/L, SA 0.085 mg/L, 0.257 mg/L, DHA 0.009 mg/L, 0.026 mg/L로 나타났으며, 그 외 6종의 paraben류의 LOD와 LOQ

는 Table 4와 같았다. Zu-xiang 등(2011)은 BA와 SA의 LOD는 모두 0.1 mg/kg, LOQ는 각각 0.4 mg/kg과 0.5 mg/kg으로 보고하였다. Tsuruda 등(2013)이 조사한 보

Table 4. Linearity, LOD and LOQ of nine preservatives

Analyte	Slope	Intercept	r^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
BA	2,289,875	5,760	0.9998	0.008	0.025
SA	24,347	626	0.9986	0.085	0.257
DHA	2,437,968	6,361	0.9996	0.009	0.026
MP	53,803,690	5,533	0.9999	0.0003	0.001
EP	46,535,00	4,347	1.0000	0.0003	0.001
IPP	12,674,782	1,271	0.9998	0.0003	0.001
PP	57,482,985	5,867	0.9999	0.0003	0.001
IBP	89,284,852	7,496	1.0000	0.0003	0.001
BP	92,437,621	14,700	0.9999	0.001	0.002

The calibration curves were constructed with a six-point concentration range of 0.031~1.0 mg/L for BA & DHA, 0.25~8.0 mg/L for SA and 0.003~0.1 mg/L for 6 paraben. Obtained from repeated injections ($n=6$) of the standard solutions.

Table 5. Accuracy and precision of quality control samples

Analyte	Concentration (mg/L)	Intra-day ($n=6$)			Inter-day ($n=3$)		
		Mean (mg/L)	Recovery (%)	RSD (%)	Mean (mg/L)	Recovery (%)	RSD (%)
Benzoic acid	10	9.44	94.35	1.91	9.50	94.95	7.39
	5	5.23	104.67	1.55	5.32	105.98	4.89
	2	2.09	104.55	1.33	2.07	103.40	2.81
Sorbic acid	10	9.71	97.08	4.65	9.78	97.79	4.05
	5	5.16	103.18	2.24	5.20	103.32	3.45
	2	2.13	105.58	6.16	2.16	108.19	8.73
Dehydroacetic acid	10	9.54	95.41	5.27	9.63	96.28	6.13
	5	5.51	109.94	1.47	4.84	97.63	5.18
	2	2.16	108.13	3.06	2.02	100.85	3.96
Methyl paraben	10	9.89	98.93	4.47	10.58	105.80	11.74
	5	5.11	102.09	0.89	4.90	101.97	8.34
	2	2.01	100.36	0.59	1.95	97.71	7.41
Ethyl paraben	10	9.72	97.23	1.34	10.52	105.28	7.61
	5	5.14	102.89	1.23	4.94	102.10	7.99
	2	2.00	100.18	0.92	2.02	100.89	5.59
Isopropyl paraben	10	9.61	96.07	1.64	10.67	106.66	13.33
	5	5.16	103.27	1.46	4.98	104.33	11.09
	2	2.03	101.68	1.03	1.95	97.39	7.45
Propyl paraben	10	9.51	95.09	2.17	10.57	105.71	7.28
	5	5.12	102.40	0.45	4.88	102.55	10.74
	2	2.03	101.42	0.74	1.91	95.64	6.02
Isobutyl paraben	10	9.83	98.32	1.46	10.40	104.00	4.31
	5	5.02	100.36	0.91	5.03	103.97	6.49
	2	1.98	98.78	1.41	2.03	101.60	5.61
Butyl paraben	10	10.01	100.11	1.78	10.46	104.56	4.71
	5	5.02	100.36	1.37	5.24	106.60	7.13
	2	1.99	99.69	1.83	1.99	99.57	5.43

존료의 LOQ는 BA 5 mg/kg, SA와 DHA 20 mg/kg 그리고 6종의 paraben 1 mg/kg으로 보고하였다. Lv 등(2012)이 보고한 6종 paraben의 LOD와 LOQ는 각각 0.01~0.08 mg/kg과 0.03~0.20 mg/kg이었다. 이번 연구에서 6종 paraben의 LOD와 LOQ는 각각 0.0003~0.001 mg/L와 0.001~0.002 mg/L로 Lv 등(2012)의 결과보다 우수하였다.

정확도 및 정밀도는 보존료가 함유되어 있지 않은 시료에 표준물질을 첨가하여 각 표준물질의 농도가 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L이 되도록 한 시료를 85% MeOH를 이용한 시료 전처리 방법을 이용하여 실험하였다. 동일한 날에 6회 반복 분석하여 일내 정밀도 (intra-day precision) 및 회수율을 확인하였고 3일간 반복 분석하여 일간 정밀도 (inter-day precision) 및 회수율을 확인하였다(Table 5). 회수율은 BA 94.35~105.98%, SA 97.08~108.19%, DHA 95.41~109.94%, MP 97.71~105.80%, EP 97.23~105.28%, IPP 96.07~106.66%, PP 95.09~105.71%, IBP 98.32~104.00%, BP 99.57~104.56%이었으며, 9종 보존료에 대한 일내 상대표준편차(RSD%)가 6.16이하, 일간 상대표준편차는 13.33% 이하의 결과를 확인하였다. Lv 등(2012)은 6종 paraben에 대한 일내 정밀도와 일간 정밀도에 대한 상대표준편차가 각각 1.04~2.13%와 1.03~3.16%로 보고하였으며, 이번 연구에서는 0.45~4.47%와 4.31~13.33%으로 조사되었다. 한편, 확립된 분석법을 소시지에 대한 보존료의 동시 분석에 적합하다고 판단되어 광주지역에서 유통 중인 소시지 33건을 대상으로 조사한 결과 모두 불검출로 확인되었다.

결론

이번 연구는 식품산업에서 큰 비중을 차지하고 있는 소시지에 대한 보존료의 신속한 검사를 위한 동시 분석법을 확립하였다. 85% MeOH screening 방법을 이용한 간편하고 효율적인 시료 전처리 후 LC-MS/MS를 이용하여 9종의 보존료 동시분석 조건을 검토하였다. 칼럼은 phenyl-hexyl (2.5 µm, 2.1×150 mm, Waters), 이동상은 20 mM ammonium acetate (0.1% acetic acid)과 아세트니트릴을 사용하여 농도구배 조건으로 각 성분을 분리하였으며 ESI negative/MRM 방식으로 정량 분석하였다. 9종의 보존료의 직선성은 0.998 이상이었다. 보존료를 2.0~10.0 mg/L의 수준으로 첨가한 소시지로부터 평균 회수율은 98.60~109.16% 범위이었으

며, 상대표준편차는 8.93%이하로 조사되었다. LOD와 LOQ는 각각 0.0003~0.085 mg/L와 0.01~0.257 mg/L 범위이었다. BA, SA 그리고 DHA의 정량한계는 각각 0.025, 0.257 및 0.026 mg/L이었으며, BP와 그 이외 다른 paraben은 각각 0.002 mg/L와 0.001 mg/L이었다. 일내 정밀도와 일간 정밀도에 대한 정밀도는 각각 0.45~6.16%와 2.81~13.33%이었다. 한편, 광주지역에서 유통 중인 소시지 33건을 대상으로 조사한 결과 보존료는 모든 시료에서 검출되지 않았다.

감사의 글

이번 연구는 광주광역시보건환경연구원의 2014년도 연구사업 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- 식품의약품안전처. 2013. 생체시료 분석법 밸리데이션 가이드 라인.
- 식품의약품안전처. 2014a. 식품공전. 식품의약품안전처고시 제2014-174호.
- 식품의약품안전처. 2014b. 식품첨가물의 기준 및 규격. 식품의약품안전처고시 제2014-176호.
- 식품의약품안전처. 2014c. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 식품의약품안전처고시 제2014-186호.
- 식품의약품안전평가원. 2014. 축수산물 유해물질 분석법 편람. pp. 71-77.
- Hayatsu H, Chung KC, Kada T, Nakajima T. 1975. Generation of mutagenic compound(s) by a reaction between sorbic acid and nitrite. *Mutat Res* 30: 417-419.
- Horiyama S, Honda C, Suwa K, Umamoto Y, Okada Y, Semma M, Ichikawa A, Takayama M. 2008. Sensitive and simple analysis of sorbic acid using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 56: 578-581.
- Kim SK, Lho DS. 1999. Simultaneous determination of preservatives in food by GC/MS. *J Fd Hyg Safety* 14: 140-145.
- Lee DS, Park SW, Lee YH, Byun SK, Cho MR, Shin MS, Lee SJ, Cho NI, Jung SC. 2003. Simultaneous determination method of preservatives in livestock products. *J Prev Vet Med* 27: 183-189.
- Lee MS, Cho MR, Kim YW, Sung IK, Noh JH, Yi JS, Yune SY, Moon HJ, Park JW, Choi HJ, Song SO. 2008. Simultaneous determination of preservatives in livestock products by gas chromatograph. *J Prev Vet Med* 32: 225-235.
- Lv J, Wang L, Hu X, Tai Z, Yang, Y. 2012. Rapid determination of 10 parabens in spices by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Letters* 45: 1960-1970.

- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75: 3019-3030.
- Tsuruda S, Sakamoto T, Akaki K. 2013. Simultaneous determination of twelve sweeteners and nine preservatives in foods by solid-phase extraction and LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 54: 204-212.
- Ujjiie A, Hasebe H, Chiba Y, Yanagita N. 2007. Simultaneous de-termination of 7 kinds of preservatives and saccharin in foods with HPLC, and identification with LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 48: 163-169.
- Zu-xiang W, Lian-bing R, Jun J, Hong-bin Z, Ping L, Ping L, Rong W. 2011. Determination of benzoic acid and sorbic acid in seasoning by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Instrumental Analysis* 30: 665-669.