J. Fd Hyg. Safety 16(1), 61–65 (2001)

Gas Chromatography-Electron Capture Detector를 이용한 산분해간장중의 3-Monochloro-1,2-propanediol 분석법에 관한 연구

최종동 · 문귀임 · 오현숙 · 김동술†
대구지방식품의약품안전청

Determination of 3-Monochloro-1,2-propanediol in Acid Hydrolyzed Soysauce(*Ganjang*) by Gas-Chromatography with Electron Capture Detector

Jong-Dong Choi, Kui-Im Moon, Hyun-Suk Oh and Dong-Sul Kim†
Daegu Regional Food and Drug Administration, Soosung-ku, Daegu 706-040, Korea

ABSTRACT – To investigate the optimum condition of 3-monochloro-1,2-propanediol(MCPD) analysis, gas chromatography with electron capture detector was used. Determination of MCPD derivatized with phenylboric acid was more effective than that of underivatized MCPD. In derivatization of MCPD with phenyl boric acid, there were no significantly different between boiling for 2min at 90°C and vortexing for 5min at room temperature. Extrelut column was suitable for extraction of MCPD diluted in 20% NaCl solution and recovery rates were higher than direct extraction of MCPD with ethyl acetate. But, the method of direct extraction of MCPD with ethyl acetate was useful for rapid and qualitative analysis. The sample extracted in soysauce(*ganjang*) was derivatized with phenylboric acid and analyzed by gas chromatography-mass selective detector. That was confirmed as MCPD-phenylboronate.

Key words □ MCPD, MCPD-phenylboronate, GC-MSD, GC-ECD, Soysauce(*Ganjang*)

간장 소비량의 80% 이상을 차지하고 있는 산분해 간장은 염산을 이용하여 탈지대두의 단백질을 가수분해하고 중화시켜 제조한다.[1,2] 이러한 과정에서 글리세롤 및 그 지방산 에스테르는 염산과 반응하여 chlorhydrin이 형성되며, 그 대표적인 물질이 MCPD (3-monochloro-1,2-propanediol)이다.[3,4]

지금까지 MCPD가 인체에 미치는 영향에 대해서는 많은 보고[5-10]가 있었으나 아직까지 명확한 결론은 이루어지지 않고 있다. 다만 현재까지 보고된 MCPD와 DCP(1,3-dichloro-2-propanol)의 독성에 관한 연구결과들을 종합·평가하여 UN의 식품첨가물에 대한 FAO/WHO 합동 전문가 위원회(JECFA)에서는 다음과 같은 결론을 내리고 있다.

"The Commitee concluded that these substances are undesirable contaminants in food and expressed the opinion that their levels in hydrolyzed vegetable proteins should be reduced as far as in technically possible."

따라서 산분해 간장 중에서 MCPD의 함량에 대한 monitoring이 필요하며, 현재 우리 나라의 간장공장에서는 자체적으로 MCPD의 기준을 2ppm으로 설정, 관리하고 있다.

MCPD의 분석을 위하여 Pesselman과 Feit,[11] Rodman과 Ross[12] 그리고 Plantinga 등[13]은 유도체화 방법을 사용하였으며, 일본 구마모토 공업기술센터에서는 비유도체화 방법을 사용하고 있다.[14] 또한 MCPD의 추출에 있어서도 용매를 사용하는 방법[15]과 Extrelut column을 사용하는 방법[16]이 보고되고 있다. 하지만 그 효율성과 회수율에 대한 보고는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 MCPD의 유도체화 방법 및 MCPD의 추출방법에 따른 분석의 효율성과 회수율을 gas chromatography-electron chapture detector 및 gas chromatography-mass selective detector를 이용하여 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 기구

실험에 사용된 간장은 시판되는 산분해간장을 사용하였으며, MCPD(3-monochloro-1,2-propanediol)는 Aldrich사에서, phenylboric acid는 Sigma사에서 구입하였다. Ethyl

†Author to whom correspondence should be addressed.

acetate와 Extrelut NT 3 column은 Merck사에서 구입하여 사용하였다. MCPD는 20% NaCl 용액에 녹여 100 ppm의 stock solution을 만들어 사용하였고, phenylboric acid는 ethyl acetate에 녹여 0.2%가 되게 제조하였다. NaCl을 제외한 모든 시약은 특급을 사용하였다.

분석에 사용된 기구로는 GC-ECD(Gas Chromatograph with Electron Capture Detector, Hewlett Packard, HP 6890), GC-MSD(Gas Chromatograph with Mass Selective Detector, Hewlett Packard, HP 6890), Rotary vaccum evaporator (EYELA), Vortex mixer(Thermolyne) 등을 사용하였다.

GC-ECD 및 GC-MSD의 분석 조건

MCPD 및 MCPD-phenylboronate의 분석은 GC-ECD와 GC-MSD를 사용하였다. 이때 사용된 GC-ECD의 oven 온도는 80°C에서 5분간 유지하다가 10°C/min의 속도로 280 °C까지 승온시킨 후 10분간 유지하였다. 사용된 column은 DB-5(30m × 0.25 mm × 0.25 μm)이었고, 도입부와 검출기 온도는 각각 260°C와 280°C이었으며, 질소의 유속은 1 ml/min이었다. GC-MSD의 oven 온도는 70°C에서 1분간 유지하고 30°C/min의 속도로 280°C까지 승온시킨 후 10분간 유지하였다. 사용된 column은 ultra-2 (50m × 0.32 mm × 0.17 μm)이고, 도입부와 검출기 온도는 각각 260°C와 280°C이었으며, helium의 유속은 1 ml/min이었다.

실험방법

MCPD 및 MCPD-phenylboronate 유도체의 검출

시료 3 ml를 Extrelut 3 column에 취하고 약 10분간 흡착시킨 후, ethyl acetate로 용출하였다. 용출액은 무수황산나트륨으로 탈수시키고 40°C에서 감압농축하여 1 ml가 되게 하였다. 이 농축액 1 ml를 직접 분석하는 방법과 농축액 1 ml에 0.2% phenylboric acid 1 ml를 첨가하여 실온에서 5분간 vortex하여 유도체화 시킨후 분석하는 방법을 비교하였다.

유도체화 방법에 따른 MCPD-phenylboronate의 분석

위와 같이 실시한 농축액 1 ml에 0.2% phenylboric acid 1 ml를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켜 유도체화 시키는 방법과 90°C에서 20분 반응시켜 유도체화 시키는 방법을 비교하였다.

추출방법에 따른 MCPD-phenylboronate의 분석

20% NaCl 용액에 녹아 있는 MCPD의 추출을 위하여 ethyl acetate로 직접 추출하는 방법과 Extrelut 3 column을 이용하여 MCPD를 흡착시키고 ethyl acetate로 추출하는 방법을 사용하였다. 추출액 1 ml는 phenylboric acid 1 ml로 유도체화 후 GC-ECD로 분석하였다.

결과 및 고찰

MCPD 및 MCPD-phenylboronate 유도체의 분석

Fig. 1은 DB-5 column과 ECD를 이용하여 MCPD를 직접 분석한 경우와 MCPD를 phenylboric acid와 반응시켜 MCPD-phenylboronate로 유도체화한 후 분석한 결과이다. Fig. 1(A)에서 알 수 있듯이 MCPD를 직접 분석한 경우는 peak가 broad하고 tailing이 생겼으나, MCPD를 phenylboric acid로 유도체화하여 분석한 결과 sharp한 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 1(B)). 이러한 것은 MCPD를 유도체화 시키지 않고 분석하는 경우 MCPD는 수산기를 2개 가지고 있어 흡착성이 높지만, phenylboric acid로 유도체화하면 수산기가 봉쇄되어 흡착성이 낮아지는 것으로 생각되며(Fig. 2), 송과 문[14]도 GC-FID를 이용하여 MCPD를 분석하고 비슷

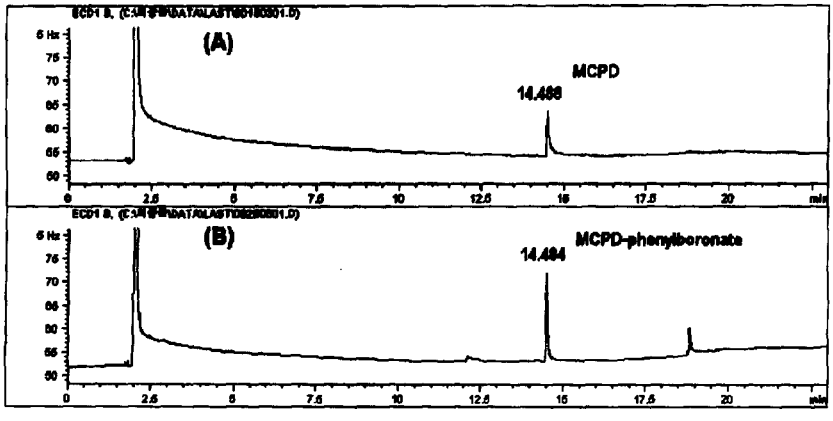

Fig. 1. GC chromatogram of MCPD(A) and MCPD-phenylboronate(B).

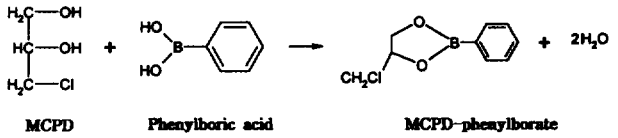

Fig. 2. 3-monochloro-1,2-propanediol reaction with phenylboric acid.

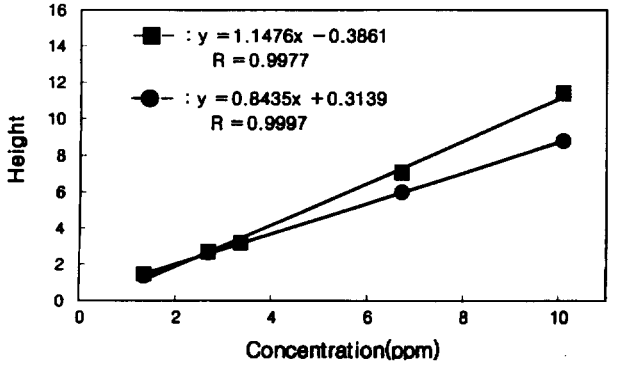

Fig. 3. Plot of the concentration of MCPD against the ratio of peak height.
-■-: Derivatized for 20 min at 90°C
-●-: Derivatized for 5 min vortex at room temperature

한 경향을 보고하였다.

유도체화 방법에 따른 MCPD-phenylboronate의 검출 비교

MCPD의 분석은 phenylboric acid로 유도체화한 후 분석하는 것이 감도가 우수하다는 것을 확인하고, 유도체화 방법에 대한 실험을 실시하였다. 본 실험에서는 MCPD와 phenylboric acid의 유도체화 방법을 실온에서 5분간 vortex하는 경우와 90°C에서 20분간 반응하는 경우로 나누어 실험을 실시하였다. MCPD stock solution을 농도별로 희석하고 각각을 유도체화한 후 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 실온에서 5분간 vortex 혹은 90°C에서 20분 반응시켜 유도체화한 경우의 R값은 각각 0.9997과 0.9977로 나타났으며, 두 경우 모두 높은 신뢰도를 보여주었다. 유도체화 방법에 따른 calibration curve에는 큰 차이가 없었으나 실온에서 5분간 vortexing하는 경우가 시간적, 경제적으로 MCPD-phenylboronate의 유도체화에 유리한 것으로 나타났다.

Table 1. Recovery test of MCPD according to extraction methods

Concentration of MCPD (ppm)	A(%)	B(%)
2.53	79.82 ± 0.25	96.42 ± 0.28
5.06	70.15 ± 0.34	89.16 ± 0.32
12.65	65.91 ± 0.19	84.76 ± 0.51
25.3	58.79 ± 0.41	60.48 ± 0.38

Mean ± S.D.
A: Direct extraction of ethyl acetate
B: Extraction by Extrelut 3 column

추출 방법에 따른 MCPD-phenylboronate의 검출 비교

MCPD의 추출방법으로 용매를 이용하여 직접 추출하는 방법과 Extrelut 3 column을 이용하여 추출하는 방법이 보고되어 있으나 그 회수율에 대한 보고는 없다. 20% NaCl 용액으로 제조한 MCPD를 ethyl acetate를 이용하여 직접 추출하고 유도체화하여 분석한 결과와 Extrelut 3 column을 이용하여 MCPD를 흡착하고 ethyl acetate로 추출하고 유도체화하여 분석한 결과는 Table 1과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 Extrelut 3 column을 이용하는 경우가 ethyl acetate로 추출하는 것보다 MCPD의 회수율이 월등히 높았으며,

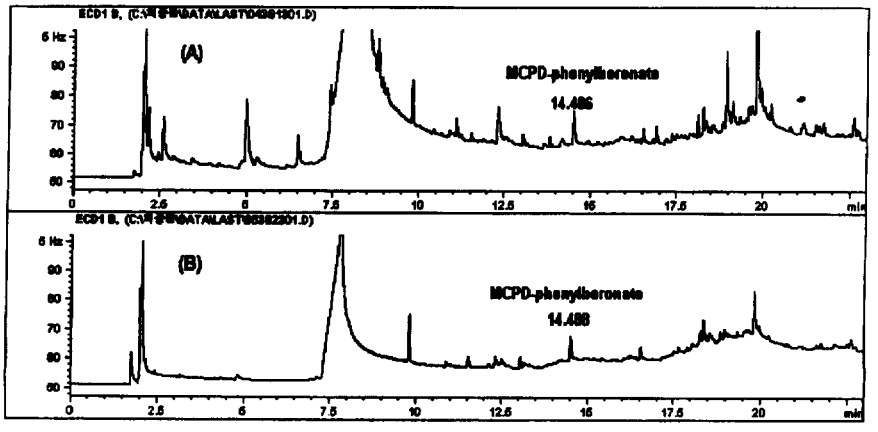

Fig. 4. GC chromatogram of MCPD extracted by Extrulet column(A) and ethyl acetate(B) in MCPD spiked *ganjang*.

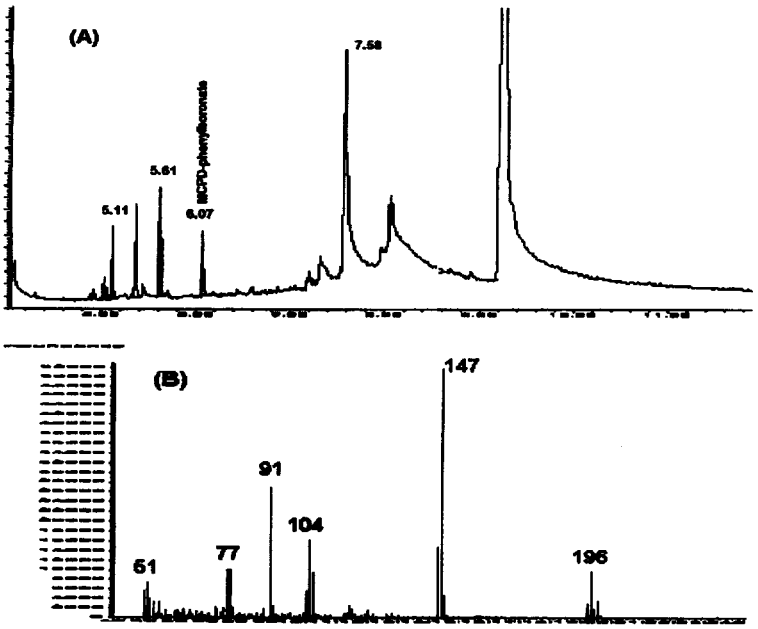

Fig. 5. Total ion chromatogram(A) and mass spectrum(B) of MCPD-phenylboronate extracted in *ganjang*.

MCPD의 농도가 5 ppm 이하에서는 약 90% 이상의 회수율을 보여주었다. 또한 MCPD의 농도가 높을수록 그 회수율은 감소하는 것으로 나타났다. Ethyl acetate로 MCPD를 직접 추출하는 경우 MCPD의 농도가 5 ppm 이하에서 약 70%의 낮은 회수율을 보여주었으나, MCPD를 정성적으로, 신속하게 분석하고자 할 경우에는 ethyl acetate로 직접 추출하는 방법도 적당할 것으로 생각되었다.

간장에 spiking한 MCPD의 추출방법에 따른 검출율 및 GC-MSD에서의 확인

Fig. 4는 간장에 MCPD를 직접 spiking 하여 분석한 결과로서, Fig. 4(A)는 Extrelut 3 column을 이용하여 MCPD를 흡착·추출하여 분석한 결과이며, Fig. 4(B)는 ethyl acetate로 직접 MCPD를 추출하여 분석한 결과이다. 두 경우 모두 완벽하게 독립된 peak의 MCPD-phenylboronate를 분리할 수 있었으나, 각각의 MCPD 회수율은 99.54%와 67.40%를 보여주어 Extrelut 3 column을 사용하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

MCPD를 spiking한 간장을 Extrelut 3 column을 이용하여 추출하고, phenylboric acid로 유도체화한 후, GC-MSD로 분석한 결과 Fig. 5(A)와 같은 total ion chromatogram을 얻었으며, 이때의 mass spectrum 결과는 Fig. 5(B)와 같다. 이 물질은 최종적으로 MCPD-phenylboronate 인 것으로 확인되었다.

국문요약

Electron capture detector가 장착된 gas chromatography를 이용하여 간장에서 3-monochloro-1,2-propanediol(MCPD)의 효율적인 분석조건을 조사하였다. MCPD를 직접 분석하는 것 보다 MCPD를 phenylboric acid로 유도체화하여 분석하는 경우가 sharp한 peak를 얻을 수 있었으며, 감도도 우수하였다. 유도체화 방법을 실온에서 5분간 vortex 혹은 90℃에서 20분 반응시켜 분석한 결과, R값이 각각 0.9997과 0.9977로 큰 차이를 보이지는 않았다. MCPD의 추출방법은 Extrelut 3 column을 사용하는 것이 ethyl acetate로 직접 추출하는 것보다 회수율이 월등히 높았으며, MCPD의 농도가 높을수록 회수율이 낮게 나타났다. 하지만 MCPD를 정성적으로 분석하고자 할 경우 ethyl acetate로 직접 추출하는 방법도 유효한 것으로 나타났다. 간장에 MCPD를 spiking 하고 gas chromatography-electron capture detector 및 gas chromatography-mass selective detector로 분석한 결과 sharp한 모양의 peak를 얻을 수 있었으며, mass spectrum으로 MCPD를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 이한창: 한국장류의 현실과 미래. 간장산업의 과학과 기술, 영남대학교, pp. 3-28 (1996).
2. 윤복만, 박재선, 박창희, 최용진, 전문진: 곡자첨가에 의한 산분해간장 발효 중 MCPD 및 주요 화학성분의 변화. 한국식품과학회지, **30**(2), 419-424 (1998).
3. Velisek, J., Ledahudcova, K., Hajslova, J., Pech, P., Kubelka, V. and Viden, I.: New 3-chloro-1,2-propanediol derived dihydroxypropylamines in hydrolyzed vegetable proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1389-1392 (1992).
4. Velisek, J., Davidek, T., Davidek, J. and Hamburg, A.: 3-chloro-1,2-propanediol derived amino alcohol in protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, **56**(1), 136-138 (1991).
5. Crabo, B. and Appelgren, L.E.: Distribution of ^{14}C-α-chlorohydrin in mice and rats. *J. Reprod. Fert.*, **30**, 161-163 (1972).
6. Jones, A.R., Milon, D.H. and Murcott, C.: The oxidative metabolism of α-chlorohydrin in the rat and the formation of spermatocele. *Xenobiltica*, **8**, 573-582 (1978).
7. Velisek, J., Davidek, T., Davidek, J. and Hamburg, A.: 3-chlor-1,2-propanediol derived amino alcohol in protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, **56**(1), 136-138 (1991).
8. 이철호: 간장류의 기능성과 안전성. 간장산업의 과학과 기술, 영남대학교, pp. 55-68 (1996).
9. 이철호: 산분해 간장 내 MCPD 및 DCP의 생성기작과 인체에 미치는 영향-화학간장의 유해성에 관한 한·일 학술심포지움. 세종문화회관, 서울, pp. 83-95 (1996).
10. 박종세, 김동술: 꼭 알아야 할 식품위생. 유림문화사, 경기, pp. 114-122 (1998).
11. Pesselman, R.L. and Feit, M.J.: Determination of residual epichlorohydrin and 3-chloropropanediol in water by gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatography*, **439**, 448-452 (1988).
12. Rodman, L.E. and Ross, R.D.: Gas-liquid chromatography of 3-chloropropanediol. *J. Chromatography*, **369**, 97-103 (1986).
13. Plantinga, W.J., Van Toorn, W.G. and Van Der Stegen, G. H. D.: Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in liquid hydrolysed vegetable proteins by capillary gas chromatography with flame ionization detection. *J. Chromatography*, **555**, 311-314 (1991).
14. 송인상, 문주석: 식물성 가수분해 단백질 제조과정중 생성되는 염소화합물의 최소화 기술 개발(산분해간장을 중심으로). 한국식품위생연구원 (1997).
15. Kissa, E.: Determination of 3-chloropropanediol and related dioxolanes by gas chromatography. *J. Chromatography*, **605**, 134-138 (1992).
16. Spyres G.: Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in hydrolyzed vegetable proteins by capillary gas chromatography with electrolytic conductivity detection. *J. Chromatography*, **638**, 71-74 (1993).