J. Fd Hyg. Safety 12(3), 210 - 216(1997)

식품 중 Gas Chromatography/Mass Spectrometry를 이용한 산화방지제의 분석에 관한 연구

이정애† · 노동석
한국과학기술연구원, 도핑콘트롤센터

Analysis of Antioxidants in Fatty Foods Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry

JeongAe Lee† and Dong-Seok Lho
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. BOX 131. Cheongryang, Seoul 136-791, Korea

ABSTRACT — The prevention of oxidative degradation in fats and oils is largely controlled by the use of synthetic phenolic antioxidants. Antioxidants, BHA: 2-&3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisol, BHT: 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene, TBHQ: *tert*-butylhydroquinone, PG: propyl gallate, PTG: pentyl gallate, OG: octyl gallate, were extracted from fatty foods with hexane and from hexane layer to presaturated acetonitrile with hexane. The polar phenolic hydroxyl groups of antioxidants were silylated with MSTFA and injected to Gas Chromatography/Mass Spectrometry. The calibration plots were linear in the investigated range, 0.1~10.0 μg/g. The limit of detection for 6 phenolic antioxidants was 0.1 μg/g. Recoveries and reproducibilities from samples fortified at 1.0 μg/g were in the range of 70~90% and 0.5~13%, respectively. The simultaneous determination of phenolic antioxidants in fatty foods using GC/MS-SIM mode and macro program was described.

Key words □ Antioxidant, Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Fatty Food, BHA, BHT, TBHQ, OG, PG, PTG

Phenolic antioxidants(BHA: 2-&3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisol, BHT: 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene, TBHQ: *tert*-butylhydroquinone, PG: propyl gallate, PTG: pentyl gallate, OG: octyl gallate, Fig. 1에 도식화 하였다.) 등은 fats와 fatty foods의 저장, 제조, 포장 등에 첨가되는 산화방지제로 쓰이고 있다. 식품의 변패원인 중의 하나는 식품 중 지방 및 기타 다른 성분들과 공기중의 산소와의 산화반응으로서 가공식품에서 특히 문제가 되고 있다. 유지의 산화는 유지 분자자체의 파괴만으로 그치는 것이 아니라 산화반응 중에 생성되는 반응성이 큰 중간체들에 의하여 식품중의 다른성분들이 파괴되기 때문에 fats와 fatty food에 산화방지제를 첨가하고 있다. 이러한 산화방지제들은 동물실험에서 독성이 낮은 것으로 알려져 왔다. 그러나 BHT와 같은 식용 산화방지제는 "International Agency for Research on Cancer"의 1986년 보고에 의하면 동물에게서 경우에 따라서 발암 가능성을 나타내고 있다고 보고하면서 간암 유발 가능성을 나타내었다.[1-3] Phenolic antioxidants들의 첨가량은 단독으로 또는 combination되어 식품내에 fat 또는 oil 총함량의 0.02% 이내로 제한되고 있다.[4]

식품내에서의 산화방지제의 분석은 1967년 McCaulley 등의 보고에 의하면 fat 및 fatty foods 내에서 vacuum sublimation method로 산화방지제를 추출한 후 GC로 확인하였으며,[5] 그 후로 Page의 보고에 의하면 휘발성이 큰 BHA, BHT, TBHQ는 직접 시료를 dilution시켜 GC로 분석하였으며, 휘발성이 적고 극성이 큰 gallates류의 분석은 액체-액체 추출법 또는 증류장치로 추출한 후 농축 및 유도체화반응을 시켜 GC로 검출하였다.[6,7] 최근에는 액체-액체 추출법이 일반화 되어있으며 식품내에서 추출된 산화방지제의 검출방법으로는 GC, LC/UV, IR 등 다양한 검출기에 의해서 분석되어져 왔다.

본 연구에서는 핵산으로 fat 또는 oil 성분을 충분히 녹인 후 fat 또는 oil 성분으로부터 아세토니트릴로 추출한 후, 극

† Author to whom correspondence should be addressed.

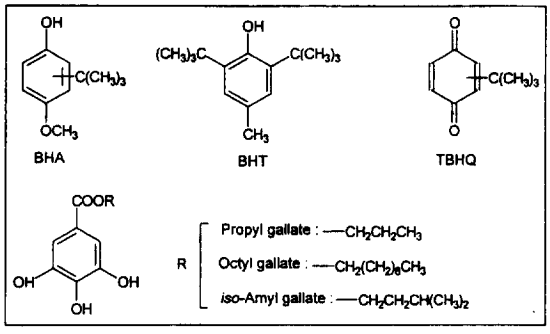

Fig. 1. Chemical structure of phenolic antioxidants.

성이 큰 phenolic antioxidants의 히드록시기를 MSTFA로 silylation 시켜 비극성화시킨 후 GC/MS로 phenolic antioxidants를 동시에 검출 및 확인하였다.

재료 및 방법

분석기기 및 장비

분석기기로는 Hewlett Packard(HP) 5890 series II plus Gas Chromatograph(GC)에 direct interface로 연결된 HP 5972 Mass Selective Detector(MSD)를 사용하였고, 모든 시료는 HP 7673 Autoinjector를 이용하여 GC에 주입하였다. System의 control과 data editing으로는 HP Vetra 486 personal computer에 HP G1034C MS ChemStation을 사용하였고, 크로마토그람과 질량스펙트럼은 HP Laser Jet4 plus Printer로부터 얻었다. 분리관은 cross-linked 5% phenylmethylsilicone(HP-5)으로서 내부코팅된 유리모세분리관으로 길이 17 m, 내경 0.2 mm, film thickness 0.33 μm였으며, GC/MS 작동조건은 Table 1에 실었다.

시료를 추출하기 위하여 사용된 homogenizer는 Model 17105 Omni-mixer(미국)를 사용하였고, 여과지로는 shark-skin filter paper를 사용하였다. 증발농축장치로는 Büchi Rotavapor R-114를 사용하였으며, 유도체화과정에서 반응

Table 1. GC/MS operating conditions

Parameter	Condition
Injector Temperature	280°C
Transfer line Temperature	300°C
Column Temperature	
Initial Temperature	100°C
Ramp Temperature	20 °C/min.
Final Temperature	300°C for 4 min.
Carrier gas (He)	0.87 ml/min. at 100°C
Rum Time	14 min.

용액의 온도는 Bielefeld-14(Geber Liebish, 독일)의 heating block으로 조절하였다. 추출에 쓰이는 초자기구로는 Masonjar, 뚜껑이 있는 15 m*l* 시험관과 250 m*l* separate funnel을 사용하였다.

시 약

실험에 쓰이는 용매는 모두 분석용 특급(Burdick & Jackson, Co., 미국)으로 핵산 또는 펜탄, 아세토니트릴을 이용하였으며, 특히 추출 용매로 쓰이는 아세토니트릴은 핵산 또는 펜탄에 완전히 포화 시킨 후 사용하였다. 무수황산나트륨은 분석용 특급시약(J. T. Baker, Co.)으로 300°C에서 12시간 이상 건조 시켜 사용하였다. Silylation 유도체화 시약으로 쓰이는 MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide)와 trifluoroacetic acid는 Sigma Aldrich Co.(미국)로부터 구입하였으며, 그 밖의 시약인 methylorange는 E. Merck Co.(독일)로부터 구입하였다. GC insert liner의 충진물로는 Serva Co.(독일)의 silanized glass beads(125~200 μ, 80~120 mesh)를 사용하였고, GC/MS에 운반 가스로 쓰이는 헬륨은 순도 99.999%로서 Union Carbide Co.(미국)을 사용하였다.

표준용액

표준 물질로 사용된 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate), PTG(pentyl gallate), OG(octyl gallate), 그리고 TBHQ(*t*-butyl hyroxyquinone)와 내부표준물질인 *n*-propyl-*p*-hydroxybenzoate 등은 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하였으며, 각각의 표준 용액은 isopropyl alcohol과 acetonitrile의 비율이 1:1이 되도록 혼합한 용액에 녹여 1,000 μg/m*l*이 되도록 만들었으며, 필요에 따라서 묽혀서 사용하였다.

시 료

실험에 쓰인 시료로는 식용류, 버터류, 마아가린류, 어패건제품, 어패냉동품등 fats or fatty foods을 함유한 식품을 국내에서 시판되고 있는 제품을 구입하였다.

실험방법

시료 10 g을 정확히 달아 1*l* Masonjar에 넣은 후 무수황산나트륨 약 2~3 g을 첨가시킨다. 50 m*l* 핵산 또는 펜탄을 첨가시킨 후 homogenizer를 이용하여 2500 rpm에서 3분간 추출한 후 shark-skin filter paper로 여과시켜 250 m*l* 분액깔대기에 옮긴다. 핵산 또는 펜탄으로 포화 시킨 아세토니트릴용액 100 m*l*로 추출한다. 두 유기층이 분리될 때까지 상온에 방치시킨 후 아세토니트릴층을 모은다. 이 추출 용

액을 fat 또는 oil 성분을 제거하기 위하여 -20°C 이하에 보관한 후, 이 여액 10 m*l*를 피펫으로 취하여 마개가 있는 15 m*l* 시험관에 옮긴다. 내부표준물질인 *n*-propyl-*p*-hydroxybenzoate를 시료내의 농도가 1 ppm이 되도록 첨가시키고, 수조의 온도를 40°C로 유지시키면서 Rotary Evaporator로 추출 용매를 완전히 날려보낸다. 여분의 수분을 완전히 제거시키기 위해서 P_2O_5/KOH가 들어 있는 vacuum desiccator에 보관한다. 완전히 건조된 잔류물에 50 μ*l* mixture 용액(200 ppm methylorange in CH_3CN/CF_3COOH; 6:4)을 첨가하여 잔류물을 다시 녹인 후 MSTFA 70 μ*l*을 가하면 붉은색의 용액이 노랑색으로 변한다. 이 반응 용액을 80°C heating block에서 5분간 반응시킨다. 이때 반응 용액의 색깔이 붉은 색으로 변했을 경우 silylation 상태를 안정화되도록 다시 MSTFA 10 m*l*를 첨가하여야 한다.[8,9] 이 결과의 반응 용액 2 μ*l*을 GC/MS에 주입하여 분석하였다.

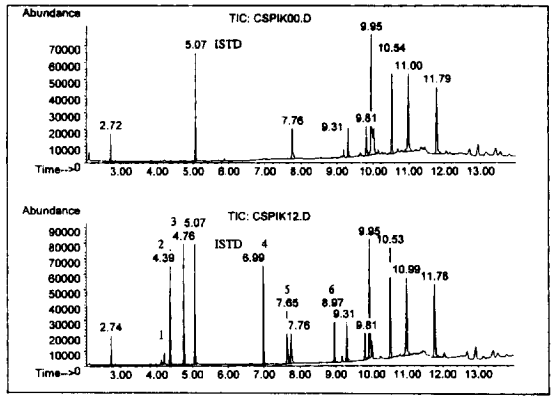

Fig. 2. Total ion chromatogram of blank soybean oil (upper) and antioxidant-spiked in soybean oil (below). 1. BHT (4.16 min.), 2. BHA (4.39 min.), 3. TBHQ (4.76 min.), 4. PG (6.99 min.), 5. PTG (7.65 min.), 6. OG(8.97 min.) and ISTD(5.07 min.).

결과 및 고찰

GC/MS를 이용한 분석

Fig. 2은 산화방지제가 포함되어있지 않은 식용류에 대한 크로마토그람과 식용류에 산화방지제 표준물질들을 각각 1 ppm이 되도록 첨가시켜 얻은 크로마토그람이다. 7분 이후의 머무름시간에 나타난 peak들은 식용류에 함유된 fatty acid류들이며 실제시료 분석시 산화방지제 표준물질들과는 분리가 잘 됨을 보여준다. BHT의 경우 *tert*-butyl기가 2- 또

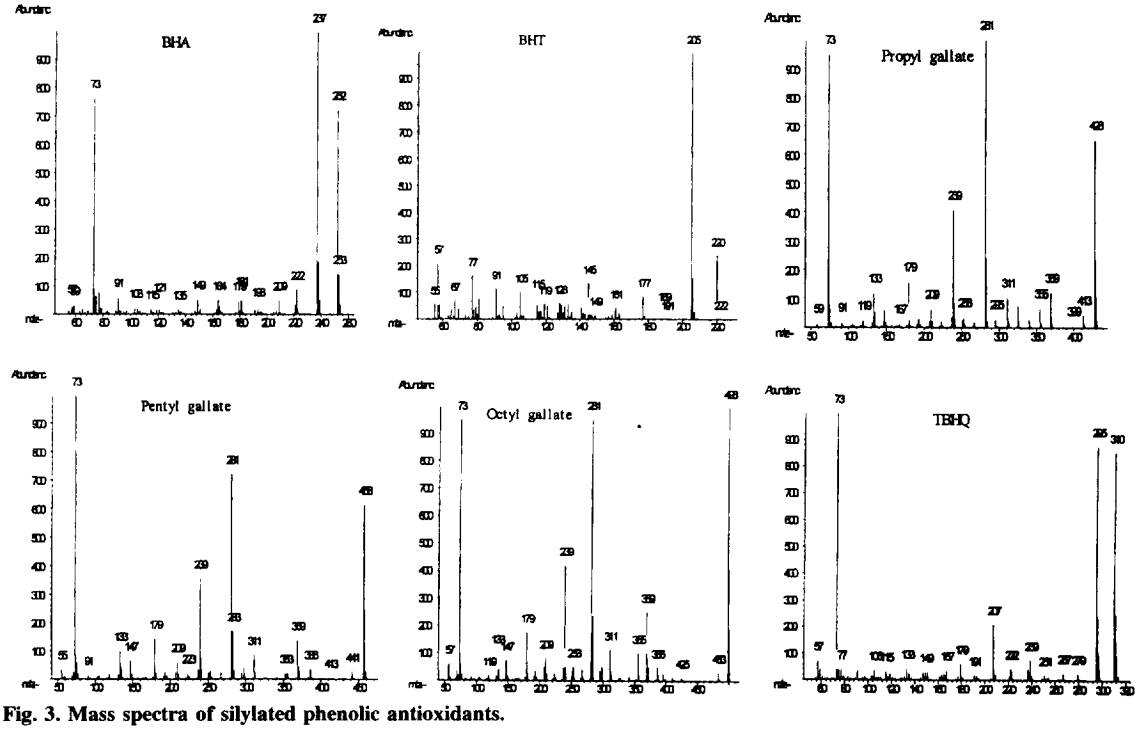

Fig. 3. Mass spectra of silylated phenolic antioxidants.

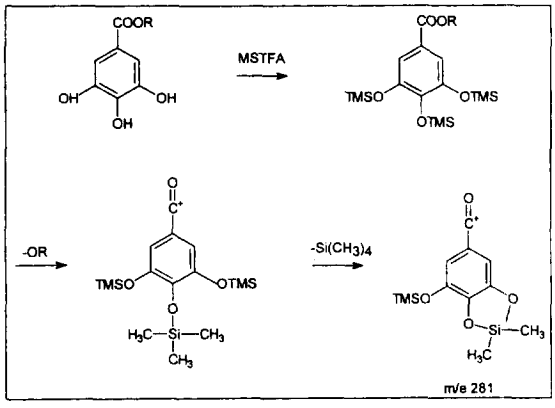

Fig. 4. Mass fragmentation pattern of silylated gallates.

Table 2. Characteristic ions of silylated phenolic antioxidants

Name	Retention time (min.)	Characteristic ions (m/e)
BHT	4.16	205, 220 (M^+)
BHA	4.39	237, 252 (M^+)
TBHQ	4.76	295, 310 (M^+)
PG	6.99	281, 428 (M^+)
PTG	7.65	281, 456 (M^+)
OG	8.97	281, 498 (M^+)
ISTD	5.07	193, 252 (M^+)

는 3-위치에 있는 두 이성질체의 혼합물로서 동일한 mass spectrum을 나타내었고 retention time이 0.1 min 정도의 차이를 나타내고 있다.

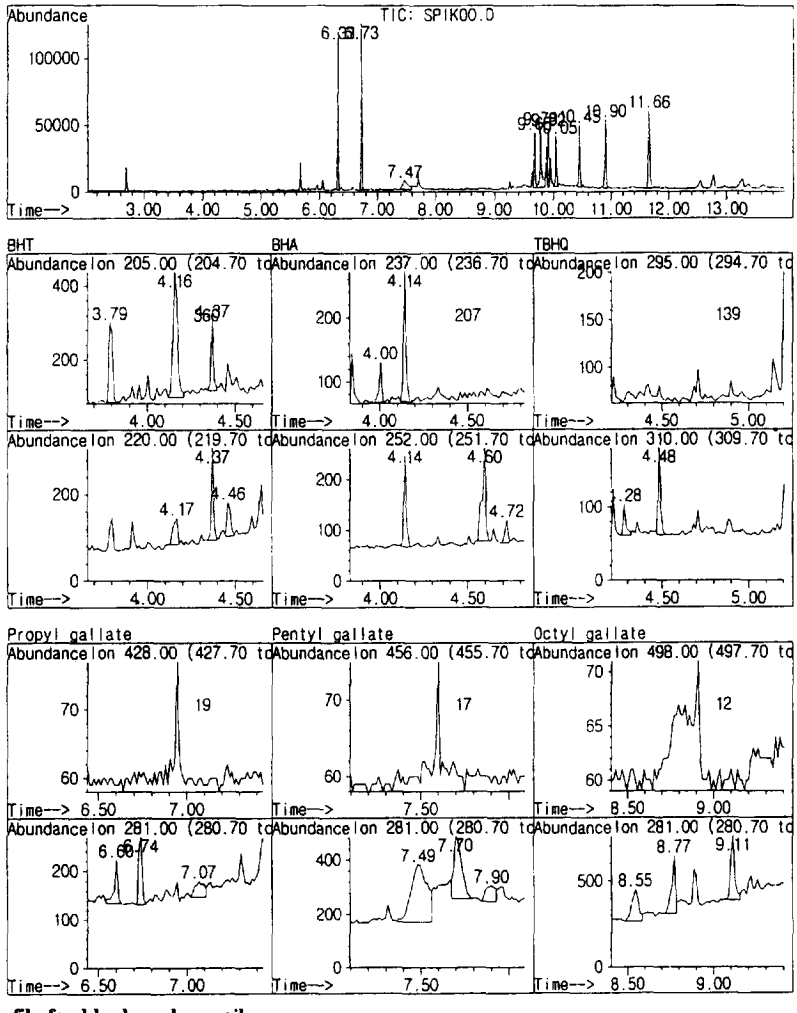

Fig. 5. Screening profile for blank soybean oil.

Phenolic antioxidants는 극성이 큰 히드록시기를 띤 잔기가 많으므로 GC/MS에 대하여 감도가 낮고 크로마토그람상에서 피이크의 꼬리끌림 현상을 나타내기 때문에 silylation 유도체화 시약으로 히드록시기를 유도체화 시켜 잔기를 비극성화 한 후 Selected Ion Monitoring (SIM) mode를 이용하여 GC/MS로 분석하였다.

유도체화반응

Fig. 3은 phenolic antioxidants류의 mass spectrum이다. BHT는 히드록시기옆에 bulky한 *t*-butyl기의 입체장애효과 때문에 히드록시기에 유도체화 반응이 일어나지 않았다. BHT의 molecular ion인 m/e=220(M^+), molecular ion에서 methyl기가 fragment된 m/e=205(M^+ - 15) 그리고 163, 145 등의 mass spectrum을 나타내고 있다. BHA는 히드록시기에 silylation되어 m/e=252(M^+), 237(M^+ - 15), 222, 그리고 209 등의 mass spectrum을 나타내고 있다. Gallates류인 PG, PTG, OG 등은 분자이온에서 alkoxy기가 fragment된 후 이웃하고 있는 trimethylsilyl기와 cyclization되면서 $Si(CH_3)_4$가 fragment된 m/e 281이 공통적인 특정이온 피이크로 나타난다. 또한 분자이온과 분자량에서 methyl기가 fragment된 (M^+ - 15)와 alkoxy기가 fragment된 (M^+ - OR) 등이 특정이온으로 나타나고 있다. 다음의 Fig. 4에 gallate류의 fragmentation pattern을 도식화하였다.

식품내에 잔류되어 있는 산화방지제를 GC/MS-SIM mode로 분석하기 위하여 다음 Table 2와 같이 각 산화방지제의 base peak ion과 molecular ion 등을 선택하였고, 6가

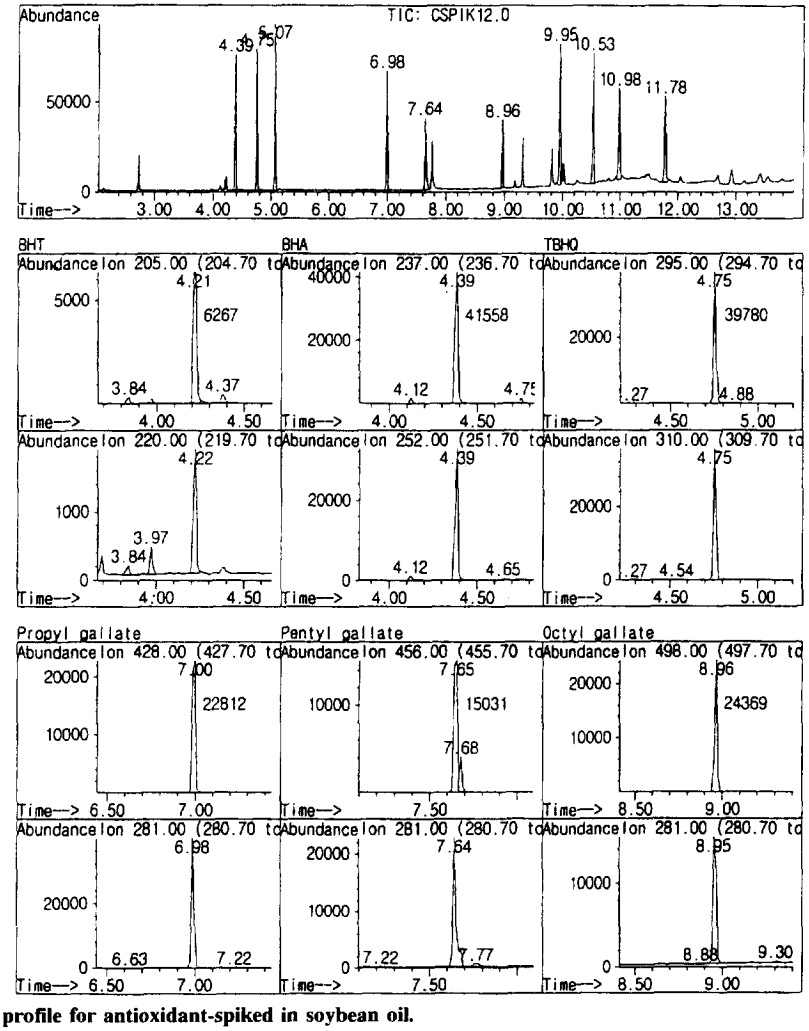

Fig. 6. Screening profile for antioxidant-spiked in soybean oil.

Table 3. Calibration of phenolic antioxidants

Name	Calibration curve	Correlation coefficient (r^2)
BHT	$y=2.13\times10^{-1}x+2.12\times10^{-3}$	0.992
BHA	$y=8.60\times10^{-1}x+7.93\times10^{-2}$	1.000
TBHQ	$y=7.60\times10^{-1}x-1.69\times10^{-1}$	0.981
PG	$y=8.50\times10^{-1}x-3.20\times10^{-1}$	0.985
PTG	$y=8.50\times10^{-1}x-2.78\times10^{-1}$	0.983
OG	$y=6.03\times10^{-1}x-1.93\times10^{-1}$	0.992

지 산화방지제의 검출 및 그 잔류량을 동시에 확인할 수 있는 macro program을 도입하여 분석한 결과들은 Fig. 5와 6에 나타내었다. Fig. 5는 산화방지제가 첨가되어 있지 않는 시료에 대한 screening profile이며 Fig. 6는 산화방지제를 첨가시켜 얻은 시료에 대한 screening profile이다.

검량곡선작성

Phenolic antioxidants가 없는 식용유에 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0, 그리고 10.0 μg/g이 되도록 phenolic antioxidants 표준시료를 첨가시켜 얻은 검량곡선식은 다음 Table 3과 같다. 각각 표준시료들의 직선성은 r^2=0.98~1로 좋은 직선성을 보여주고 있다. 이때의 검출한계(Limit of Detection)는 모두 0.1 μg/g이다.

Table 4. Recovery of phenolic antioxidants

Name	Recovery RSD (%) (n=3)
BHT	70.6±0.5
BHA	92.1±8.8
TBHQ	82.1±7.1
PG	76.3±10.4
PTG	73.3±13.1
OG	92.0±.57

위에서 작성된 검량 곡선식으로부터 얻은 회수율은 Table 4에 나타내었다. 회수율과 상대표준편차는 각각 70~92%와 0.5~13% 정도로서 비교적 좋은 회수율과 정밀도를 나타낸다. BHT 같은 경우 다른 산화방지제들에 비해서 lipid material로부터 분리하기 어려운 점이 있기 때문에[6] 회수율이 상대적으로 낮았다.

이상의 분석 결과로서 fatty food의 산화방지제로 쓰이고 있는 BHT, BHA, TBHQ, PG, PTG, 그리고 OG 등의 phenolic antioxidants들을 GC/MS-SIM mode와 macro program을 이용하여 동시에 정성 및 정량 할 수 있는 방법을 확립하였다.

국문요약

식품내 함유된 phenolic antioxidants를 핵산으로 포화된 아세토니트릴로 추출시킨 후 극성이 큰 히드록시기를 MSTFA로 silylation시켜 비극성화 시킨 후 GC/MS-SIM mode를 이용하여 동시에 정성 및 정량 할 수 있는 방법을 확립하였다. 시료내의 농도가 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 그리고 10 μg/g이 되도록 첨가시켜 얻은 검량곡선식은 r^2=0.98 이상으로 모두 좋은 직선성을 나타낸다. 시료내의 농도가 1.0 μg/g이 되도록 첨가시켜 얻은 회수율과 상대표준편차는 각각 70~90%와 0.5~13%로서 비교적 좋은 회수율과 정밀도를 나타낸다. 이때의 검출한계는 0.1 μg/g이다. 또한 macro program을 이용하여 6가지의 산화방지제를 동시에 분석할 수 있는 방법을 확립하였다.

참고문헌

1. International Agency for Research on Cancer (1986) "IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human", Vol. 40, "Butylated Hydroxytoluene", IARC, Lyon, France, pp. 161-206.
2. E. Lok, R. Metta, P. Jee, G. Laver, E. A. Nera, E. McMullen, and D. B. Clayson: The effect of butylated hydroxytoluene on the growth of enzyme-altered foci in male Fischer 344 rat liver tissue, *Carcinogenesis*, **16**, 1071-1078 (1995).
3. K. Kashfi, E. K. Yang, J. R. Chowdhury, N. R. Chowdury, and A. J. Dannenberg: Regulation of Uridine diphosphate glucuronosyltransferase expression by phenolic antioxidants, *Cancer Res.*, **54**, 5856-5859 (1994).
4. U. S. Food and Drug Administration, "Food Additive Analytical Manual", Vol. II. Association of Official Analytical Chemists, VA, USA, pp. 139-177 (1987).
5. D. F. McCalley, T. Fazio, J. W. Howard, F. Di Ciurcio, and J. Ives, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**, 243-250 (1967).

6. B. D. Page: High performance liquid chromatographic determination of nine phenolic antioxidants in oils, lards, and shortenings, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1239-1246 (1979).
7. B. D. Page: Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76**, 765-779 (1993).
8. M. Donike: N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide, a new silylating agent for amide, *J. Chromatogr.*, **42**, 103-104 (1969).
9. D. R. Knapp, "Handbook of Analytical Derivatization Reactions", Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York (1979).