J. Fd Hyg. Safety 10(4), 239 - 247(1995)

GC/MS 를 이용한 식품중 Saccharin의 분석에 관한 연구

*노동석 · 김승기 · 이정애 · 정현숙 · 유보경 · 박종세
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터 서울 청량사서함 131

GC/MS Analysis of Saccharin in Foods

***Dong-Seok Lho, Seung-Ki Kim, Jeong-Ae Lee, Hyeon-Sook Jeung, Bo-Kyong Yoo, and Jongsei Park**
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131 Cheongryang, Seoul

ABSTRACT — Analytical method for saccharin in foods was developed using gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS). Methylation with diazomethane, acetylation with MBTFA, and silylation with MSTFA and MTBSTFA were compared. Methylation of saccharin produced N- methylated saccharin as the major product and O-methylated saccharin as the minor one. Silylation of saccharin with MSTFA and MTBSTFA resulted in the formation of the corresponding *O*-silylated products, respectively. The derivatization of saccharin was optimized with MSTFA. The ions at m/z 240, 255, and 166 were monitored to characterize saccharin.

Key words □ saccharin, analysis, food, GC/MS, methylation, silylation

가공식품에 사용되는 인공감미료로서 saccharin은 아직도 일부 식품 즉 식빵, 이유식, 백설탕, 포도당, 알사탕류, 물엿 및 벌꿀에는 사용이 금지되어 있다. 그러므로 saccharin의 분석방법에 대해서 많은 보고가 되어 있다. 지금까지 보고된 saccharin의 분석방법으로는 식품시료를 celite와 혼합하여 chromatographic column으로 정제한 후 differential pulse polarographic method[1]와 spectrophotometric method[2-4]에 의해서 분석한 보고들이 있고, soft drink나 beverage에 들어 있는 saccharin은 thin-layer chromatography(TLC)로 먼저 분리한 후 spectrophotometer[5,6]를 이용하여 분석하였지만, 대부분은 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였다. 동물시료, 폐수, 뇨등에 존재하는 saccharin은 XAD-2 column이나 silica gel column으로 추출한 후 HPLC[7]로 분석하였고, soft drink, beverage, yogurt, diary, bakery, dessert 등에 들어 있는 saccharin은 liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, dialysis 방법등으로 추출하여 sorbic acid와 benzoic acid 유도체등과 같은 식품보존료와 함께 HPLC[8-22]를 이용하여 동시에 분석하였다. Gas chromatography(GC)를 이용한 분석방법으로는 HPLC 방법처럼 많은 보고는 없지만 saccharin의 plasma kinetics와 urinary elimination에 관한 연구를 하기 위하여 biological fluids에 존재하는 saccharin을 methylation 혹은 ethylation시켜 GC/FID(flame-ionization detector)[23-34]와 GC/MS (mass spectrometer)[24]로 분석한 보고가 있을 뿐이다. 그러므로 본 연구에서는 saccharin에 대한 acetylation 혹은 silylation 반응을 시도하여 정량적으로 유도체화 시킬수 있는 최적조건을 찾아내어 GC/MS를 이용한 분석방법을 연구하고, 또한 saccharin 유도체들의 질량스펙트럼을 비교, 분석하고자 한다.

* To whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

표준물질인 saccharin과 saccharin sodium salt는 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하였다. Hydrochloric acid와 sodium chloride는 Fluka Co. (일본), ethylacetate, acetonitrile 및 ethanol은 Fisher Scientific Co.(미국)으로부터 HPLC grade를 구입하였다. 유도체화 시약인 *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide(MSTFA),[25,26] *N*-methyl-bis-trifluoroacetamide(MBTFA),[27,28] *N*-methyl-*N*-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide(MTBSTFA),[29-30]는 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하였다. 추출과정에서 사용한 투석막 튜브(dialysis membrane)는 직경 16 mm, 두께 0.0203 mm로서 Union Carbid Corporation(제조원 미국), 그리고

phase separation을 위하여 사용한 silicone treated filter paper는 Whatman Limited(영국)으로부터 구입하였다. 분석기기는 Hewlett-Packard(HP) 5890A Gas Chromatograph Series II (GC)와 연결된 HP 5970B Mass Selective Detector(MSD), HP 59940C MS Chemstation, HP 7958B disc drive 및 HP 2235D Ruggedwriter printer를 사용하였고, 분리관은 cross-linked 5% phenylmethylsilicone으로서 내부코팅된 유리모세분리관 (HP SE-54) 으로 길이 17 m, 내경 0.2 mm, 두께 0.33 um 였으며, GC/MS 작동조건은 Table 1에 실었다.

추출방법

추출방법은 시료 10 g(고체시료는 잘게 짜른다)을 무게를 달아 비이커에 넣고 0.1 N HCl 용액 10 ml 를 가하여 혼합한 후 dialysis membrane 으로 옮겨 상부를 실로 새지 않게 묶은 후 100 ml 메스실린더에 넣고 0.1 N HCl 용액으로 전체 부피가 100 ml 가 되도록 채운다. 15~24시간 (overnight)동안 투석시킨 후, NaCl 20 g 이 들어 있는 250 ml 분액 깔데기에 투석된 바깥쪽 용액 50 ml와 ethylacetate 50 ml를 각각 넣고 10분동안 진탕하고 2회 추출한다. Ethylacetate 층은 포화 NaCl 용액 5 ml로 세척하고 ethylacetate에 녹아 있는 물을 제거하기 위하여 silicon-treated filter paper를 사용하여 여과한 용액을 직접 증발 flask 에 받아서 감압 건조시킨후 ethanol 5 ml에 녹여 보관한다.

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)	0.89 ml/min. at 100 °C
Run time	14 min.

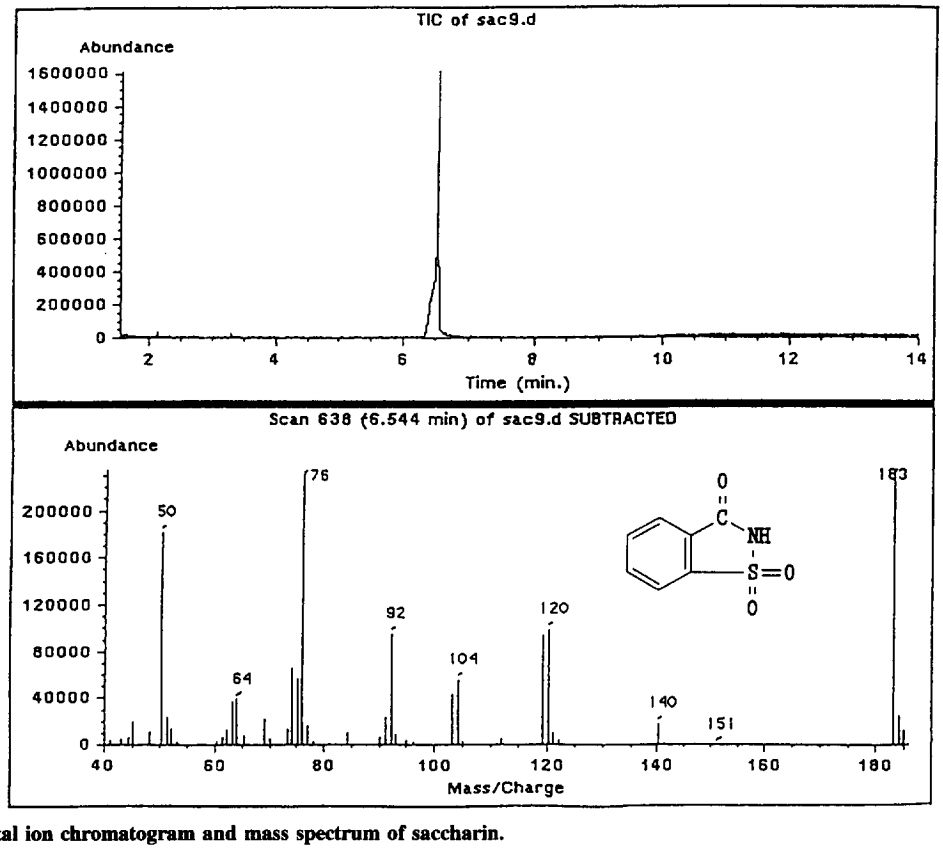


Fig. 1. Total ion chromatogram and mass spectrum of saccharin.

유도체화반응

Saccharin 의 methylation — 5 m*l* ethanol 용액중 2 m*l*를 취하여 완전히 감압건조시킨후 미리 준비된 etheral diazomethane 용액을 노란색이 나타날 때까지 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 반응시켜 다시 감압건조시킨후 500 u*l* acetone에 녹여 GC/MS로 분석한다. 이때 기기분석 조건은 Table 1과 같다.

Saccharin 의 acetylation — 5 m*l* ethanol 용액중 2 m*l*를 취하여 완전히 건조시켜 MBTFA 100 u*l*를 첨가하고 80℃에서 20분동안 반응시킨후 GC/MS로 분석한다.

Saccharin 의 silylation

(1) *t*-Butyldimethylsilylation

5 m*l* ethanol 용액중 2 m*l*를 취하여 완전히 건조시켜 acetonitrile 100 u*l* 로 녹인후 MTBSTFA 100 u*l*를 첨가하여

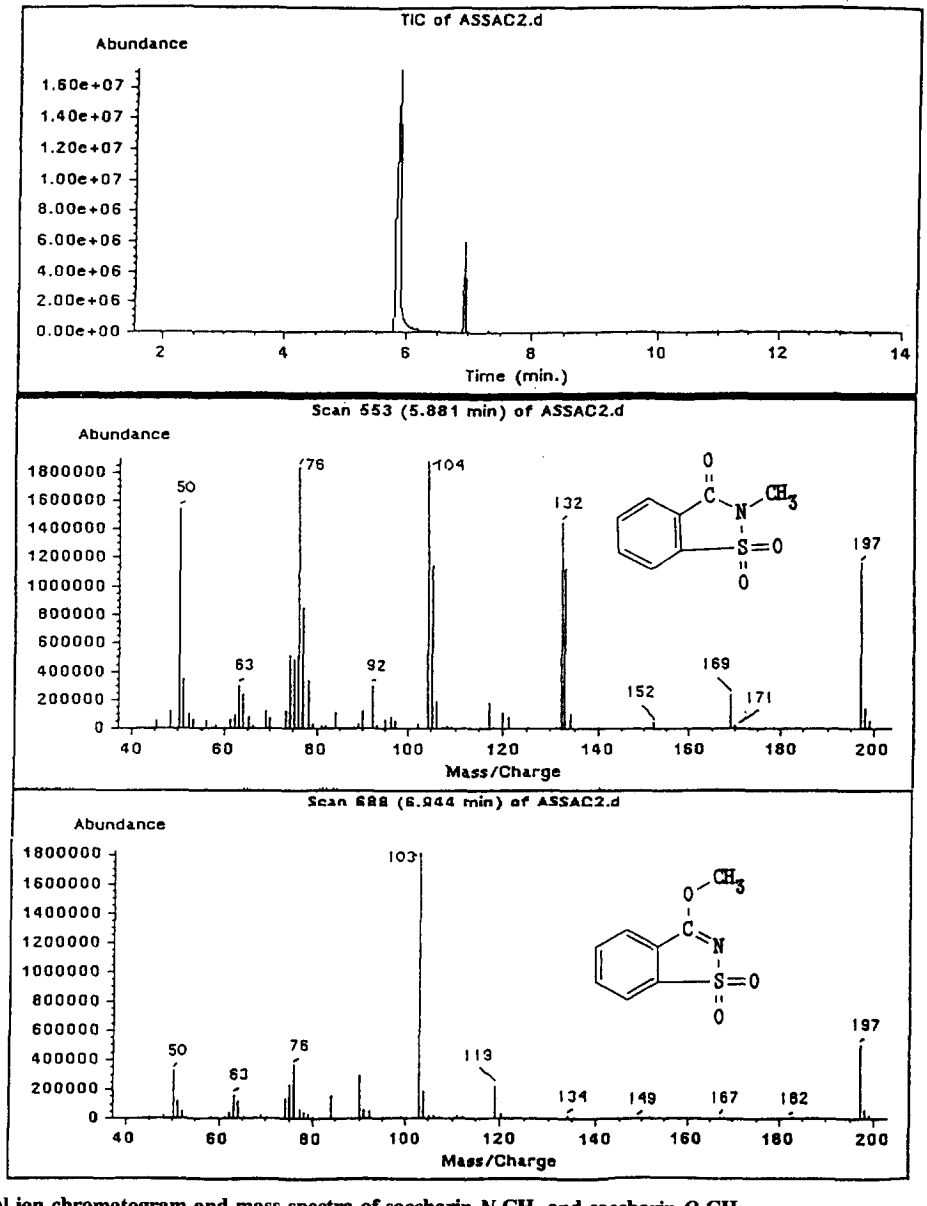


Fig. 2. Total ion chromatogram and mass spectra of saccharin-*N*-CH_3 and saccharin-*O*-CH_3.

80 °C에서 10분동안 유도체화 반응을 시킨다. 반응용액을 실온으로 식힌후 2 ul를 GC/MS 에 주입하여 분석한다. 이때 GC/MS 작동조건은 Table 1과 같다. (1) Trimethylsilylation

5 ml ethanol 용액중 2 ml 를 취하여 완전히 건조시켜 ethylacetate 100 ul에 녹인후 MSTFA 100 ul를 첨가하여 100 °C 에서 20분동안 유도체화 반응을 시켜 GC/MS로 분석한다.

결과 및 고찰

Saccharin은 비교적 극성이 큰 sulfonamide group을 포함하고 있기 때문에 GC 분리관의 벽(column walls)이나 고체지지체 (solid support)의 활성표면에 흡착이 일어나 Fig. 1에서 나타난것 처럼 피이크 모양이 비대칭적인 형태를 가지고 있다. 이와같이 비대칭적인 피이크의 모양은 분석상의 오차를 유발할 뿐 아니라 detectability 에 문제점이 있기 때문에 일반적으로 화합물의 극성을 감소시키기 위하여 유도체화 과정을 거쳐 GC로 분석한다.

Methylation—유도체화 방법 중 methylation은 diazomethane을 사용하여 saccharin을 methylation시킨 결과 Fig. 2에서 나타난 것처럼 두 개의 반응 생성물 즉 *N*-methylated saccharin과 amide group의 enolization에 의한 *O*-methylated saccharin이 얻어졌다. 주생성물인 N-methylated saccharin은 크로마토그램상에서 5.881 min. 의 머무름시간을 나타냈고, 질량스펙트럼을 살펴보면 molecular ion peak(M^+)인 m/z 197과 McLafferty rearrangement의 결과로 생성된 m/z 169(M^+- NCH_2), 132(M^+- SO2H), 104(M^+- NCH_2- SO_2H, base peak) 등의 특징이온들을 나타내고 있다. *O*-Methylated saccharin은 머무름시간이 6.944 min. 이고 질량스펙트럼에서는 *N*-methylated saccharin과는 전혀 다른 fragmentation pattern을 보였는데, *N*-methylated saccharin과 똑같은 m/z 197의 molecular ion (M^+)을 나타냈지만, base peak로서 m/z 103(M^+- OCH_2- SO_2)의 특징적인 이온들을 나타냈다. 이와같이 diazomethane에 의한 saccharin의 methylation 반응은 amide form의 *N*-methylation과 enol form의 *O*-methylation

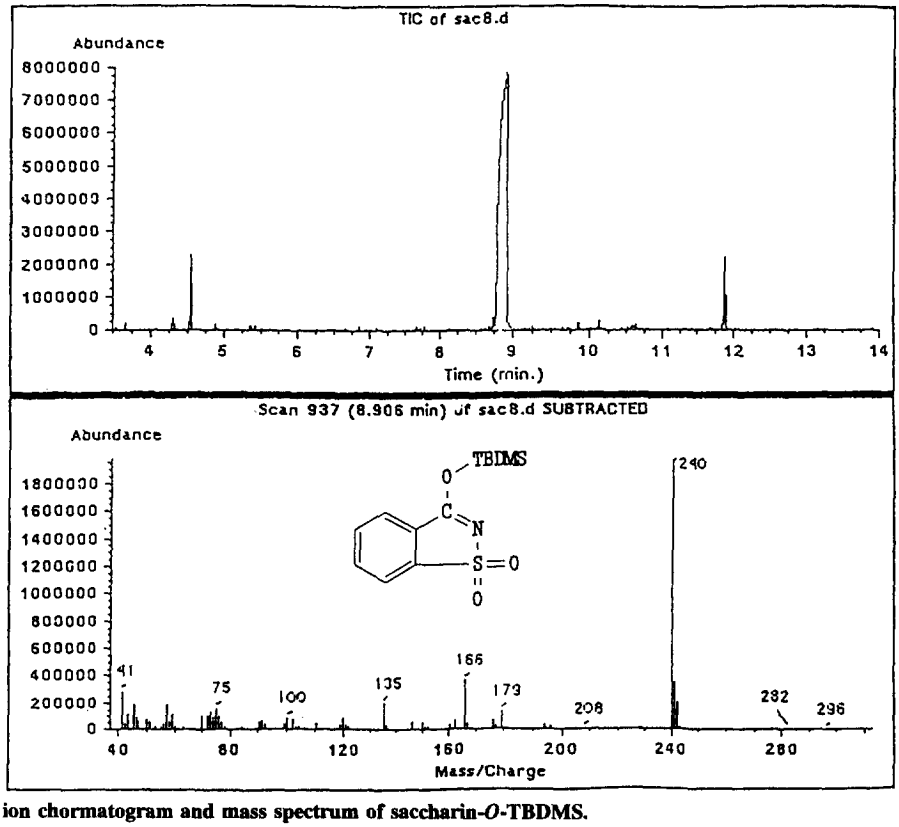
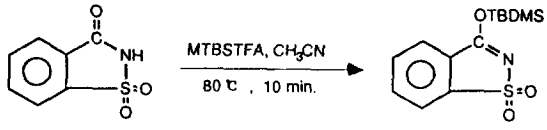


Fig. 3. Total ion chormatogram and mass spectrum of saccharin-*O*-TBDMS.

이 경쟁적으로 일어나 두 개의 생성물을 형성하므로 정량분석방법으로는 적합한 유도체화 반응이 되지 못하였다. Saccharin과 같이 sulfonamide group을 가지고 있는 tolbutamide나 chlorpropamide와 같은 sulfonylurea drug들도 diazomethane에 의한 methylation 반응에서 5~7%의 *O*-methylated product 들이 부생성물로서 생성된다고 보고[32-34]되어 있다.

Silylation

(1) *t*-Butyldimethylsilylation



Diazomethane에 의한 saccharin의 methylation 반응에서는 두가지 화합물이 생성되었지만 MTBSTFA 에 의한 *t*-butyldimethylsilylation 반응은 Fig. 3에서 나타난것 처럼 하나의 화합물을 생성하였다. 이 반응 생성물의 질량스펙트럼을 살펴보면 molecular ion(M^+) 피이크가 m/z 297이고, m/z 282(M^+-15)은 molecular ion 에서 *t*-butyldimethylsilylation (TBDMS) group의 methyl group이 떨어져서 생성된 피이크이며, 그리고 m/z 240(M^+-57)은 TBDMS의 *t*-butyl group이 떨어져서 생긴 특징적인 피이크로서 이 유도체의 base peak 이다. 또다른 특징적인 피이크는 m/z 166(M^+-131)인데 이것은 molecular ion에서 *O*-TBDMS group이 떨어져서 생성된 이온으로서 saccharin-*O*-TBDMS 유도체에서만 나타날수 있는 특징적인 피이크라고 할 수 있다. 그러므로 saccharin의 *t*-butyldimethylsilylation 반응에서는 이 화합물의 enolization에 의해서 생성된 saccharin-*O*-TBDMS가 정량적으로 생성됨을 알 수 있었다.

일반적으로 diazomethane에 의한 sulfonamide의 methylation은 치환기인 methyl group의 크기가 비교적 작기 때문에 질소원자에 인접해 있는 functional group 즉 sulfonyl group의 크기에 관계 없이 steric hindrance를 받지 않을 뿐 아니라 또한 diazomethane의 큰 반응성 때문에 *N*-methylation이 주 반응으로 일어난다. 그러나 치환기의 크기가 methyl group 보다 훨씬 큰 TBDMS group이 sulfonamide의

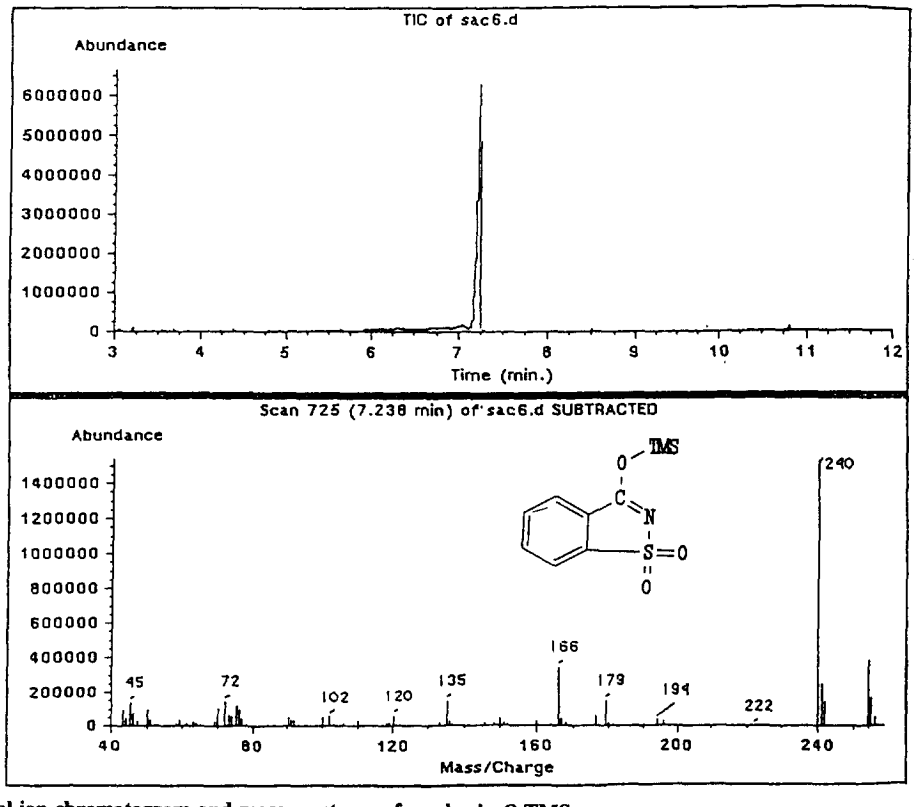


Fig. 4. Total ion chromatogram and mass spectrum of saccharin-*O*-TMS.

질소원자에서 치환반응을 하기 위해서는 상당한 steric hindrance를 받기 때문에 *O*-*t*-butyldimethylsilylation 반응만 일어난다. 또한 *O*-TBDMS 의 silicon-oxygen 결합은 (p → d) π back-bonding[35,36]에 의한 결합을 하고 있기 때문에 *N*-TBDMS 의 silicon-nitrogen 결합보다 강한 결합을 하고 있어 비교적 안정한 *O*-silyl ether 를 형성하고 있다. 이러한 사실은 역시 saccharin-*O*-TBDMS의 정량적인 생성을 뒷받침해 주고 있다.

(2) Trimethylsilylation

Saccharin 의 sulfonamide group 에 대한 유도체화 반응의 steric hindrance 영향을 확인하기 위하여 치환기의 크기가 methyl group 보다는 크고 TBDMS group 보다는 작은 trimethylsilyl(TMS) group 으로 치환시킬수 있는 유도체화

Table 2. Characteristic ions of saccharin derivatives.

Saccharin Derivative	Retetion Time (min.)	Characteristic Ion (m/z)		
Saccharin-*N*-CH_3	5.881	197(M^+)	169	132	104
Saccharin-*O*-CH_3	6.944	197(M^+)	119	103	
Saccharin-*O*-TBDMS	8.906	297(M^+)*	240	179	166
Saccharin-*O*-TMS	7.238	255(M^+)	240	179	166

* 실제 질량스펙트럼에서는 나타나지 않았음.

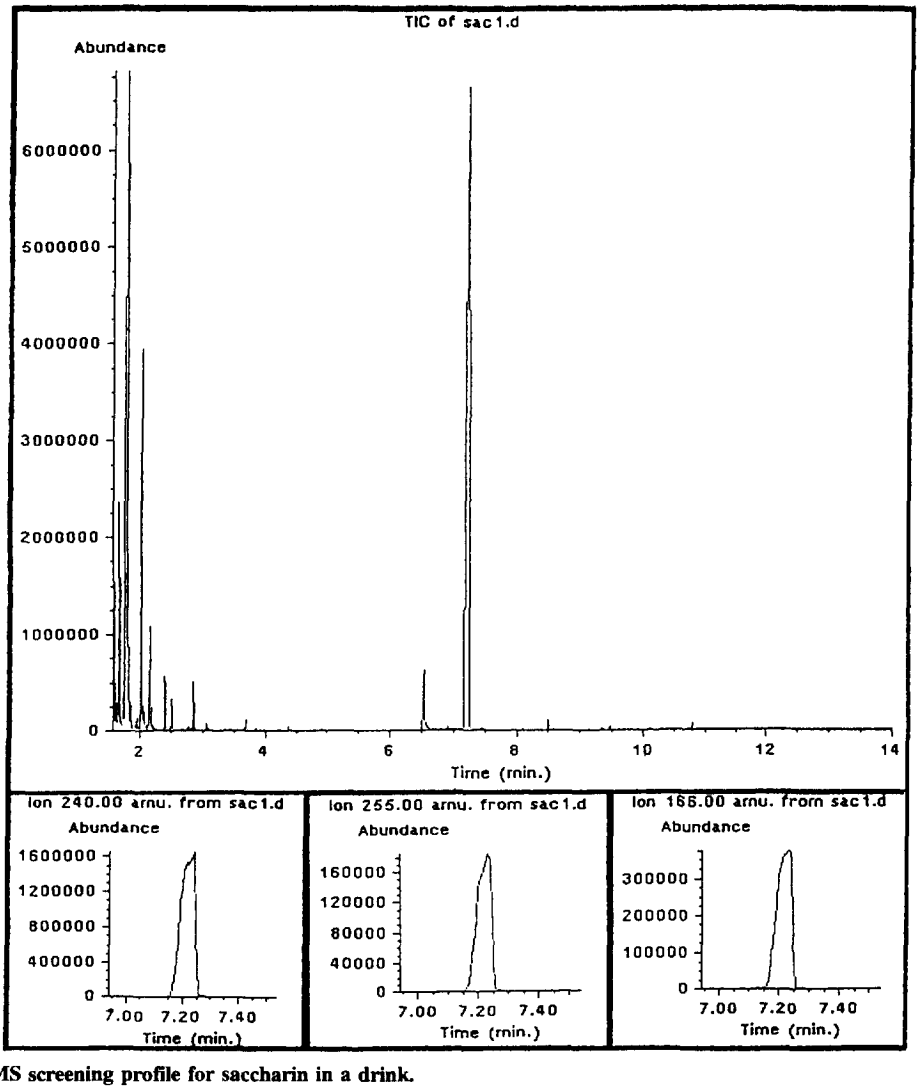


Fig. 5. GC/MS screening profile for saccharin in a drink.

시약으로서 MSTFA 를 선택하여 사용하였다. 이 유도체화 반응에서도 MTBSTFA 와의 반응에서 처럼 하나의 화합물이 생성되었다.(Fig. 4) 이 TMS 유도체의 질량스펙트럼에서는 molecular ion(M^+) 피이크가 m/z 255이고, base peak인 m/z 240(M^+-15) 은 molecular ion으로부터 methyl group이 떨어져서 생성된 피이크이다. m/z 166(M^+-89)은 molecular ion 에서 *O*-TMS 가 떨어져서 생성된 이온이며 이것은 saccharin의 enol form에서 *O*-trimethylsilylation 되었음을 말해주고 있다. 그러므로 saccharin의 sulfonamide group은 TBDMS 유도체처럼 steric hindrance에 의해서 amide group의 질소원자에서 치환반응이 일어나지 않고 enol form에서 치환반응이 일어나 saccharin-*O*-TMS 유도체가 정량적으로 생성되었다.

3. Trifluoroacetylation

Saccharin 을 acetylation 시키기 위하여 MBTFA 와 반응시킨 결과 반응이 일어나지 않았다.

결 론

Saccharin의 여러가지 유도체화 반응을 살펴본 결과 silylation 반응이 GC/MS에 의한 saccharin의 분석을 위해서 최적 유도체화 반응임을 알 수 있었다. 이들 각각의 saccharin 유도체들의 retention time과 characteristic ion들은 Table 2 에서 나타내었다.

한편, 시료의 saccharin 회수율은 93%이었고, saccharin의 검출한계는 시료내에서 20 ng/g 이었다.

실제 saccharin을 포함하고 있는 시료를 분석한 결과는 Fig. 5에서 나타내었고, 이때 silylating agent로는 MSTFA 를 사용하였다. Saccharin-*O*-TMS 의 characteristic ion인 m/z 240, 255, 166을 선택하여 selected ion monitoring 방법으로 식품 중 saccharin을 screening 한 결과 쉽게 saccharin의 존재를 확인할 수 있었다.

국문요약

식품내에 존재하는 saccharin이나 sodium saccharin에 대하여 여러가지 유도체화반응으로 해당하는 유도체를 만든후 GC/MS를 이용하여 분석하였고, 또한 saccharin 유도체들의 질량스펙트럼에 대해서 서로 비교, 분석하였다. 투석막(dialysis membrane)을 통하여 시료로 부터 saccharin을 추출하여 diazomethane, MBTFA, MSTFA, MTBSTFA 등과 같은 유도체화 시약을 사용하여 유도체화반응을 시킨 다음 saccharin과 정량적으로 반응할 수 있는 유도체화 시약을 선정하였다. Saccharin의 methylation 반응에서는 주생성물로서 N-methylated saccharin, 부생성물로서는 *O*-methylated saccharin이 생성되었지만, silylation 반응에서는 methylation 반응과는 달리 *O*-silylated saccharin 만 정량적으로 생성되었다. 그러나 MBTFA 에 의한 acetylation 반응은 일어나지 않았다.

참고문헌

1. Holak, W. and Krinitz, B.: Differential pulse polarogrphic determination of saccharin in foods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 163-167 (1980).
2. Ramappa, P.G. and Nayak, A.N.: Rapid spectrophotometric determination of saccharin in soft drinks and pharmaceuticals using Azure B as reagents, *Analyst*, **108**, 969-980 (1983).
3. Guven, K.C., Ozol, T., Ekiz, N., and Guneri, T.: Spectrophotometeric determination of sodium cyclamate and saccharin sodium with Astrazone Pink FG, *Analyst*, **109**, 969-970 (1984).
4. Thomas, J., Wyrodek, A., Krause, W., Schafer, R., and Pietsch, H.P.: Determination of saccharin in foods, *Nahrung*, **33**, 83-85 (1989).
5. The Nordic Committee on Food Analysis, Progress Report, Method No. 102: Detection of saccharin, cyclamate, and dulcine in soft drinks, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **197**, 453-454 (1984).
6. Vidaud, Z.E., Garcia Roche, M.O., and Gonzales, E.: A new method for the determination of saccharin based on thin-layer chromatography and spectrophotometry, *Nahrung*, **31**, 105-108 (1987).
7. Holder, C.L. and Bowman, M.C.: Determination of sodium saccharin in animal feed, wastewater, and human urine by high-pressure liquid chromatography, *Toxicol. Lett.*, **5**, 27-38 (1980).
8. Agostini, O., Chiari, A., and Ciofi Baffoni, D.: Simultaneous high-performance liquid chromatographic de-

termination of salbutamol sulphate, theophylline, and saccharin in hydroalcoholic formulation, *Boll. Chim. Farm.*, **121**, 612-618 (1982).

9. Puttemans, M.L., Dryon, L., and Massart, D.L.: Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-octylamine. Part V. Simultaneous determination of synthetic dyes, benzoic acid, sorbic acid, and saccharin in soft drinks and lemonade syrups, J. Assoc. Off. *Anal. Chem.*, **67**, 880-885 (1984).
10. Tyler, T.A.: Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame, and sodium benzoate in colar beverages, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 745-747 (1984).
11. Terada, H. and Sakabe, Y.: Studies on the analysis of food additives by HPLC. V. Simultaneous determination of preservatives and saccharin in foods by ion-pair chromatography, *J. Chromatogr.*, **346**, 333-340 (1985).
12. Valenti, L.P.: Liquid chromatographic determination of quinine, hydroquine, saccharin, and sodium benzoate in quinine beverages, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 782-784 (1985).
13. Puttemans, M.L., Branders, C., Dryon, L., and Massart, D.L.: Extraction of organic acid by ion-pair formation with tri-octylamine. Part 6. Determination of sorbic acid, benzoic acid, and saccharin in yogurt, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 80-82 (1985).
14. Sjoberg, A.M. and Alanko, T.A.: Liquid chroamtographic determination of saccharin in beverages and sweets, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 58-60 (1987).
15. Bui, L.V. and Cooper, C.: Reverse-phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in foods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 892-896 (1987).
16. Veerabhadrarao, M., Narayan, M.S., and Kapur, O.: Revese phase liquid chromatographic determination of some food additives, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 578-582 (1987).
17. Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, N., and Yamada, M.: Simultaneous determination of the nine food additives using HPLC, *J. Chromatogr.*, **457**, 333-343 (1988).
18. Lawrence, J.F. and Charbonneau, C.F.: Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase HPLC with absorbance detection, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 934-937 (1988).
19. Sjoberg, A.M.: Liquid chromatographic determination of saccharin in beverages and desserts, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1210-122 (1988).
20. Tibbels, T.S., Smith, R.A., and Cohen, S.M.: Determination of saccharin in diet and biological materials, *J. Chromatogr.*, **441**, 448-453 (1988).
21. Biemer, T.A.: Analysis of saccharin, acesulfame-K, and sodium cyclamate by high-performance ion chromatography, *J. Chromatogr.*, **463**, 463-468 (1989).
22. Hannisdal, A.: Analysis of acesulfame-K, saccharin, and preservatives in beverages and jams by HPLC, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**, 517-519 (1992).
23. Karlowski, K.: Determination of saccharin content in dietetic preparations by gas chromatograph, *Rocz. Panstw.*, **31**, 581-585 (1980).
24. Pantarotto, C., Salmona, M., Fanelli, R., Bianchi, M., and Szczawinska, K.: GLC-mass fragmentographic determination of saccharin in biological fluids, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 871-874 (1981).
25. Donike, M.: N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide, a new silylating agent for amide, *J. Chromatogr.*, **42**, 103-104 (1969).
26. Gleispach, H.: The use of different silylating agents for structure analysis of steroids, *J. Chromatogr.*, **91**, 407-412 (1974).
27. Donike, M.: Acylation with bis(acylamides), N-methyl-bis(trifluoroacetamide) and bis(trifluoroacetamide), two new reagents for trifluoroacetylation, *J. Chromatogr.*, **78**, 273-279 (1973).
28. Dong-Seok Lho, Jong-Ki Hong, Heang-Kee Paek, Jeong-Ae Lee, and Jongsei Park: Determination of phenolalkylamines, narcotic analgesics and beta-blockers by GC/MS, *J. Anal. toxicol.*, **14**, 77-83 (1990).
29. Mawhinney, T.P. and Madson, M.A.: N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide and related N-tert-butyldimethylsilylamide as pretective silyl donors, *J. Org. Chem.*, **47**, 3336-3339 (1982).
30. Corey, E.J. and Venkateswarlu, A.: Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 6190-6191 (1972).
31. Bazan, A.C. and Knapp, D.R.: Improved derivative of 6-ketO-prostaglandin F12 for GC/MS analysis, *J. Chromatogr.*, **236**, 201-207 (1982).
32. Roder, E. and Stuthe, W.: *Z. Anal. Chem.*, **266**, 358 (1973).
33. Matin, S.B. and Knight, J.B.: *Biomed. Mass Spectrom.*, **1**, 323 (1974).
34. Midha, K.K.: *Biomed. Mass Spectrom.*, **3**, 100 (1976).

35. Karl Blau and Grahams King: Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden, London, pp. 152 (1977).
36. Sir Derek Barton and Ollis W.D.: Comprhensive Organic Chemistry, Volume 3. Sulfur, Selenium, Silicon, Boron, Organometallic Compounds, Pergamon Press Ltd., London, pp. 541 (1979).