J. Fd Hyg. Safety 14(2), 140-145 (1999)

Gas Chromatography/Mass Spectrometry를 이용한 식품보존료의 동시분석방법 연구

김승기† · 노동석
한국과학기술연구원 생체대사연구센터

Simultaneous Determination of Preservatives in Food by GC/MS

Seungki Kim† and Dong-Seok Lho
Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science & Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

ABSTRACT – Analytical method for preservatives in food was developed using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Propionic acid, sorbic acid, benzoic acid, ethyl salicylate, ethyl *p*-hydroxy benzoate, *iso*-propyl *p*-hydroxy benzoate, *n*-propyl *p*-hydroxy benzoate, *iso*-butyl *p*-hydroxy benzoate, *n*-butyl *p*-hydroxy benzoate, *p*-hydroxy benzoic acid and dehydro acetic acid were extracted from cooling beverage with diethyl ether. The polar hydroxyl and carboxyl groups of food preservatives were derivatized with N-methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) to form the corresponding tert-butyldimethyl-silylated derivatives, and submitted to GC/MS analysis. The mass spectra of the derivatives were investigated for the selection of monitoring ions for multi-residue analysis of 11 preservatives by GC/MS. The macro program was also developed for the qualitative analysis of these preservatives in food.

Key words □ Preservatives, Analysis, Food, GC/MS

식품의 제조과정 및 유통과정에서 식품 중 유해미생물의 번식을 억제하고 변질, 부패를 방지하며 식품의 영양가와 신선도를 보존하기 위하여 보존료를 일정량 첨가한다.[1-3] 이들 식품보존료에는 천연물에서 추출한 천연성분과 화학적 합성품이 있는데, 이들은 모두 유독 또는 유해하지 않아야 한다.[4]

따라서 우리 나라에서는 식품공전과 식품첨가물공전에서 각 식품들에 대한 식품보존료의 사용기준을 설정해 놓고 있다. 또한 최근과 같은 수입식품들이 급증하는 상황 속에서 정확한 위해도 평가는 자국의 국민보건을 위해서 꼭 필요한 일이며, 이를 위해서는 신속하면서도 정확한 분석방법이 확립되어야 할 것이다.

식품은 그 자체의 구성성분이 대단히 복잡하고 다양하며, 특히 방해물질도 많이 존재할 뿐 아니라 보존료의 잔류량도 미량이기 때문에 분석에 어려움이 따른다. 지금까지 보고된 식품보존료의 기기분석방법을 살펴보면, 보존료의 극성에 대한 특성상 high performance liquid chromatograph (HPLC)를 이용한 방법들이 많이 연구되어 왔다.[5-9] 그러나 이 HPLC에 의한 분석방법은 가장 간편한 전처리 과정을 통해 분석할 수 있다는 장점이 있으나, 식품 내에 존재하는 방해물질에 의해 가양성(false positive)으로 판정되기 쉬우며 LC column의 효율이 너무 빨리 저하된다는 단점이 있다. 한편, 보다 신속한 분석을 위하여 flame ionization detector(FID)와 electron capture detector(ECD) 등을 장착한 gas chromatograph(GC)를 이용한 방법들이 광범위하게 연구되어 왔다.[10-12] 그러나 이 방법 또한 여러 가지 식품보존료들을 동시에 분석할 때 정확한 판별이 어렵다는 단점을 가지고 있으며, 이 또한 가양성(false positive)으로 판정될 가능성을 내포하고 있다. 그 후 mass spectrometer(MS)의 급속한 범용화로 인하여 high performance liquid chromatograph(HPLC) 또는 gas chromatograph(GC)를 mass spectrometer(MS)와 서로 연결하여 사용하는 분석방법이 이용되어 왔다.[13] 이러한 GC/MS를 이용한 분석방법은 chromatography를 이용한 분리방식과 mass spectrometer를 이용한 확인방식을 통해 보다 효율적인 정성분석 결과를 제공한다는 장점이 있다. 그러나 기존의 분석 방법은 한, 두

†Author to whom correspondence should be addressed.

가지 화합물의 분석에 국한되어 왔으며, 여러 가지의 식품보존료를 동시에 분석하지 못한 것이 사실이다.

그러므로 본 연구에서는 청량음료로부터 디에틸 에테르(diethyl ether)를 사용하여 액체-액체 추출법으로 추출한 후, 역추출(back extraction)에 의한 방해물질의 효과적인 제거를 통해 보다 효율적으로 정제한 다음, 극성이 큰 hydroxyl기와 carboxyl기를 *N*-methyl-*N*-tert-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamide(MTBSTFA)를 사용하여 t-butyldimethylsilyl (TBDMS)로 유도체화 시킨 다음 gas chromatograph/mass spectrometer(GC/MS)를 사용하여 11가지의 식품보존료를 동시 분석하는 방법을 연구, 확립하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 표준용액

표준물질로 사용한 propionic acid, sorbic acid, benzoic acid, ethyl salycylate, ethyl p-hydroxy benzoate, isopropyl p-hydroxy benzoate, n-propyl p-hydroxy benzoate, isobutyl p-hydroxy benzoate, n-butyl p-hydroxy benzoate, *p*-hydroxy benzoic acid, dehydro acetic acid와 내부표준물질로 사용한 tiglic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이 때 사용한 11가지 식품보존료의 각각의 구조식을 Fig. 1에 나타내었다. 그리고 tartaric acid도 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

추출용매인 디에틸 에테르(diethyl ether)와 표준용액의 조제를 위해 사용한 methanol은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

수산화 칼륨(potassium hydroxide)과 무수황산 나트륨(anhydrous sodium sulfate)은 분석용 특급시약(J.T.Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA)을 사용하였으며, 유도체화 시약으로 사용한 N-methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide(MTBSTFA)는 Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

GC/MS의 운반가스는 순도 99.999%의 고순도의 헬륨가스를 사용하였다.

내부표준물질로 사용한 tiglic acid와 표준물질로 사용한 propionic acid, sorbic acid, benzoic acid, ethyl salicylate, ethyl p-hydroxy benzoate, iso-propyl p-hydroxy benzoate, n-propyl p-hydroxy benzoate, iso-butyl p-hydroxy benzoate, n-butyl p-hydroxy benzoate, p-hydroxy benzoic acid, dehydro acetic acid 등 각각의 표준용액은 methanol에 1,000 μg/ml의 농도로 조제한 후, 4°C 냉장고에 보관하였다.

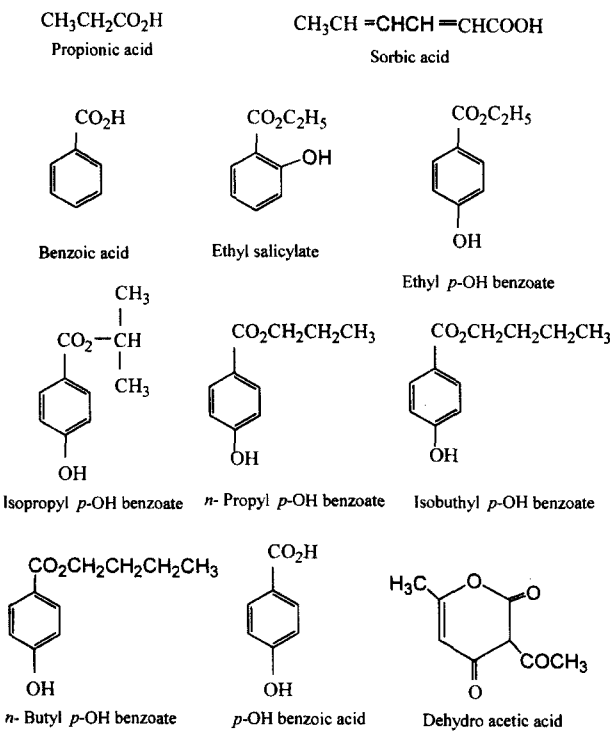


Fig. 1. Chemical structures of preservatives.

분석 기기 및 장비

분석 기기로는 Hewlett-Packard(HP) 5890 Gas Chromatograph(GC)와 capillary direct interface 방식으로 연결된 HP 5970B Mass Selective Detector(MSD)를 사용하였으며, HP 7914 Disc Drive와 HP 59970C MS Chemstation을 사용하였고, 크로마토그램과 질량스펙트럼은 HP 2934A Printer를 사용하여 출력하였다.

분리관은 cross-linked 5% phenylmethylsilicone 으로 내

Table 1. GC/MS operating conditions

- Column : HP-5 (17 m length 0.2 mm I.D., 0.33 μm film thickness)
- Carrier gas(He) : 0.8 ml/min. at 80°C
- Split ratio : 1/10
- Injection port temp. : 280°C
- Transfer line temp. : 300°C
- Oven temp. program :

Initial temp. (°C)	Ini (min)	Rate (°C/min.)	Final temp. (°C)	Final time (min)
80	0	5	100	0
		20	300	1

- Run time : 15 min

부코팅된 유리모세분리관(HP-5)으로 길이 17 m, 내경 0.2 mm, 두께 0.33 μm 규격의 것을 사용하였으며, GC/MS의 작동조건은 Table 1에 표시하였다.

실험장비로는 vacuum rotary evaporator는 Buchi Rotavator(Swit.)를 사용하였고, shaker는 Buchler사(Germany) 제품을, centrifuge는 Heraeus사(Germany)제품을 사용하였다. 그리고 heating block은 Liebisch사(Germany) 제품을 사용하였다.

시료

시료는 국내에서 시판되고 있는 청량음료를 구입한 후, 식품보존료가 들어 있지 않음을 확인한 후에 실험에 사용하였다.

실험방법

추출 과정 – 시료 5 m*l*를 취하여 15-m*l* glass centrifuge tube에 넣은 후, 미리 준비한 11가지의 표준용액(1,000 μg/m*l*)을 각각 100 m*l*씩 가한 후 잘 섞는다. 내부표준물질(tiglic acid, 1,000 μg/m*l*) 100 m*l*를 가한 후, 15% 주석산(tartaric acid) 1 m*l*를 가하여 산성용액(pH 2~3)으로 만든다. 추출용매인 디에틸 에테르 5 m*l*를 넣은 후 무수황산나트륨 3 g을 넣고 20분 동안 shaker로 진탕해 준 다음 3,000 rpm(750 g)으로 5분간 원심분리한 후, 유기용매층을 다른 glass centrifuge tube로 옮긴다. 증류수 5 m*l*를 유기용매층을 옮긴 tube에 넣고, 5 M potassium hydroxide 한 방울을 가한 후 20분 동안 진탕해 주어 clean-up을 위한 역추출(back extraction)을 한다. 원심분리 후 디에틸 에테르층을 제거한 후, 남은 수용액층에 15% tartaric acid 1 m*l*를 넣고 무수황산나트륨 3 g을 넣은 후 20분 동안 진탕하여 재추출한다. 원심분리하여 유기용매층과 수용액층을 분리한 후, 유기용매층을 다른 glass tube에 옮겨 vacuum rotary evaporator를 사용하여 유기용매를 증발시킨다.

유도체화 과정 – 잔사는 KOH/P_2O_5(potassium hydroxide/diphosphorus pentaoxide)가 들어 있는 진공 desiccator에서 30분동안 수분을 완전히 제거한 후, acetonitrile 400 m*l*를 첨가하고 *N*-methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamide (MTBST-FA) 100 m*l*를 넣고 heating block에서 80°C로 20분간 가열하여 유도체화를 시킨 후,[14,15] 이 중 1 m*l*를 취하여 GC/MS의 capillary split용 injector에 주입하여 분석한다.

결과 및 고찰

GC/MS에 의한 질량스펙트럼 분석

식품보존료들은 공통적으로 극성이 큰 hydroxyl기와 carboxyl기를 포함하고 있어, 이들의 구조적인 특성상 GC로 분석할 경우, 비극성 분리관에서 흡착현상으로 인한 피이크의 꼬리끌림현상 때문에 분석상의 문제점을 내포하고 있다. 따라서 화합물의 극성을 감소시키기 위하여 유도체화 과정을 거쳐 GC로 분석하여야 한다.

Hydroxyl기와 carboxyl기의 유도체화 방법으로는 diazomethane을 사용하는 methylation 방법과 *N*-trimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide(MSTFA)를 사용하는 trimethylsilylation 방법이 많이 이용되고 있으나, 전자는 mass fragmentation에 의한 확인과정이 어렵고, 후자는 수분의 노출에 약하다는 단점을 가지고 있다.

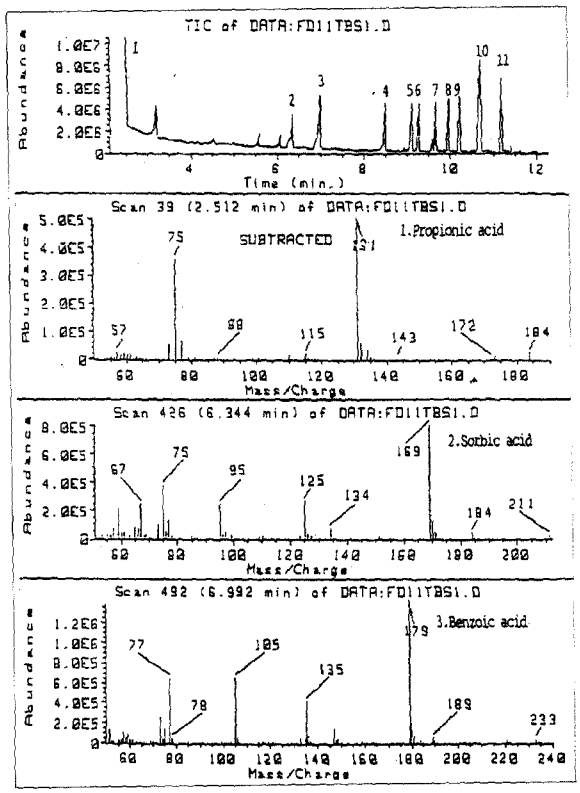
반면에 *N*-methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyl-trifluroacetamide(MTBSTFA)를 사용하여 유도체화시키면, hydroxyl기와 carboxyl기와 반응하여 *tert*-butyldimethylsilyl(TBDMS) 유도체를 생성한다. 이렇게 생성된 TBDMS 유도체는 비교적 낮은 온도에서 반응할 뿐 아니라, 반응이 완료된 후에도 수분이나 실온에 장시간 안정하다는 장점을 가지고 있다. 또한 $[M-57]^+$나 $[M-15]^+$의 특징적인 mass fragmentation을 나타내어 화합물의 확인에 용이함을 제공한다.

따라서 11개의 식품보존료들을 TBDMS유도체화시킨 후 electron impact ionization 방식의 GC/MS system을 이용하여 얻은 total ion chromatogram(TIC)과 각 피이크에 대한 질량스펙트럼을 얻었고, 이것을 Fig. 2에 나타내었다.

TBDMS 유도체들의 질량스펙트럼을 살펴보면, 대부분의 유도체들은 분자량이온 $[M]^+$, 즉 ethyl p-hydroxy benzoate는 m/z 280, iso-propyl *p*-hydroxy benzoate와 *n*-propyl *p*-hydroxy benzoate는 m/z 294, *iso*-butyl *p*-hydroxy benzoate와 *n*-butyl *p*-hydroxy benzoate는 m/z 308을 나타내고, dehydro acetic acid는 methyl기가 떨어진 $[M-15]^+$, 즉 m/z 381을 나타낸다. 또한 모든 경우에서 tert-butyl기가 떨어진 $[M-57]^+$이 base peak로 나타나는데, propionic acid는 m/z 131, sorbic acid는 m/z 169, benzoic acid는 m/z 179, ethyl salicylate와 ethyl *p*-hydroxy benzoate는 m/z 223, *iso*-propyl *p*-hydroxy benzoate와 *n*-propyl *p*-hydroxy benzoate는 m/z 237, *iso*-butyl *p*-hydroxy benzoate와 *n*-butyl *p*-hydroxy benzoate는 m/z 251, *p*-hydroxy benzoic acid는 m/z 309, dehydro acetic acid는 m/z 339이다. 이와 같은 TBDMS 유도체들의 질량스펙트럼은 특징적인 쪼개짐 현상을 나타내고 있기 때문에 이들 화합물들을 쉽게 확인할 수 있는 장점이 있다.

Dehydro acetic acid의 경우에는 2개의 ketone기가 enolization에 의하여 TBDMS 유도체가 생성된다.

또한 구조이성질체(structural isomer)인 *iso*-propyl *p*-



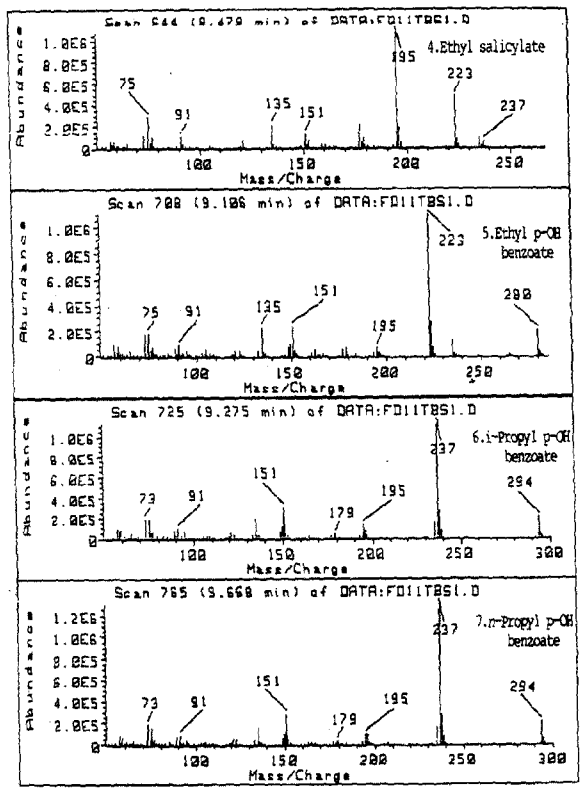


Fig. 2. Mass spectra of t-butyldimethylsilylated preservatives.

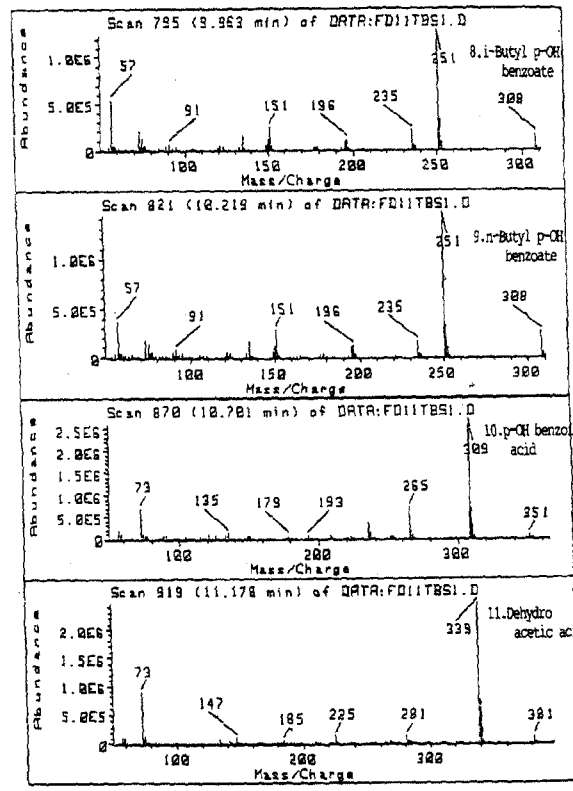


Fig. 2. Countinued.

hydroxy benzoate와 *n*-propyl *p*-hydroxy benzoate, 그리고 *iso*-butyl *p*-hydroxy benzoate와 *n*-butyl *p*-hydroxy benzoate의 경우에는 동일한 질량스펙트럼를 나타내지만, 머무름 시간에서는 각각 0.393 min과 0.256 min의 차이를 나타내기 때문에 TIC상에서 용이하게 확인할 수 있었다. 이 때 생성되는 조각화된 특성질량이온들을 Table 2에 정리하여 나타내었다.

GC/MS와 macro program을 이용한 동시분석방법

시료 중에 잔류되어있는 식품보존료의 존재를 확인하기 위하여 GC/MS만으로 분석한 결과는 Fig. 3의 상단에 TIC로 나타내었다. TIC에서 나타난 각각의 피이크들은 표준물질의 머무름 시간과 비교하여 확인해야 하는데, 이 방법은 TIC상에서의 머무름 시간만을 비교하는 것이기 때문에 정확한 정성분석을 위해서는 다시 한번 MS에 의한 확인과정이 필요하다. 본 연구에서는 이와 같은 GC/MS에 의한 분석방법을 간편화하기 위하여 GC/MS와 computer program을 함께 사용하여 다성분의 식품보존료를 동시에 신속하게 screening할 수 있는 방법을 확립하였다. Fig. 3의 하단에 있는 screening profile은 각각의 화합물에 대하여 3개의 특정이온들을 선정하여(Table 2), 이들이 동일한 머무름 시간

Table 2. Characteristic ions of t-butyldimethylsilylated preservatives

Preservatives	Characteristic ions		
1. Propionic acid	131 $[M-57]^+$	75	184
2. Sorbic acid	169 $[M-57]^+$	75	125
3. Benzoic acid	179 $[M-57]^+$	77	105
4. Ethyl salicylate	195	223 $[M-57]^+$	75
5. Ethyl p-OH benzoate	223 $[M-57]^+$	151	280 $[M]^+$
6. Isopropyl p-OH benzoate	237 $[M-57]^+$	151	294 $[M]^+$
7. n-Propyl p-OH benzoate	237 $[M-57]^+$	151	294 $[M]^+$
8. Isobutyl p-OH benzoate	251 $[M-57]^+$	57	308 $[M]^+$
9. n-Butyl p-OH benzoate	251 $[M-57]^+$	57	308 $[M]^+$
10. p-OH benzoic acid	309 $[M-57]^+$	265	73
11. Dehydro acetic acid	339 $[M-57]^+$	73	381 $[M-15]^+$

에서 피이크로 나타나게 하였다. 예를 들면 sorbic acid의 경우, 특정이온인 m/z 169, 75, 125의 피이크가screening-profile상에서 동일한 머무름 시간에서 세로로 난다. 그러므로 이 분석방법은 GC/MS와 computer program을 함께 사용하여 screening profile상에서 sorbic acid의 머무름시간과 질량스펙트럼을 동시에 확인할 수 있으므로 GC/MS에 의한 재확인 과정이 필요 없을 뿐 아니라 간편하게 screening 할 수 있는 장점을 가지고 있다. Fig. 3의 하단에서는 11종

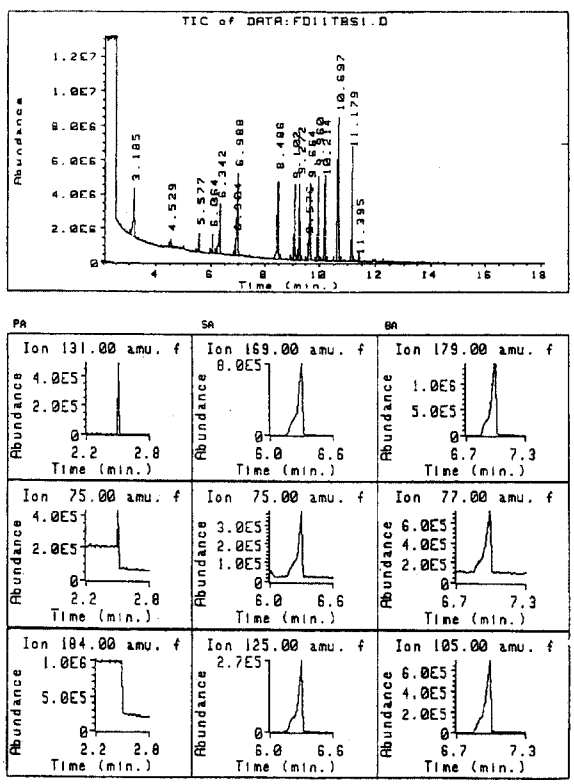


Fig. 3. Screening profile for preservatives in food.

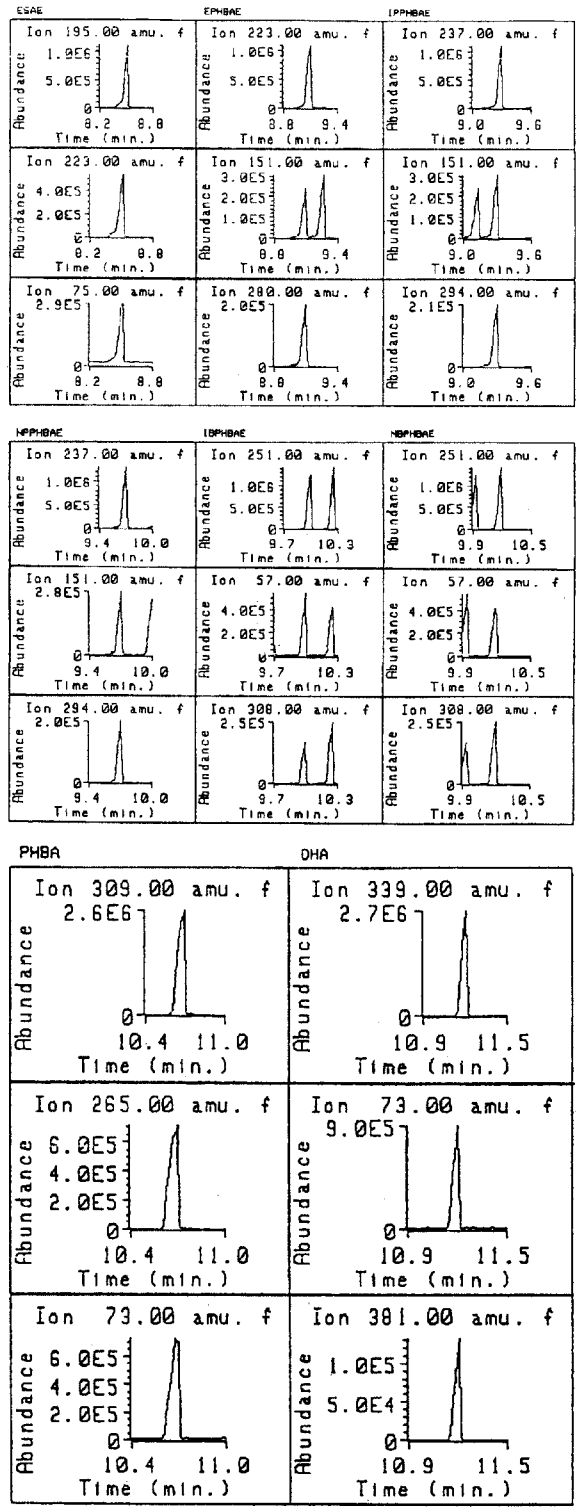


Fig. 3. Continued.

의 식품보존료들을 동시에 분석하는 screening profile을 나타내었고, 여기에 나타난 식품보존료들의 약자는 다음과 같다 (PA: propionic acid, SA: sorbic acid, BA: benzoic acid, ESAE: ethyl salicylate, EPHBAE: ethyl *p*-hydroxy benzoate, IPPHBAE: *iso*-propyl *p*-hydroxy benzoate, NPPHBAE: *n*-propyl *p*-hydroxy benzoate, IBPHBAE: *iso*-butyl *p*-hydroxy benzoate, NBPHBAE: *n*-butyl *p*-hydroxy benzoate, PHBA: *p*-hydroxy benzoic acid, DHA: dehydro acetic acid).

국문요약

식품에 첨가되는 대표적인 11가지 보존료들은 극성이 큰 hydroxyl기와 carboxyl기를 포함하고 있기 때문에 silylation에 의한 유도체화 반응을 통하여 비극성화 시킨 후, GC/MS를 이용하여 이들을 동시에 분석할 수 있는 방법을 확립하였다. 대상화합물들은 액체-액체 추출법을 통하여 추출하였고, 역추출과정(back extration)을 거쳐 정제한 후, 유도체화 반응은 N-methyl-N-tert- butyldimethylsilyl-trifluroacetamide(MTBSTFA)를 사용하여 hydroxyl기와 carboxyl기를 동시에 유도체화하였다. 이들의 질량스펙트럼으로부터 특징적인 이온들을 선정하여 식품보존료들의 다성분 동시분석방법을 확립하였으며, macro program을 통하여 신속하게 screening하는 방법을 확립하였다.

참고문헌

1. 보건복지부: 식품공전, 문영사, 1997.
2. 식품의약품안전청: 식품첨가물공전, 문영사, 1998.
3. Hsieh, H-Y and Glatz, B.A.: Long-term storage stability of the bateriocin propionicin PLG-1 produced by Propionibacterium thoenii and potential as a food preservative. *J. Food Prot.*, **59**, 481-486 (1996).
4. 김창민: 식품첨가물의 관리현황, 화학세계, **36**, 18-22 (1996).
5. Ali, M.S.: Rapid quqntitative method for simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, and four parabens in meat and nonmeat products by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 488-492 (1985).
6. Maeda, Y., Yamamoto, M., Owada, K., Sato, S., Masuri, T. and Nakazawa, H.: Simultaneous liquid chromatographic determination of water-soluble vitamines, caffeine, and preservative in oral liquid tonics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 244-247 (1989).
7. Gigante, B., Barros, A.M., Teixeira A. and Marcelo-Curto M. J.: Separation and simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of benzocaine and benzyl benzoate in a pharmaceutical preparation. *J. Chromatogr.* **549**, 217-220 (1991).
8. 김우성, 임복규, 백종민, 박인원, 임연하, 지영애, 조경종: HPLC를 이용한 식품 보존료의 동시분석에 관한 연구, 한국식품위생안전성학회지, **7**, 49-52 (1992).
9. Beljaars, P.R., Van Dijk, R., Jonker, K.M. and Schout, L.J.: Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut, and wine: interlaboratory study. *J. AOAC. Innt.*, **81**, 991-998 (1998).
10. Sioufi, A. and Pommier, F.: Gas chromatographic determination of low concetrations of benzoic acid in human plasma and urine. *J. Chromatogr.*, **181**, 161-168 (1980).
11. Daniels D.H., et al.: Gas-liquid chromatographic determination of dehydroacetic acid in squash and wine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 893-896 (1983).
12. Lamkin W.M., et al.: Gas chromatographic determination of calcium propionate added as preservative to bread. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 763-767 (1987).
13. Kroger, S.: Gas chromatographic determination of 2-ethylhexanoic acid in urine as its pentaflurobenzyl ester. *Analyst*, **114**, 1647-1648 (1989).
14. 노동석, 김승기, 이정애, 정현숙, 유보경, 박종세: GC/MS를 이용한 식품중 saccharin의 분석에 관한 연구, 한국식품위생안전성학회지, **10**, 239-247 (1995).
15. Kim, K.R., Park, H.K., Paik, M.J., Ryu, H.S., Oh, K.S., Myung, S.W. and Liebich, H.M.: Gas chromatographic profiling and pattern recognition analysis of urinary organic acids from uterinr myoma patients and cervical cancer patients. *J. Chromatog. B*, **712**, 11-22 (1998).