J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 4, pp. 294~302 (2010)

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

3-MCPD 지방산에스테르 분석법

우성민 · 오재호 · 장영미 · 김미혜*
경인지방식품의약품안전청, 수입식품분석과

Analysis Method Development for Bound-MCPD

Woo Sung Min, Jae Ho Oh, Young Mi Jang, and Meehye Kim*
Imported Food Analysis Division, Center for Food and Drug Analysis, Gyeongin Regional Korea Food&Drug Administration
(Received September 15, 2010/Revised October 4, 2010/Accepted October 27, 2010)

ABSTRACT - Toxicity of 3-MCPD that comes from food manufacture and processing is well-known. Recent studies reported that 3-MCPD fatty acid ester which is formed by metabolic material was 10~2000 times as much as 3-MCPD in food. This study made analysis method of 3-MCPD fatty acid esters by recent research and laboratory work, and determined the content of 3-MCPD and 3-MCPD fatty acid esters in sources and meat processing products. 3-MCPD fatty acid esters were analysed by GC/MS, which were hydrolyzed from fatty acid and then transferred 3-MCPD was extracted and reacted with derivative subject. As a result of analysis method validation, LOD was 5.4ppb, LOQ was 9.0ppb

Key words : 3-MCPD, Bound-MCPD, 3-MCPD fatty acid esters, GC/MS

식품을 가공하는 과정에서 지방산으로부터 생성되는 물질로 3-MCPD(3-mono chloro propane-1,2-diol)에 대해 많이 알려져 있다. 3-MCPD의 독성에 대해서는 정자수의 감소, 정자 기능의 감퇴등이 있다고 1975년 Homonnai[1]등에 의해 보고되었다. 생물체내에서의 3-MCPD의 대사과정을 보면, alcohol dehydrogenase에 의해 산화되어 베타-chlorolactaldehyde가 되고, 이 물질은 생물체의 당 대사를 억제한다. 최종적으로 3-MCPD는 oxalic acid로 변하여 몸밖으로 배출된다. 설치류에서 급성독성에 의한 경우 LD_{50}의 범위는 26~152 mg/kg으로 알려져 있다.

각국의 3-MCPD 규제현황을 보면 오스트리아, 뉴질랜드는 0.2, 캐나다는 1.0, 미국은 HVP에 대해서 0.4, EU는 0.02 mg/kg으로 설정되어 있으나 bound-MCPD의 기준은 현재 CODEX에서 논의 중이다.

최근 식품에 대한 위해 가능성이 지적되고 있는 Bound-MCPD(3-MCPD fatty acid esters, 결합형 MCPD)는 지방산으로부터 생성되는 물질로서, 지방산이 유해한 3-MCPD로 전환되는 과정에서 생기는 중간물질이라고 할 수 있다. 아직은 bound-MCPD 자체의 독성이나 위해성에 대해 알려져 있지 않지만, bound-MCPD가 식품형태로 소화기관에 들어가서 위산과 소화효소, 장을 지나는 과정에서 3-MCPD로 전환될 가능성이 있다. 독일 연방 위해 평가원(BfR, Bundesinstitut fur Risikobewertung)에서 bound-MCPD의 위해평가를 실시하여, bound-MCPD가 인체내에서 가수분해되면, 결합되어 있던 지방산이 분리되면서 3-MCPD가 생성될 가능성이 있다는 결론을 내렸다.

본 연구에서는 식품의 잠재적인 위해요소가 될 수 있는 bound-MCPD를 예방적인 차원에서 관리하기 위해 분석법을 개발하고자 하였다.

1980년 체코의 Jan Velisek[2]이 bound-MCPD를 분리하고, IR, NMR, Mass를 이용하여 확인하였다. 그 후에 Bound-MCPD를 확인하고 분리한 연구팀은 1984년 미국의 Janis Cerbulis[3]였으며, 염소의 젖에서 지방을 추출하여 bound-MCPD를 분리하였다. 또한 bound-MCPD에 결합되어있는 지방산은 palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic acid가 가장 많다는 것을 밝혔다.

2004년 체코의 Veronika Divinova-Jan Velisek[4] 연구팀에서는 3-MCPD와 bound-MCPD를 GC/MS를 이용하여 분석할 수 있는 실험법에 대해 보고하였다. Divinova-Velisek의 분석법은 bound MCPD에 에스테르 결합된 지방산을 강산을 이용하여 끊어내고 다시 결합되는 것을 막기 위해 메틸화(methylation) 하는 inter-esterification 방법이다.

Bound-MCPD를 직접 분석하는데 있어서 가장 어려운 것은, 표준품의 합성과 표준품의 개수가 얼마나 많을 것인지

*Correspondence to: Meehye Kim, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Food Contaminants Division
Tel: 82-2-380-1669, Fax: 82-2-357-4735
E-mail: meehkim@korea.kr

짐작하기 어렵다는 것이다.

Fig. 1은 일반적인 bound-MCPD의 구조이며, 지방산이 2개 결합된 di-esters이며 R1, R2에 결합되는 지방산에 따라 무수히 많은 bound-MCPD가 존재할 수 있다. 실제 식품에는 1개만 결합된 mono-esters 형태까지 가능하며, 중간에 있는 chiral carbon 때문에 생기는 광학이성질체까지 고려하면, 한 가지 구조식에 대해 2가지의 화학적으로 다른 bound-MCPD가 가능하다.

예를 들어 자연계에 존재하는 지방산 중에서 비율이 가장 높은 주요 지방산 6개(myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic)만 고려해보자. 가능한 bound-MCPD 중에서 mono-ester 형태는 $6 \times 2 = 12$ 종, di-ester 형태는 $6 \times 6 = 36$으로 모두 더하면 48종류의 표준품을 합성해야 한다. 이때 가운데에 있는 chiral 탄소에 의한 광학이성질체까지 고려하면 총 96 종류의 bound-MCPD 표준품이 가능하다. 단지 6종류의 지방산만 고려해도 96종의 표준품이 필요하며, 위와 같은 계산으로 24종의 지방산을 고려하면 1248종의 표준품이 필요하게 된다. 96종의 표준품을 합성하고, 분석방법을 만드는 것은 가능한 일이지만, 현실적으로 비용과 시간이 매우 많이 소요된다. 따라서 현재 bound-MCPD 분석을 할 때는 bound-MCPD에 결합된 지방산을 끊어내고, 모두 MCPD로 전환시켜서 MCPD의 양으로 측정하여 구하는 것이다.

요약하면 bound-MCPD를 분석함에 있어서 가수분해 없이 그대로 분석한다면, bound-MCPD 종류에 따라 모든 표준품이 필요하며, 지방산 글리세롤 분석을 위한 특수컬럼이 필요하다. 장점은 유도체화 없이 추출만 하여 분석이 가능하며, 결합형-MCPD의 종류와 분포를 파악할 수 있으며, 모두 정량이 가능하다는 것이다. 한계점으로는 위에서 언급한 것처럼 모든 bound-MCPD 표준품을 확보하는 것이 현실적으로 시간과 비용이 매우 많이 소요된다는 것이다.

반대로 bound-MCPD를 가수분해하여 모두 3-MCPD로 전환시켜 분석하는 방법은 3-MCPD 표준품만 있으면 되며,

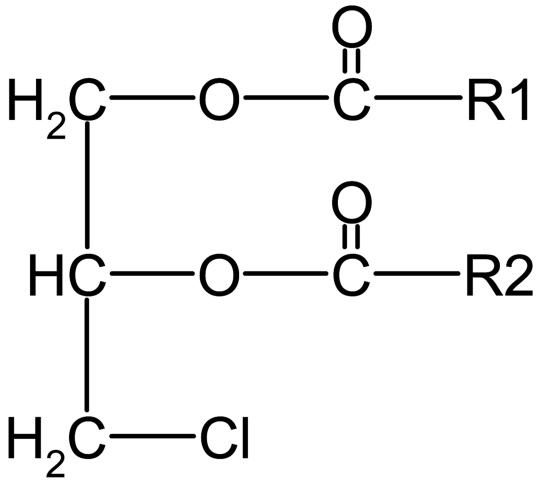

Fig. 1. Bound-MCPD molecula structure.(Di-esters)

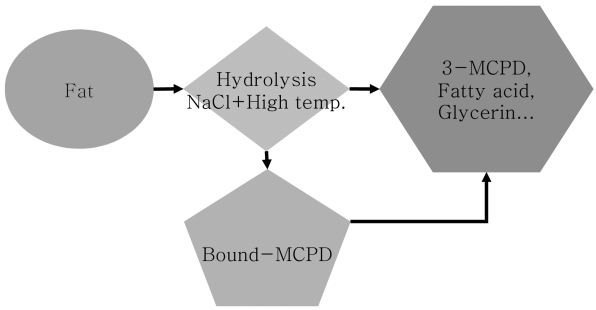

Fig. 2. Formation and reaction process of bound-MCPD in food processing.

일반적인 GC 컬럼으로도 분석 가능하다. 전처리에 있어서는 가수분해와 유도체화 과정이 필요하다. 한계점으로는 분석결과를 놓고 어떤 종류의 bound-MCPD인지 종류별 정량이 불가하여 3-MCPD 총합을 통해서 추측만 가능하다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 시약은 다음과 같다. 3-MCPD-d5 internal standard는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.에서 구매하였으며, 98% 순도, 1 mg/ml의 농도로 메탄올에 녹인 상태의 시료이다. 3-MCPD 표준품은 Aldrich의 98%, product No. = 107271, lot No. = 02417CE, 500 ml, iso-octane(2,2,4 - trimethylpentane)은 Riedel-de Haen사의 product No. = 32291, lot No. = 80790, 1리터, tetrahydrofuran은 Sigma-aldrich의 product No. = 178810, lot No. = 03734AJ, 1리터, methanol은 Burdick&Jackson의 99.9%, product No. = AH230-4, lot No.10071753, 4리터, ethylacetate는 Burdick&Jackson의 99.9%, product No. = AH100-4, lot No. = 10071748, 4리터, dichloromethane은 Burdick&Jackson의 99.9%, product No. = AH300-4, lot No. = 10071756, 4리터, diethyl ether는 Burdick&Jackson의 99.9%, product No. = 107-4, lot No. = 10071649, 4리터, aluminium oxide activated는 Sigma-Aldrich product No. = 19,996-6, lot No. = U15810-258, 1 kg, sodium bicarbonate는 Sigma의 99.7~100.3%, product No. = S7277, lot No.037K0089, 1 kg, sodium sulfate anhydrous powder는 Junsei의 99.0%, product No. = 8346-1250, lot No. = 8F1076, 1 kg, Sulfuric acid는 Jusei의 96.0~98.0%, product No. 83010-3301, 500g, sodium chloride는 Dae Jung의 99.9%, product = 7548-44, lot No. = S0119HI, 1 kg, heptadecane은 Sigma-Aldrich의 99%, product No. = 128503-25G, lot No. = 02025DE, phenylboronic acid는 Sigma-Aldrich의 95%, product No. = P20009-10G, lot No. = 20301EE, heptafluorobutyric anhydride는 Sigma-Aldrich의 derivatization grade, product No. = 394912-25ML, lot No. = 04012LH를 사용하였다. SPE는 Merck사의 Extrelut NT3, NT20을 사용하였다. Silicagel은 Merck사의 silica gel 60,

product No. = 1.07734.1000, lot No. = TA689234 511, 1 kg을 사용하였다.

표준품과 시약의 제조

5M sodium chloride 용액은 272.2 g의 NaCl을 녹여 1리터로 만들어 제조하였다. 내부 표준물질은 1 mg/ml의 3-MCPD-d5 1 ml를 ethylacetate에 녹여 100 ml로 만들어 10 ug/ml로(10ppm) 만들어서 사용하였다. 3-MCPD 표준품은 1 g을 1리터의 ethylacetate에 녹여 1 mg/ml로 만들어, stock solution으로 만들고, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000ppb의 농도로 희석하여 사용하였다. 포화 $NaHCO_3$는 과량의 탄산수소나트륨을 증류수에 녹여 제조하였다. 2% 황산용액은 H_2SO_4 2 g을 methanol 98 g에 녹여 제조하였다

3-MCPD 분석 시료의 준비

시험법이 제대로 적용될 수 있는지 알아보기 위해 시료를 대형할인마트 위주로 수거하였다. 시료의 수거 무게는 1 kg을 기준으로 수거하였으며, 유통기한이 같은 식품으로만 구입하였다. 부득이하게 식품이름은 같고, 유통기한 서로 다른 경우에는 서로 다른 시료로 간주하였다. 액상의 시료는 마개가 있는 튜브에 옮겨 담은 뒤 전처리할 때 덜어서 사용하였다. 액체 중에서 기름이 분리되는 소스류의 경우는 실험을 하기전에 격렬히 흔들어서 기름과 물 층이 잘 섞이게 한 뒤에 전처리를 하였다. 고체상의 시료는 분쇄기와 믹서를 사용하여 잘 갈아서 사용하였다. 스낵과자류과 같은 과자류는 믹서기로 갈고, 덩어리가 남으면, 막자사발을 이용하여 분말로 만들었다.

실제 전처리를 진행할때, 5M NaCl을 가한 뒤에 시료에 들어있는 첨가물 때문에 검체가 슬러리 상태가 되거나 겔처럼 되서 시료 채취를 하기 어렵거나 못할 때 있다. 이때는 시료의 양을 절반으로 줄이거나, 필터를 사용하여 NaCl 추출 용액을 채취하였다. 식육가공품의 경우는 지방덩어리가 표면에 층을 이루어 시료 채취가 어려운 경우가 있으며, 이때는 표면의 층을 거둬내고, 필터링을 하여 시료채취를 하였다.

3-MCPD 분석법

Bound-MCPD 분석을 위해서는 3-MCPD 분석이 선행되어야 한다. 본 연구에서 적용할 3-MCPD의 분석법은 우리나라의 식품공전 방법을 사용하였다. 다음의 Fig. 3은 현재 식품공전에 등재된 3-MCPD 분석법을 도표화 한것이다.

현재 공전 방법은 크게 물추출, SPE 추출, 농축, 유도체화 단계로 나눌 수 있다. 검체 5 g을 정량하여 5M의 NaCl 용액 30 ml를 하고, 10분간 격렬히 흔들어 충분히 혼합, 추출이 되도록 하고, 4°C, 4,500rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 2 ml 취하여 SPE (solid phase extraction) 추출단계로 간다. SPE 추출단계는 앞에서 취한 2 ml의 시료와 알루미늄 옥사이드 4 g, 내부표준물질(3-MCPD-d5)을 가하여, 약수저를 이용하여 충분히 혼합해 준다. 잘 섞인 알루미늄 옥사이드를 오픈 컬럼에 충진하고, 제일 윗층에는 무수 황산나트륨을 1~2 cm 가량 가한다.

시료에 존재하는 지방을 제거하기 위해 먼저 hexane 20 ml를 흘려주고, CH_2Cl_2 30 ml를 2 ml/min의 속도로 통과시켜 3-MCPD를 추출한다. 추출된 CH_2Cl_2 용액을 35°C에서 감압농축한 뒤에, 농축플라스크에 CH_2Cl_2 1 ml씩 3번 세척하여 마개가 있는 유리 시험관으로 옮겨서, 35°C에서 질소 농축한다. 농축이 끝나고 나면, HFBA (Heptafluoro butyric acid anhydride) 150ul와 iso-octane (2,2,4-trimethylpentane) 1 ml를 가하여 60°C, 30분간 반응을 시킨다. 반응을 정지시키고, 미반응 HFBA를 분해시키기 위해서 증류수 5 ml를 가하고 20초간 격렬히 흔든 후 정치시켜서, 상층의 iso-octane층을 취하여 GC/MS 분석을 한다

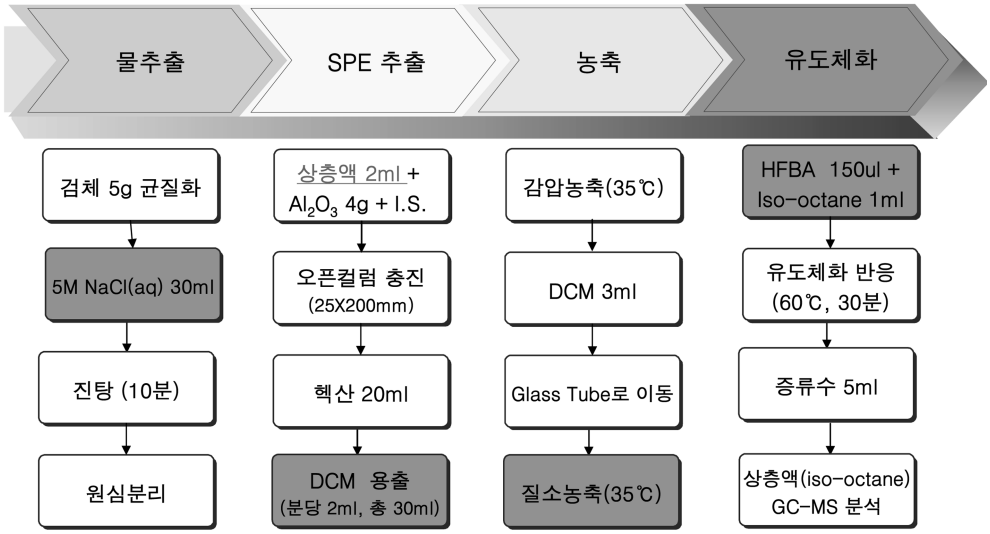

Fig. 3. 3-MCPD analysis method in korea food code.

Bound-MCPD의 분석법

Bound-MCPD 분석법의 핵심이 되는 inter-esterification 반응은 지방산 글리세라이드를 개질할 때 사용되는 반응을 응용한 것으로, Fig. 4와 같이 시료에 존재하는 bound-MCPD를 메탄올에 녹인 2% 황산용액 존재하에서 가수분해 시키는 것이다. 특히 메탄올의 역할이 제일 중요한데, 황산에 의해서 가수분해 된 지방산의 카르복실 그룹에 메탄올을 곧바로 methylation 하여, 가역반응에 의해 지방산이 다시 3-MCPD에 결합되는 것을 막는 것이다.

Bound-MCPD의 가수분해 반응은 2개의 가역반응이 연결된 반응식이다. 먼저 bound-MCPD가 황산 촉매에 의해 3-MCPD와 지방산으로 가수 분해되는 가역반응이 진행된다. 이때 가수 분해된 지방산은 메탄올과 다시 에스테르화 반응을 일으켜서 fatty acid methyl ester가 되는 2번째 가역반응으로 연결된다. 연결된 2개의 반응은 모두 가역반응이며, 각 반응의 속도상수를 위와 같이 k_1, k_2, k_3, k_4 라고 하여, 생성물의 분포에 대해 예측해 볼 수 있다. 본 연구에서는 bound-MCPD의 가수분해를 극대화시키기 위해서 반응의 평형을 정반응에 우세하도록 지방산에 메틸을 붙여 에스테르화 시켰다. 생성물이 반응에 의해 다시 제거되면서 정반응이 더 진행되는 것이다.

지방산 글리세라이드를 가수분해하는 방법은 위와 같이 산촉매를 사용하는 방법도 있지만, 자연적인 효소를 쓰기도 한다. 효소반응의 경우 입체반응 특이성이 있어서 원하는 위치의 지방산만을 선택적으로 잘라낼 수 있는 등 장점도 많지만, 반응조건이 온화하여 반응속도를 크게 높일 수가 없으며, 기질의 농도가 너무 높거나 하면 반응에 문제가 생기는 단점도 있다. 그래서 본 연구에서는 산촉매를 이용한 가수분해 방식을 택하였다.

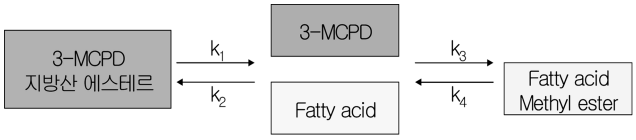

Fig. 4. Reversible inter-esterification reaction of 3-MCPD fatty acid ester.

Bound-MCPD 분석을 위해서, 먼저 지방과 섞여있는 bound-MCPD를 추출해 내는 단계가 필요하다. Bound-MCPD는 분자 내에 염소가 1개 치환된 지방산 글리세라이드이기 때문에 에테르를 이용하여 추출하면 된다. 시료에서 지방을 추출하는 방법은 에테르 외에도 hexane, heptane등 다양한 용매와, 추출방법이 있으나 여기서는 diethyl ether 15 ml로 2회 추출하여 40ºC이하의 온도에서 감압농축 하였다. 추출된 지방에는 3-MCPD와 bound-MCPD가 같이 섞여있으며, 다음 단계에서는 지방산과 결합되어 있는 3-MCPD 지방산에스테르를 가수분해 시키게 된다. 전체적인 실험 과정을 Fig. 5와 같이 도표로 정리하였다.

위와 같은 과정으로 농축된 플라스크에 THF 1 ml를 넣어 잘 씻어서, 마개가 있는 시험관으로 옮기고, 다시 2% H_2SO_4 (methanol) 용액 1 ml로 2회 씻어서 시험관으로 옮긴다. 마개를 닫고 60ºC에서 4시간동안 가수분해 반응을 시켜주고, 반응이 끝나면 상온으로 식힌다. 반응을 중지시키고 pH를 맞추기 위해서 포화 $NaHCO_3$ 0.5 ml를 사용하여 중화시킨다. 중화된 시료에 하얀 침전이 분산되어 있기 때문에 원심분리기를 사용하여 4500rpm, 5min, 4ºC 조건으로 분리하고, 상층액 1 ml를 덜어내어 3-MCPD 분석법으로 연결한다. 위와 같은 방법으로 bound-MCPD를 3-MCPD로 전환시켜 GC/MS 분석을 한 뒤에, 3-MCPD 분석결과를 빼서

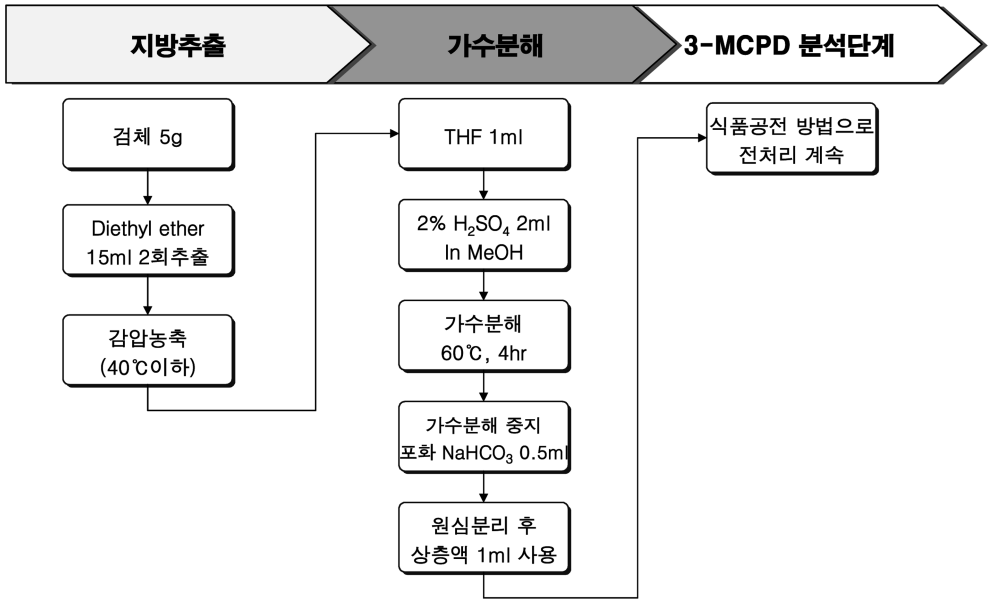

Fig. 5. Bound-MCPD analysis method.

bound-MCPD 값으로 한다. 3-MCPD의 함량을 기존의 식품공전 방법으로 진행하여, 측정된 결과값을 X라하고, 지방추출과 가수분해를 거쳐서 3-MCPD와 bound-MCPD를 모두 합하여 분석한 결과값을 Y라고 할때, bound-MCPD의 값은 (Y-X)로 계산한다.

기기분석 조건

기기분석은 현재 식품공전에 등재된 방법을 기준으로 하였다. GC는 Varian의 CP-3800을, MSD는 Varian의 Quadrupole-MSMS 1200을 사용하였다.

컬럼은 DB-5MS (30 m × 0.25 mm 0.25 um)를 사용하였다. 주입구의 조건은 온도 250°C, splitless mode로 1 ul 시료를 주입하였다. Ion source의 온도는 200°C, EI[1] mode에서 SIM[2] scan하여 정량, 정성분석을 하였다.

Transfer line의 온도는 280°C로 유지하였고, 유량은 1.0 ml/min(분석시간 30분) 또는 0.8 ml/min(분석시간 40분)으로 분석하였다. Dwell time = 0.1s, collect delay time (solvent time) = 3.0min으로 설정하였다. 온도 프로그램은 50°C에서 5분간 유지하고, 3°C/min의 속도로 90°C까지 승온시키고, 5분간 유지한뒤에, 30°C/min의 속도로 280°C까지 승온하고, 0.33min동안 유지하여 분석조건을 잡았다.

3-MCPD-HFBA 유도체화 된 시료의 분석을 위해 253, 275, 289, 291, 453 ion을 선정하였고, 3-MCPD-d5-HFBA 내부표준물은 257, 278, 294, 296, 456 ion을 선정하였다. 정량이온은 3-MCPD의 경우 253으로, 내부표준물질의 경우 257을 기준으로 하였고, 정성분석을 위한 이온 비율의 범위값은 일반적으로 사용하는 ± 20%로 하였다.

GC/MS의 경우 ion volume과 ion lenz, liner등을 항상 깨끗하게 유지해야 하기 때문에 거의 100개 시료당 한번씩은 ion source를 세척해주고, liner, septum, ion volume을 세척하여 교체해주었다. Ion volume과 ion lenz, ion source를 세척할때는 알루미늄 옥사드에 물을 넣어 까맣게 타서, 흡착된 물질을 씻어내고 메탄올 3회, dichloromethane 3회, hexane으로 3회 sonication한 뒤에 건조하여 사용했다.

분석 시 기기 내부의 진공도는 1.4×10^{-7} - 3×10^{-7}을 유지시켜 주었으며, ion volume과 ion source 교체시마다 mass 튜닝을 다시 해주었다. 튜닝할때는 GC/MS 내부의 수분과 질소의 피크가 권장조건만큼 작아질 때까지 bake out을 3시간 해준 뒤에 실시하였다. 튜닝을 하고 나서는 69 ion의 전압이 500mV~800mV 유지되는지를 확인하였고, 각 이온의 모양이 바르게 나왔는지 확인한 뒤 시료의 측정을 하였다. 컬럼의 설치가 잘못되었거나, 컬럼을 말단을 잘못 잘랐을때 피크의 모양이 일그러지거나, 갈라지는 현상이 생기기 때문이다.

[1] Electron Ionization
[2] Single Ion Monitering

결과 및 고찰

먼저 내부표준물질과 3-MCPD의 크로마토그램을 보면 내부표준물질인 3-MCPD-d5가 15.157 ± 0.05min에서 먼저 나오고, 3-MCPD는 15.323 ± 0.05min에서 나오는 것을 알 수 있다. 각각의 피크는 충분히 떨어져 있어서 resolution을 따로 계산해 볼 필요는 없었다. 실제 검체를 전처리 했을 때 25분대 후반부에서도 다른 피크들이 나오기 때문에 분석시간을 더 단축시키지는 않았다. 다음의 Fig. 6, 7은 내부표준물질(2ppm)과 3-MCPD(1ppm) 표준물질의 이온 크로마토그램이다. 내부표준물질의 경우 257, 278, 294. 296, 456 이온이 mega count 수준으로 충분히 높은 감도를 보여주고 있으며, 피크의 모양도 꼬리끌기(tailing), 앞서나오기(fronting), 흡착이 없이 정규분포곡선 모양으로 나오고 있다. 3-MCPD 표준물질도 253, 275, 289, 291, 453 이온에 대해서 이온 크로마토그램을 보면 피크의 모양이 정규분포로 양호하게 나타났다. 정량이온으로 선택한 내부표준물질의 257과 3-MCPD의 253의 경우 각각의 5가지 이온 중에서 가장 감도가 높은 것을 알 수 있다.

특별히 중요한 이온은 내부표준물질의 경우 294, 296 이온과 3-MCPD의 경우 289, 291 이온으로서, 염소이온의 방사성동위원소 Cl^{35}, Cl^{37}의 비율인 3:1의 비율과 일치한다. 이점이 이온 비율을 이용하여 정성분석을 할 때 가장 중요하다. 물론 다른 이온의 비율도 맞아야 하지만, 위의 염소이온에 의해 나타나는 3:1 이온비가 맞아야 한다.

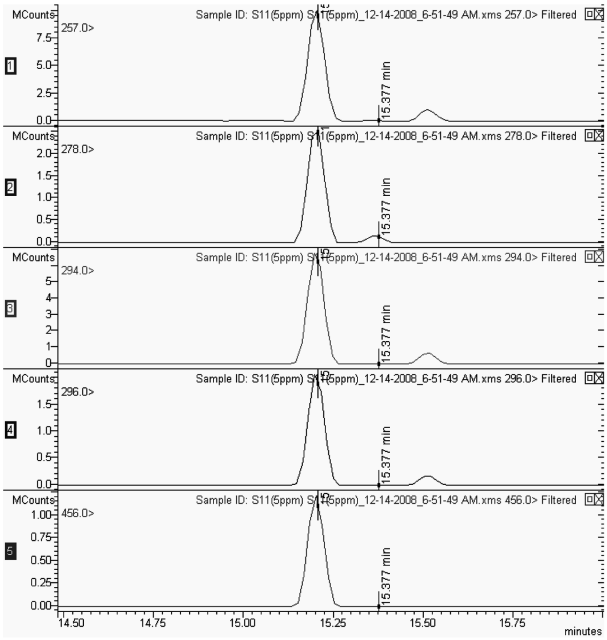

Fig. 6. Ion Chromatogram of 3-MCPD-d5.

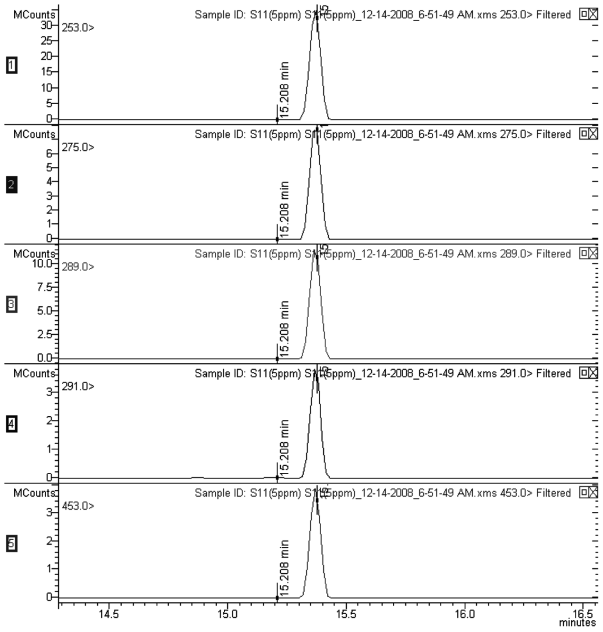

Fig. 7. Ion Chromatogram of 3-MCPD.

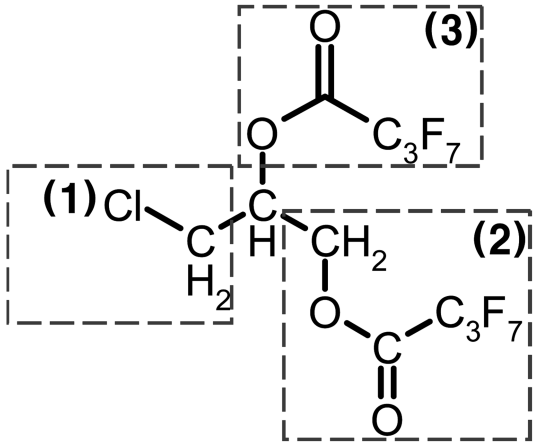

Fig. 8. Molecula ion of 3-MCPD-HFBA.

Mass interpretation

아래의 Fig. 8은 3-MCPD를 HFBA 유도체화 반응시켰을 때 생기는 molecula ion이다. 분자량은 502.45이며, GC/MS에서 이온화 될 때, 몇 가지 조각으로 부서지게 되는데, (1), (2), (3) 위치가 잘라지게 되면 다음 그림과 같이 (1) 부분이 떨어져 나가서 453 이온이 되고, 염소이온이 떨어져 나가기 때문에 염소에 의한 3:1 동위원소 비율의 이온값이 없어지게 된다. (2) 부분이 떨어져 나가면 275 이온이 되며, (3) 부분이 떨어져 나가면 289, 291 이온이 되며, 염소이온이 존재하기 때문에 3:1 이온비가 나타난다. 253 이온의 경우는 (3)부분이 떨어져 나가고, 염소이온이 떨어져 나가면서 생기는 이온이다. 내부표준물질인 3-MCPD-d5의 경우는 남아있는 수소가 모두 중수소인 경우이며, 아래 그림들과 비교하여 알 수 있다.

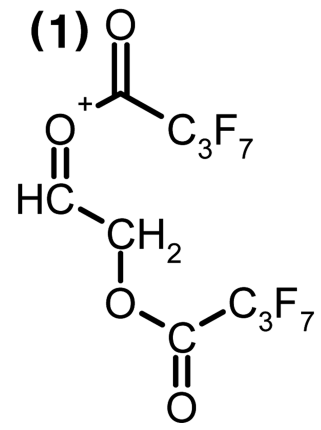

Fig. 9. 453 ion.

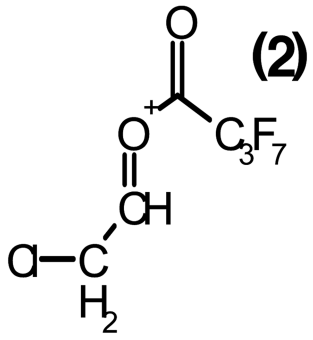

Fig. 10. 275 ion.

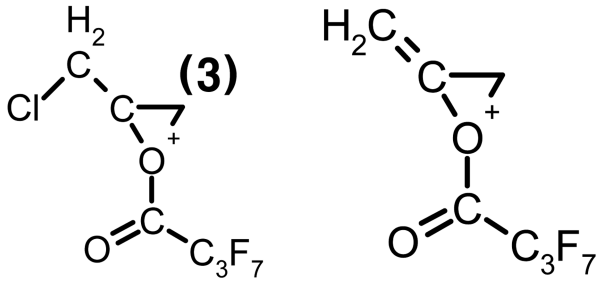

Fig. 11. 289, 291 ion.

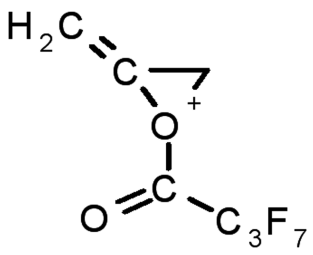

Fig. 12. 253 ion.

3-MCPD의 경우 253이온을 정량이온으로 하고, 나머지 4개의 이온은 정성이온으로서 253 이온에 대한 비율이 맞아야 3-MCPD로 인정하게 된다. 아래의 Table 1의 값은 정량이온을 100이라고 가정했을 때, 나머지 이온들의 비율%이

다. 위에서 언급한 것처럼 289, 291이온의 경우 정확하게 3:1의 비율이 맞다는 것을 알 수 있다. 내부표준물질로 사용하는 3-MCPD-d5-HFBA 유도체 화합물의 경우도 257 이온을 정량이온으로 하며, 나머지 이온들의 비율이 맞아야 한다. 실제 검량곡선을 그릴 때는 Varian 사의 프로그램을 사용하여 계산을 하며, 이온 비율의 범위는 일반적으로 통용되고 있는 ±20%를 기준으로 한다.

Range of Linear

분석법의 밸리데이션을 위한 첫 단계로 분석하고자 하는 물질의 ROL[3]이 필요하다. ROL 구간이 넓을 수록 그 시험법은 전처리 단계에서 농축이나 희석 등의 부가적인 조작이 줄어들며, 결과 해석에 있어 검출기의 감도 포화 등의 위험에서 안전하다.

위의 Fig. 13은 3-MCPD 표준품의 농도를 2ppb에서 20ppm까지 달리하여 측정한 결과이다. 그림에서 점선으로 나타낸 부분이 최소자승법으로 직선에 맞추어 식을 구한 추세선이다. 5ppm보다 큰 농도에서는 비선형적인 경향을 보여주고 있다. 최소자승법으로 계산했을 때, 선형성에 대한 R^2 값은 0.977이지만, 농도에 비례하지 않는 패턴이 나타났다. 2ppb에서 50ppb 구간을 따로 떼어 최소자승법으로 추세선을 구하면 R^2 값이 0.998로 높은 편이지만, 농도가 낮은 구간 10ppb 미만에서는 비선형적인 결과를 보여준다. 이것은 기기의 검출한계 근처로 가면서, 각 이온의 검출감도에 한계가 오기 때문이다. 따라서 정량분석을 위한 분석물질의 선형감도를 나타내는 구간을 보면 10ppb에서 2ppm 구간에서 선형성이 유지되며, R^2값이 0.9996으로 선형성이 우수하다.

다음은 분석하고자 하는 물질이 동일한 조건에 반복적으로 일정하게 측정되는지를 알아보기 위한 반복성 실험결과이다. 한 시료당 총 6번의 injection을 하여 표준품의 면적과 내부표준물질의 면적비를 구하여 그 상대표준편차를 도시한 것이 다음의 그림이다. 선형구간으로 설정한 10ppb에서 2ppm 농도의 구간에서 5% 미만의 편차를 보여주었다. 따라서 반복성이 우수하다는 것을 의미한다.

Table 1. Ion ratio of 3-MCPD standard and internal standard(3-MCPD = 1ppm, I.S. = 2ppm)

Ion	3-MCPD	Ion	3-MCPD-D5
253	Quan ion	257	Quan ion
275/253	20.1%	278/257	23.2%
289/253	27.1%	294/257	54.4%
291/253	9.0%	296/257	16.8%
453/253	7.8%	456/257	8.5%

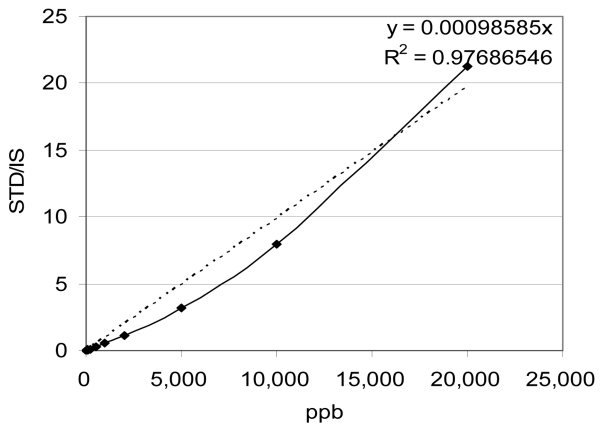

Fig. 13. 3-MCPD conentration vs STD/IS area ratio.(2ppb~20ppm).

Reproducibility

재현성은 전처리하는 시간, 날짜와 사람을 서로 다르게 하여 동일한 결과를 얻을 수 있는지를 알아보는 것이다. 표준품의 농도는 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000ppb를 기준으로 실험하였으며, 한 시료당 7번씩 총 63건의 전처리를 하였다. 서로 다른 실험자와 시간에 만든 표준품이라 반복성 실험과 달리 편차가, 조금 더 크게 나오는 것을 알 수 있다. 선형성 계수도, 데이터의 산포도가 넓어지면서 0.986으로 감소하였다.

위의 결과를 토대로 각 농도별 재현성을 정리해 보면 다음 그림과 같다.

10ppb 이하부터 상대표준편차가 10%를 넘어가며, 기기의 상태와 전처리 상태에 영향을 약간 받기 시작한다. 선형구간에서는 상대표준편차 10%미만이며, 약 5%내외로 나타나는 것으로 보아, 이 실험의 재현성도 좋다고 말할 수 있다.

검출한계(LOD, Limit of detection)와 정량한계(LOQ, Limit of quantitation)의 경우 3-MCPD 분석에 있어서 정성과 정

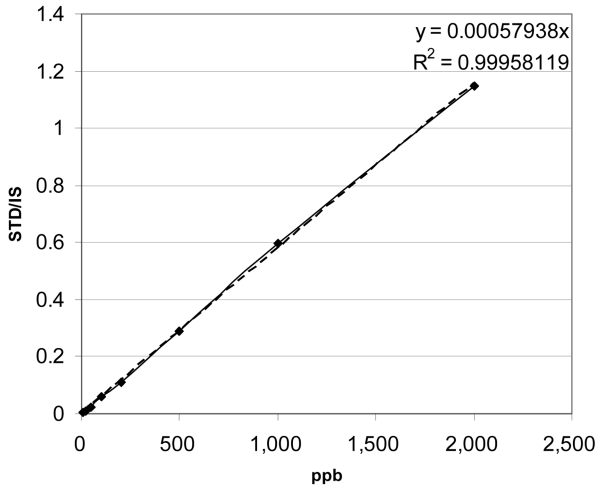

Fig. 14. 3-MCPD concentration vs STD/IS area ratio.(10ppb-2ppm).

[3] Range of Linear(분석물질의 감응도가 농도에 따라 선형으로 나타나는 구간)

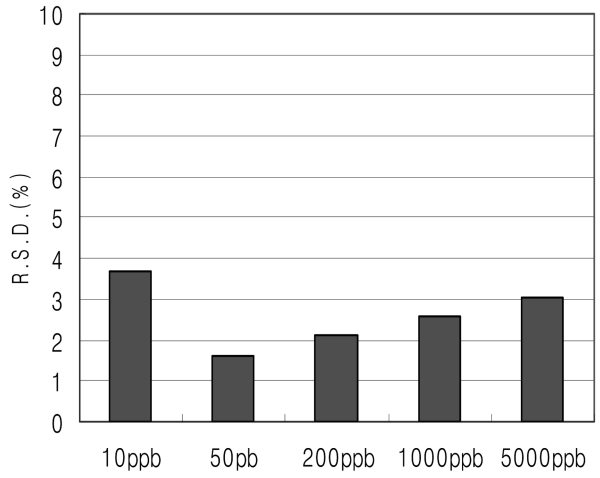

Fig. 15. Repeatability of 3-MCPD.
R.S.D.(Relative standard deviation)

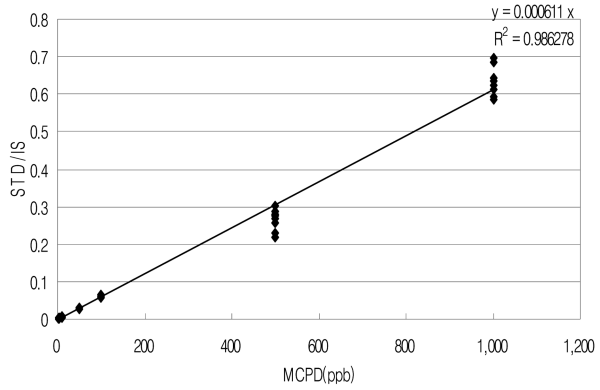

Fig. 16. Reproducibility of 3-MCPD.

량을 위해 사용하는 이온도 5개이고, 각각의 이온 감도는 다르기 때문에 자세히 검토해 볼 필요가 있다. 단순하게 정량이온만을 가지고 LOD와 LOQ를 구하는 것이 아니라, 5개 이온 중에서 감도가 제일 낮은 이온을 기준으로 LOD, LOQ를 구해야 옳을 것이다. 3-MCPD를 정량분석하기 위해서 사용하는 이온은 253이며, 5ppb에서 1ppm 농도에서 S/N 비율을 구했을때, 8.7과 5128.2가 나왔다. 따라서 정량이온 253은 LOD, LOQ가 충분히 높은 상황이다. 그러나 291 이온을 보면 5ppb에서 S/N 비율이 낮게 나왔다. 따라서 10ppb의 S/N 비율값을 사용하여 실험결과를 내삽한뒤 LOD와 LOQ를 구했다. S/N 비가 3 일때를 LOD, 10 일때를 LOQ로 선정하였으며, 기기적인 검출한계와 정량한계는 LOD = 5.4ppb, LOQ = 9.0ppb이고, 실험법 자체가 3배 희석 공정이므로 실험적법인 LOD = 5.4 × 3 = 16.2ppb, LOQ = 9 × 3 = 27ppb이다. 특이한 점은 실제 생성되는 이온의 개수(ion count number)는 453이온이 적은데도 불구하고, S/N비율은 5개 이온 중에서 가장 높다는 점이다. 그 이유는 453 이온의 경우 방해이온이 거의 없어서, 베이스 라인이 깨끗하기 때문이다. 검출한계와 정량한계를 구하기 위해 한 개

Table 2. 기존 문헌결과와 비교

유도체 시약	LOD(ppb)	LOQ(ppb)	Ref.
PBA	3	9	(4)
PBA	3	9	(7)
HFBI	5	15	(8)
HFBA	5.4	9	본실험

PBA : Phenylboronic acid, HFBI : Heptafluorobutyryl Imidazole

의 농도마다, 총 10번의 기기분석을 하여, 실험 데이타의 반복성을 보았는데, 0.01ppm이하에서는 데이터의 편차가 매우 심한 것을 알 수 있으며, 특히 291이온의 경우 S/N 비율의 편차가 40%까지 크게 나는 것을 알 수 있다. 이것은 분석하고자 하는 3-MCPD의 농도가 작아지면서, 분석에 방해 되는 이온들의 영향력이 커졌기 때문이다. 기존 문헌과 분석법을 비교했을때 동등수준인 것을 알 수 있으며, 본 실험의 실험법으로는 3-MCPD와 DCP (Dichloropropanediol)을 동시에 전처리 할 수 있는 장점이 있다.

3-MCPD 시험법의 회수율은 85.53%, R.S.D. = 2.48%, n = 5, 3-MCPD 지방산에스테르의 시험법 회수율은 82.97%, R.S.D = 5.25%, n = 10 이었다.

bound-MCPD Monitering

위와 같이 확립된 분석법을 토대로 모니터링을 실시하였고, 시료는 다음과 같은 구성으로 수거하였다.

3-MCPD와 bound-MCPD가 검출되기에 유리한 소스류와 식육가공품을 위주로 수거하였다. 수거의 기준은 식품의 성분으로 기름과 NaCl과 물이 섞여서 가공, 조리된 것을 근거로 하였다. 총 109건의 검체를 수거하였고, 조미식품은 소스류 65건, 식육가공품은 30건을 기본적으로 수거하였으며, 부가적으로 스낵과자류은 기름과 소금이 섞여 함께 튀겨진 과자류를 5건 수거하였고, 수산물가공품으로 수산물 통조림 5건, 식용유지 2건, 절임류 2건은 깻잎절임 식품을 수거하였다.

위와 같이 수거한 검체에 대해 3-MCPD와 bound-MCPD 모니터링 결과를 보면 다음과 Table 3, 4과 같다. 3-MCPD는 소스류의 경우 총 65건의 검체 중에서 6건이 검출되었으며, 6건 중에서 최소는 0.062ppm이고 최고 많이 나온 것은 0.276ppm이 검출되었고, 식육가공품은 총 30건 중에서 3건이 검출되었고 제일 적은 것은 0.070ppm에서 많은 것은 0.255ppm 검출되었다. 수산물가공품은 5건 중에서 1건이 검출되었고, 0.033ppm이 검출되었다. 스낵과자류인 과자류에서는 5건중에서 3건이 검출되었고, 최소 0.075ppm에서 최대 0.112ppm 까지 검출되었다. 식용유지와 기타수거 제품에서는 불검출이었다. 3-MCPD의 경우 109건 중에서 총 13건이 검출되었으며, 검출률이 11.9%이다.

Bound-MCPD는 아래 Table 4과 같이 소스류의 경우 65건 중에서 7건이, 최저 0.072ppm에서 최대 0.298ppm까지

Table 3. Monitering result of 3-MCPD

식품종류 (건수)	3-MCPD(ppm)	검출건수
소스류 (65)	0.062-0.276	6
식육가공품 (30)	0.070-0.255	3
수산물가공품 (5)	0.033	1
스낵과자류 (5)	0.075-0.112	3
식용유지 (2)	불검출	0
절임류 (2)	불검출	0
합계 (109)		13

Table 4. Monitering result of bound-MCPD

식품종류 (건수)	B-MCPD(ppm)	검출건수
소스류 (65)	0.072-0.298	7
식육가공품 (30)	0.094-0.280	5
수산물가공품 (5)	불검출	0
스낵과자류 (5)	0.174-0.945	5
식용유지 (2)	불검출	0
절임류 (2)	불검출	0
합계 (109)		17

검출되었고, 식육가공품은 30건 중에서 5건이, 최저 0.094ppm에서 최고 0.280ppm까지 검출되었다. 특히 스낵과자류의 경우 5건의 검체 중에서 5건이 검출이 되었고, 검출량도 0.174ppm에서 0.945ppm 이었다. 나머지 수산물가공품, 식용유지, 기타 건에서는 bound-MCPD가 검출되지 않았다.

많은 참고문헌에서 가수분해를 거치기 전부터 존재하는 3-MCPD 즉 free MCPD와 가수분해를 하고 나서 분석된 bound-MCPD의 비율을 언급하고 있다. 모니터링한 검체들에 대해서 free, bound MCPD가 모두 나온 경우에 대해서 free : bound의 비율을 계산한 것이 Table 5이다.

모든 식품에 있어서 최소값과 최대값이 범위가 다양하게 나오는 것을 알 수 있다. Divinova[5]등의 논문에서는 coffee와 malt에서 조사를 하였고, 0.5~80 배까지 크게 나온 것을 알 수 있다. 모니터링의 결과도 마찬가지로 최대 free MCPD에 비해 bound MCPD가 10배 크게 나온 검체가 있었다. 비율 범위 값을 보면 모든 식품들에 대해서 그 값의 편차가 매우 크다. 이것은 검체마다 free MCPD와 bound MCPD의 양과 분포가 매우 다르다는 것을 의미한다.

요 약

본 연구에서는 식품 중에 bound-MCPD를 측정하기 위해 지방을 추출하고, 메탄올에 녹인 황산으로 60°C, 4hr 가수분해하여 모두 3-MCPD로 전환시켜 분석하는 실험법을 개발하였다. 기존의 논문과 비교하였을때 분석시간이 더 빠르고, 현재 식품공전에 등재된 3-MCPD 시험법에 접목시킨 시험법이다.

분석가능한 선형구간은 3-MCPD로서 10ppb(ug/kg)-2ppm (mg/kg), 이며 반복성이 상대표준편차 5%이내, 재현성의 상대표준편차는 선형구간에서 10%이내이다.

기기적인 LOD는 5.4ppb, LOQ 9.0ppb이며 회수율은 3-MCPD 85.53%, bound-MCPD 82.97% 이다.

Table 5. 3-MCPD vs 3-MCPD fatty esters ratio

B-MCPD /3-MCPD	비율범위	평균 비율	해당건수
소스류	0.96-2.56	1.77	4
식육가공품	1.99	1.99	1
스낵과자류	2.3-10.71	7.13	3
합계	0.96-10.71	3.81	8

참고문헌

1. T. Homonnai, G. Paz, A. Sofer, G.A. Yedwab and P.F. Kraicer,, A direct effect of alpha - chlorohydrin on motility and metabolism of ejaculated human spermatozoa, *Contraception*, **12**, pp579-588 (1975).
2. Jan velisek, Jiri Davidek, Vladislav Kubelka, Gustav Janicek, Zdenka Svobodova, and Zdenka Simicova, New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates, *J.Agric.Food Chem.*, **28**, pp1142-1144 (1980).
3. Janis Cerbulis, Owen W. Parks, Ray H. Liu, Edwin G. Piotrowski, and Harold M. Farrel, Jr., Occurrence of diesters of 3-chloro-1,2-propanediol in the neutral lipid fraction of goats' milk. *J. Agric. Food. chem.*, **32**, pp474-476 (1984).
4. Veronika Divinova, Blanka Svejkovska, Marek Dolezal and Jan Velisek., Determination of free and bound 3-chloropropane-1,2-diol by gas chromatography with mass spectrometric detection using deuterated 3-chloropropane-1,2-diol as internal standard., *Czech J. Food Sci.*, **22**, pp182-189 (2004).
5. Veronika Divinova, Marek Dolezal and Jan Velisek, Free and bound 3-chloropropane-1,2-diol in coffee surrogates and malts. *Czech J. Food Sci*, **25**, pp39~47 (2007).
6. JECFA, *Joint FAO/WHO Expert Committee and Food Additives Fifty-seventh meeting Rome.*, 5-14 June (2001).
7. C.M. Breitling-UtzMann, H. Hrenn, N.U. Haase, G.M. Unbehend., Influence of dough ingredients on 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) formation in toast, *Food. addit. contam*, **22**, pp 97-103 (2005).
8. Z. Zelinkova, B. Svejkovska, J. Velisek, M. Dolezal., Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils, *Food. addit. contam*, **23**, pp 1290-1298 (2006).