J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 4, pp. 243~247 (2007)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Headspace-GC/MS를 이용한 음료 중 벤젠 분석

김은주 · 박상애 · 최동미*
식품의약품안전청 신종유해물질팀

Analysis of Benzene in Beverages by Headspace-GC/MS

Eunju Kim, Sangaeh Park, and Dongmi Choi*
New Hazard Chemicals Team, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea
(Received September 23, 2007/Accepted December 4, 2007)

ABSTRACT – A selective analytical method of headspace-GC/MS has been applied to determine levels of benzene in beverages. Food samples were 85 including 2 fruit juices, 6 fruit beverages, 11 carbonated beverages, 55 mixed beverages, and 4 beverage concentrations, and 7 extracted beverages. For phase equilibration of headspace, sample was stirred at 40°C for 30 min. The oven temperature was 60°C and elevated to 180°C at 15 °C/min. The internal standard was benzene-d6. The identification was done by the selected target ions such as m/z 51, 77, and 78 and the confirmation was done by the response ratio of m/z 77 to m/z 78 between sample and standard. The overall recoveries were ranged from 91% to 101% and the limit of quantification was 1 μg/kg. The average level of benzene were 5 μg/kg for fruit beverages, 2 μg/kg for carbonated beverages, 7 μg/kg for mixed beverages and 7 μg/kg for extracted beverages.

Key words: benzene, beverages, headspace, GC/MS

현대인은 갈증해소나 원기회복, 재충전, 영양보충 등 여러가지 이유로 음료를 마시고 있다. 또한 음료의 종류도 과실채소류 음료, 탄산음료류, 두유류, 발효음료류, 분말음료, 기타 음료 등으로 다양화됨에 따라 소비자 선택의 폭도 매우 넓어지고 있다(Table 1).[1)]

1990년 미국 FDA에서는 비알콜음료인 soft drinks에서 벤젠이 검출될 수 있다는 음료업계의 정보에 따라 산업체와 공동으로 연구를 시작하여 안식향산(나트륨)과 비타민 C가 함유되어 있는 음료류에서 낮은 수준의 벤젠 생성이 된다는 것을 보고하였으며,[2)] 이에 미국 FDA는 음료협회와 협의하여 업계 자체적으로 제조공정을 변경하여 벤젠 생성의 저감화를 권고한 바 있다.

음료 중 벤젠생성은 음료원료성분에 따라 천연으로 존재하거나 산화방지나 영양보충을 위하여 첨가한 비타민 C[3)]와 박테리아, 이스트, 곰팡이의 성장을 억제하기 위하여 합성보존제로써 사용한 안식향산나트륨(과실채소음료, 탄산음료, 기타음료 등에 0.6 g/kg 이하로 사용 가능)[4)]에 기인한다. 음료 중 비타민 C와 안식향산나트륨을 함께 함유할 경우, 비타민 C에 의해 금속촉매(Cu, Fe 등)가 산화되고 O_2은 환원되어 superoxide anion radical을 생성한다. 결과적으로 superoxide anion radical은 hydrogen peroxide를 생성하고 생성된 hydrogen peroxide가 금속이온 존재시에 hydroxyl radical로 변환되어, 안식향산나트륨의 benzoic acid에서 carboxyl group을 제거하고 벤젠을 형성하게 된다.[5-6)]

일반적으로 벤젠은 염료, 세제, 플라스틱 등의 용제나 방향족화합물의 합성출발물질로 사용되어 왔는데 벤젠의 만성 노출시에는 백혈구감소증, 혈소판감소증, 혈구감소증 혹은 재생불량성빈혈 초래하는 등[7-8)] 국제암센터(IARC), 세계보건기구(WHO) 및 미국 EPA에서 발암물질로 지정됨에 따라 사용이 엄격히 제한되고 있다.[9)]

현재까지 국내 · 외 적으로 음료 중 벤젠 잔류허용기준을 설정한 사례는 없으며 단지 먹는 물의 관리를 위한 수질기준으로 WHO, Codex, 일본, 호주, 한국은 10 μg/kg, 미국, 캐나다는 5 μg/kg, 유럽(EU)은 1 μg/kg을 설정하고 있다.[10)] 2006년 2월 미국에서 안식향산과 비타민 C가 공존하는 청량음료에서 WHO 수질기준의 2.5~5배를 초과하는 벤젠검출이 보도됨에 따라 우리나라를 비롯하여 미국, 영국, 아일랜드 등에서 자국내 유통 중인 음료 중 벤젠의

*Correspondence to: Dongmi Choi, New Hazard Chemicals Team, Korea Food & Drug Administration, #194 Tongil-Ro, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1664, Fax: 82-2-382-4892
E: mechoi@kfda.go.kr

Table 1. Classes of beverages in Food Code

Category	Sub-category	Regal limit (As benzoic acid)
Fruit・vegetable drink	Concentrated fruit drink Concentrated vegetable drink Concentrated fruit・vegetable drink Fruit juice Vegetable juice Fruit・vegetable juice Fruit drink Vegetable drink Fruit・vegetable drink	Benzoic acid ≤ 0.6 g/kg (Benzoic acid should not detected in non-thermal treated drinks)
Carbonated drink	Carbonated drink Carbonated water Flavored and carbonated drink	Benzoic acid ≤ 0.6 g/kg (Benzoic acid should not detected in carbonated water)
Soy drink	Soy drink Soy milk Formulated soy drink Powdered soy drink Other soy drink	
Fermented drink	Drink containing lactic acid bacteria Drink containing yeast Other fermented drink	Benzoic acid ≤ 0.05 g/kg
Powdered drink	Powdered drink	
Other drink	Mixed drink Extracted drink Drink base	Benzoic acid ≤ 0.6 g/kg

실태조사를 수행하였다. 식품의약품안전청에서도 실태조사 결과를 토대로 제조공정 개선, 안식향산 사용 자제 등 업계의 음료 중 벤젠 저감화를 권고하였다.

본 연구에서는 과실채소류음료, 탄산음료류, 두유류, 발효음료류, 분말음료, 기타음료 등 다양한 음료 중 벤젠 실태조사를 하고자 하였다. 현재까지 음료 및 탄산음료류나 먹는 물 중 벤젠을 검출하기 위한 시험법으로 purge and trap, headspace, 및 solid phase microextraction 등을 이용한 시료 전처리 방법과 GC/MS에 의한 분석방법을 주로 사용하고 있는데[11-15] 본 연구에서는 간편하고 보편적으로 사용할 수 있는 음료시료의 전처리 방법 및 최적화된 HS-GC/MS의 분석조건으로 수행한 국내유통 음료에 대한 잔류실태를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 시액

분석에 사용되는 시약은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA), Wako Pure Chemical Industries Inc.(Osaka, Japan) 및 Merck Inc.(Damstadt, Germany)에서 HPLC급이나 잔류농약용을 구매하여 사용하였다.

벤젠 표준물질은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며 메탄올에 녹여 200 μg/mL의 표준원액을 조제하고 이에 물을 가해 1 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 내부표준물질로는 벤젠-d6을 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 내부표준용액은 벤젠-d6이 2 mg/mL 되게 메탄올에 용해한 내부표준원액 일정액을 취하고 물을 가해 5 μg/mL가 되도록 조제하였다. 표준원액 및 내부표준원액은 최대한 headspace를 적게 하기 위하여 20 mL headspace vial에 가득 채우도록 옮긴 후 crimping하여 4°C에서 보관하며 사용하되, 한번 개봉하여 사용하였거나 10일 이상 보관했던 표준원액 및 내부표준원액은 사용하지 않았으며 표준용액 및 내부표준용액의 조제는 필요 시 마다 하였다.

분석기기 및 방법

기체크로마토그래프/질량분석기(Gas Chromatograph/Mass spectrometer, GC-6890, MS-5973, Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA) 및 헤드스페이스 포집기(Headspace Autosampler, HS-G1888, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 시료 일정량(5 mL)을 정확히 취해 헤드스페이스 바이알(20 mL)에 넣고 내부표준용액(10 μL)을 첨가하여 시험용액으로 하였다. 상평형을 위하여 40°C에서 30분간 정치한 후 기체크로마토그래프/

질량분석기를 이용하여 다음과 같은 조건에서 분석하였다.

GC 컬럼은 DB-624(30 m × 0.32 mm I.D, 1.8 μm)를 사용하였으며, 오븐 온도는 처음 60°C에서 5분간 머물게 한 후 180°C까지 1분당 15°C로 승온하였다. 시료는 분할 주입법(5:1)을 사용하여 1 mL를 주입하였으며 운반기체로 헬륨을 사용하였으며 유량은 1.5 mL/min이었다. 시료 주입구, 트랜스퍼 라인 및 이온원의 온도는 각각 180°C, 230°C 및 230°C이었다. 질량분석은 전자충격이온화(70 eV) 방식을 이용하여 스캔 모드(범위 m/z 20~300)로 실시하였다. 벤젠의 경우 m/z 51, 77, 78을, d6-벤젠의 경우 m/z 84을 선택이온으로 하였다.

대상시료

시중에 유통되는 과실음료 6종, 착향탄산음료 11종, 혼합음료 55종, 추출음료 7종, 음료베이스 4종, 과실쥬스 2종 등 음료류 총 85종에 대해 전국 6개 지역(서울, 부산, 광주, 대전, 경기일대)의 도소매 시장에서 구매하였다.

과실채소류음료에 속하는 과실음료란 농축과실즙(또는 과실분), 과실쥬스 등을 원료로 하여 가공한 것(과실즙 10% 이상)을 말한다. 탄산음료류에 속하는 착향탄산음료란 탄산음료에 식품첨가물(착향료)을 주입한 것을 말한다. 또한 기타음료에 속하는 혼합음료란 먹는 물에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것을 말하며, 추출음료란 식물성 원료를 먹는 물로 가공(가열추출 등)하여 액상으로 만든 것이거나 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것을 말한다.[4] 대상시료 모두는 보존료로 안식향산을 사용할 수 있으며 천연이나 인위적으로 비타민 C를 함유하고 있는 음료이었다.

결과 및 고찰

벤젠에 대한 크로마토그램 및 질량스펙트럼은 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다. 검량선 작성을 위하여 표준물질 5개 농도 범위(4, 10, 20, 40, 100 ng/mL)에서 측정분석한 결과 상관계수 r^2는 0.9997로 직선성이 매우 좋고 분석방법으로 매우 만족할 만한 수준이었다(Fig. 3). 검출한계는 신호대 잡음비 3이상에서 0.3 μg/kg이고 정량한계는 1 μg/kg로 우리나라를 비롯하여 WHO나 미국 EPA에서 권장하는 먹는 물 중 벤젠 잔류허용기준의 범위 5~10 μg/kg를 고려할 때 만족할 만한 수준이었다.

정성 분석을 위하여 우선적으로 시료의 크로마토그램상의 각 피크를 표준물질의 피크와 비교하여 머무름 시간이 ±2% 이내인 경우 대상물질로 확인하였으며, 질량스펙트럼에서 선택이온 m/z 51, 71 및 78을 확인하였다. 또한 선택이온 간의 반응세기 비로 재검증하였는데 선택이온 m/z 78에 대한 m/z 77의 반응세기 비에 있어 검량표준용액에 대한 시료의 비가 ±25% 이내인 경우에 한하여 대상물질로 간주하였다. 정량 분석은 벤젠-d6을 이용한 동위원소

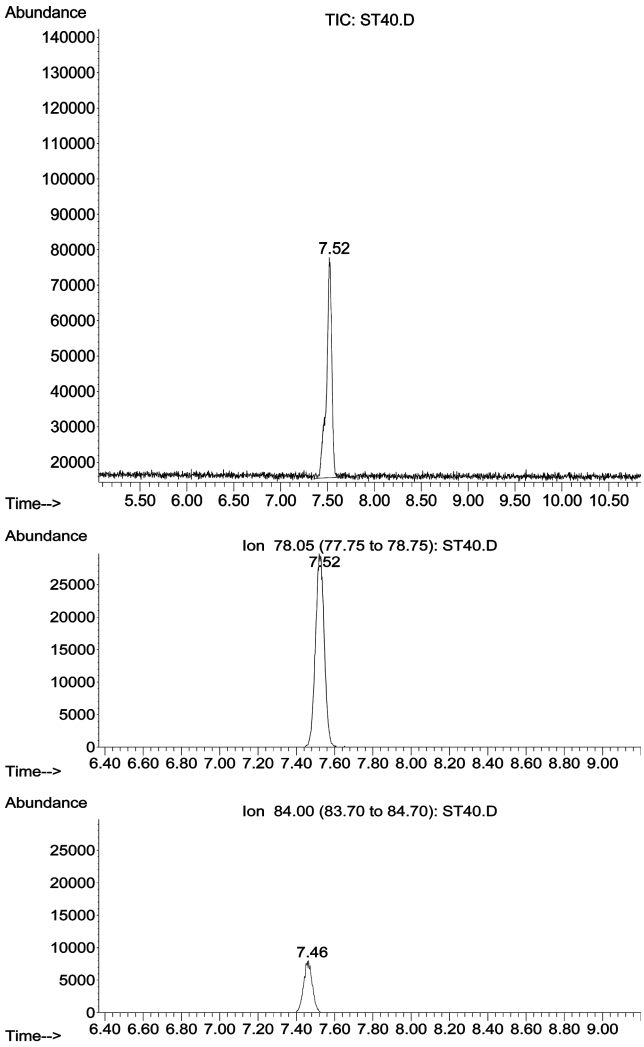

Fig. 1. Typical TIC chromatogram of benzene spiked with d6-benzene (top) and chromatogram for m/z 78 (middle) and m/z 84 ion (bottom).

희석법에 따라 실시하였는데 벤젠의 선택이온 m/z 78과 벤젠동위원소의 선택이온 m/z 84의 피크 면적비를 y축으로 하고 표준물질의 농도를 x축으로 하여 음료시료 중 대상물질의 잔류수준을 산출하였다.

분석방법의 효율을 재고하기 위하여 벤젠을 함유하지 않은 음료에 알고 있는 농도(4, 10 또는 100 μg/kg)의 표준물질을 첨가하여 시료와 같은 방법으로 벤젠 함량을 측정하여 회수율을 산출한 결과를 Table 2에 나타냈다. 회수율의 범위는 89.6~90.0%였고 CV는 4.9~18.9%로 만족한 결과를 얻었다.

본 연구에서 최적화한 분석방법을 식품시료에 적용한 결과 총 85개 음료시료 중 38개 음료에서 벤젠이 검출되지 않았다. 벤젠이 검출된 음료의 경우 검출 수준은 최소 1 μg/kg에서 최대 49 μg/kg이었다. Table 3에 나타나 있듯이 과실음료의 검출수준은 4~18 μg/kg이었으며 평균수준은 5

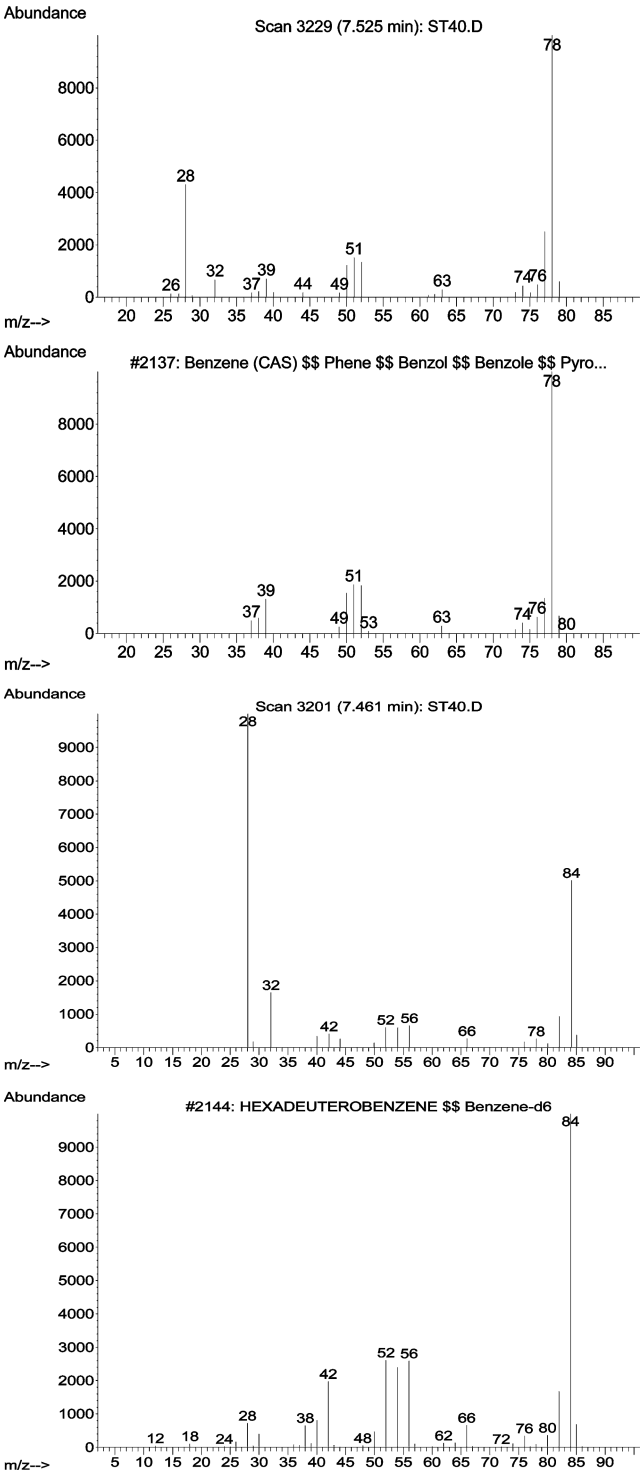

Fig. 2. Typical mass spectrum of benzene (2 tops) and d6-benzene (2 bottoms).

μg/kg이었다. 착향탄산음료의 검출수준은 3~12 μg/kg이었으며 평균수준은 2 μg/kg이었다. 혼합음료의 검출수준은 1~49 μg/kg이었으며 평균수준은 7 μg/kg이었다. 추출음료의 검출수준은 2~13 μg/kg이었으며 평균수준은 7 μg/kg이었다. 음료베이스 4건과 과실쥬스 2건에서는 모두 벤젠

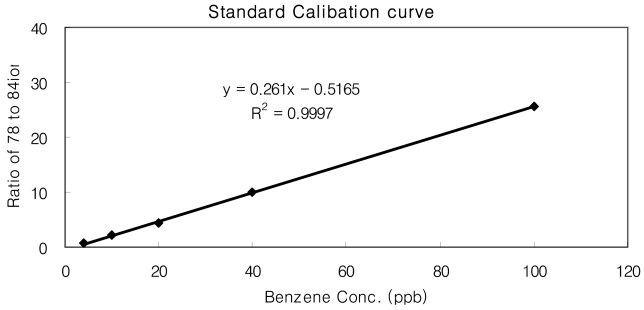

Fig. 3. The calibration curve for benzene.

Table 2. Recovery percent of benzene in the spiked mixed drinks

Spiked (μg/kg)	Fortified (μg/kg)	Recovery (%)	CV (%)
4	3.6	89.6	13.1
10	9.0	89.6	18.9
100	90.0	90.0	4.9

Table 3. Levels of benzene in the beverage samples

Category	No.[1)]	N.D[2)]	Detection (μg/kg)	
			Range	Average
Fruit drink	6	3	4~18	5
Fruit juice	2	2	-	-
Flavored and carbonated drink	11	8	3~12	2
Other drink	55	21	1~49	7
Extracted drink	7	0	2~13	7
Drink base	4	4	-	-

[1)] No. (Number) : 분석시료 수
[2)] N. D (Non detected) : 불검출

이 검출되지 않았다. 이와 같은 검출수준은 미국, 캐나다, 호주 등 제외국의 모니터링 결과와 매우 유사한 수준이었다. 미국 FDA에서 수행한 청량음료 및 기타 음료 100여 건에 대한 모니터링 결과 4개 음료에서 9~79 μg/kg의 벤젠이 검출되었으며, 캐나다에서 청량음료, 무알콜음료 및 칵테일 음료 118건에 대해 실태조사한 결과 불검출~23 μg/kg의 벤젠이 검출되었다. 또한 호주에서 청량음료, 광천수 등 69건에 대해 검사한 결과 불검출~40 μg/kg이 검출되었으나 90% 이상이 10 μg/kg 이하였다.

우리나라를 비롯하여 미국, 캐나다, 호주 등에서도 모니터링 결과 10 μg/kg을 초과한 음료에 대해서는 자진회수를 권고하고 있으며 제조공정 개선 등 저감화를 추진하고 있다. 또한 미국의 경우 롯트별, 저장 및 취급에 따른 벤젠 검출 수준 차이의 원인 규명을 위하여 지속적인 검사를 진행 중에 있다. 따라서 본 연구내용인 음료 중 벤젠을 분석하는 방법은 향후 유통식품의 안전을 확보하기 위한 음료분석에 매우 유용하게 적용할 수 있으리라 사료된다.

요 약

헤드스페이스-기체크로마토그래프/질량분석기를 이용하여 음료류 중 벤젠을 분석하였다. 대상식품은 시중에 유통되는 과실쥬스 2종, 과실음료 6종, 착향탄산음료 11종, 혼합음료 55종, 추출음료 7종, 음료베이스 4종 등 총 85종이었다. 헤드스페이스의 상평형을 위하여 40ºC에서 30분간 교반하였으며 오븐온도는 초기 온도 60ºC에서 5분간 유지 후 15ºC/분의 비율로 180ºC까지 상승하였다. 내부표준물질로는 벤젠-d6을 사용하였다. 선택이온 m/z 51, 77, 78로 확인하였으며 선택이온 m/z 78에 대한 m/z 77의 반응세기비로 재검증하였다. 벤젠의 선택이온 m/z 78과 내부표준물질 벤젠-d6의 선택이온 m/z 84에 대한 피크 면적비로 정량하였다. 회수율은 91~101%이었으며, 정량한계는 1 μg/kg이었다. 벤젠의 평균검출수준은 과실음료의 경우 5 μg/kg, 착향탄산음료의 경우 2 μg/kg, 혼합음료의 경우 7 μg/kg, 추출음료의 경우 7 μg/kg이었다.

참고문헌

1. 식품저널 편집부 : 제3장 식품산업현황 in 식품유통연감 2005 (2005).
2. Food and Drug Administration (FDA): Consumer magazine Sept-Oct (2005). www.kfa.gov/fdac/features/2006/506M_benzene.html. Assessed on Agust 31, 2007.
3. Barshick, S., Smith, S., Buchanan, M., Guerin, M. : Determination of benzene contenet in food using a novel blender purge and trap GC/MS method. *J. Food Com. Anal*., **9**, 244-257 (1995).
4. 식품의약품안전청 : 식품별 기준 및 규격 in 식품공전 pp. 281~296. (2005).
5. Maltoni, C., Scarnato, C. : First experimental demonstration of the carcinogenic effect of benzene. *Med. Lavoro*, **70**, 352-357 (1979).
6. Halliwell, B., Gutteridge. J. : The importance of free radical catalytic metal ions in human disease. *Mol. Aspects Med*., **8**, 89-193 (1985).
7. Kuang, S., Liang. W.: Clinical analysis of 43 cases of cvhronic benzene poisoning. *Chemico-Biological Interaction.*, **153-154**, 129-135 (2005).
8. Brandao. M., Rego, M., Pugliese, L., Clarencio, J., Bastos, C., Ferreira, J., Meyer, R., Neves, M., Freire. S. : Phenotype analysis of lymphocytes of workers with chronic benzene poisoning. *Immunology Letters*., **101**, 65-70 (2005).
9. International Agency for Research on Cancer (IARC): Summaries & Evaluations-Benzene. 29, p. 93 (1982).
10. Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A. : Investigation into the benzene and toluene content ofg soft drinks. *Food Cont*., **12**, 505-509 (2001).
11. US Environmental Protect Agency (EPA): Method 1624 Revision B-Volatile organic compounds by isotope dilution GC/MS (Appendix A to Part 136) (1989).
12. Przyjazny, A., Kokosa, J. : *J. Chromatogr. A*, **977**, 143-153 (2002).
13. Gardner, L., Lawrence, G. : Short communications: Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. J. Agric. Food Chem. **41**, 693-69 (1993).
14. McNeal, T., Nyman, P., Diachenko, G., Hollifield, H. : Survey of benzene in foods by using headspace concentration techniques and capillary gas chromatography. *J. AOAC Intl.*, **76**, 1213-1219 (1993). *J. AOAC Intl*., **75**, 334-340 (1992).
15. Creaser, C., Weston. D., Wilkins, J., Yorke, C., Irwin, J., Smith, B. : Determination of benzene in aqueous samples by membrane inlet, solid phase microextraction and purge and trap extraction with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Commun.*, **36**, 383-386 (1999).