

Application News

No. 01-00289-ENK

Gas Chromatograph Mass Spectrometer, GCMS-TQ™8050 NX

분유 중 3-MCPD, 3-MCPD 지방산 에스테르 및 글리시돌 지방산 에스테르의 SIM 및 MRM 분석

SIM and MRM Analysis of 3-MCPD, 3-MCPD Fatty Acid Esters, and Glycidol Fatty Acid Esters in Powdered Milk

■ 서론

모노클로로프로판디올 (Monochloropropanediol, 이하 MCPDs)은 식품 가공 과정에서 오일로부터 생성될 수 있는 화합물이다. 오일에는 지방산에 결합된 MCPD인 MCPD 지방산 에스테르와 체내에서 3-MCPD로 전환되는 글리시돌 지방산 에스테르도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

많은 국가에서 건강 유해성에 대한 우려로 식품 중 MCPD 지방산 에스테르와 글리시돌 지방산 에스테르를 줄이기 위한 노력을 진행하고, 유럽식품안전기구(EFSA)는 2021년 1월 1일부터 2년간 유아용 분유 중 3-MCPD 지방산 에스테르 수치에 대해 보다 엄격한 기준을 설정하는 것을 고려하고 있다.

본 연구에서는 분유 중 3-MCPD, 3-MCPD 지방산 에스테르 및 글리시돌 지방산 에스테르의 SIM 및 MRM 분석을 수행하기 위해 GCMS-TQ8050NX를 사용하였다. 시료는 EFSA의 분석법으로 채택된 AOAC official method 2018.12¹⁾에 기반하여 준비하였다.



그림 1. GCMS-TQ™ 8050 NX

■ 시약준비

- 수산화나트륨/메탄올 용액 (60 g/L)
6.0 g의 수산화나트륨을 100 mL의 메탄올에 용해함
- 브롬화나트륨/인산 수용액 (600 g/L)
60 g의 브롬화나트륨을 100mL의 인산 수용액 (6.5 mL/L)에 용해함
- 페닐보론산 용액 (5.0 mg/mL)
50 mg의 페닐보론산을 10.0 mL의 디에틸에테르에 용해함
- d-3-MCPD 용액 (10 µg/mL)
d-3-MCPD는 메탄올로 10 µg/mL로 준비함
- 검량선용 스톡 용액 (10 µg/mL)
3-MCPD는 메탄올로 10 µg/mL로 제조하였으며, 지방산 에스테르, 3-MCPD-1,2-dioleoyl ester 및 glycidyl oleate는 5 µg/mL로 제조하여 준비함.

■ 3-MCPD 분석

그림 2는 3-MCPD 분석을 위한 전처리 과정을 보여준다. 분유 2.00 g을 칭량하여 메탄올 6.0 mL로 용해하고 65 °C에서 15 분간 초음파 추출하였다. 그 후, 시료를 3000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 이와 동일한 추출 과정을 메탄올/메틸 tert-부틸 에테르(1:1) 용액 및 메틸 tert-부틸 에테르를 사용하여 수행한 후, 각각의 상층액을 합하여 질소로 건조시켰다.

건조된 시료를 황산나트륨 포화 수용액 4.0 mL에 용해시킨 뒤, 2.5 mL의 헥산/tert-부틸 메틸 에테르 (4:1) 혼합물로 액-액 분리(Liquid-Liquid separation)를 2회 수행하여 층분리하였다.

수용액 층의 분유에 존재하는 3-MCPD를 추출하기 위해 2.0 mL의 디에틸 에테르를 이용한 용매 추출 과정을 3 회 수행하였다. 추출된 디에틸 에테르 층에 페닐 보론산 용액을 첨가하여 실온에 5 분 동안 방치한 다음 질소로 완전히 건조시켰다. 마지막으로 건조된 시료에 300 µL의 이소옥탄을 첨가하고, 200 µL의 시료를 바이알에 옮겨 분석하였다.

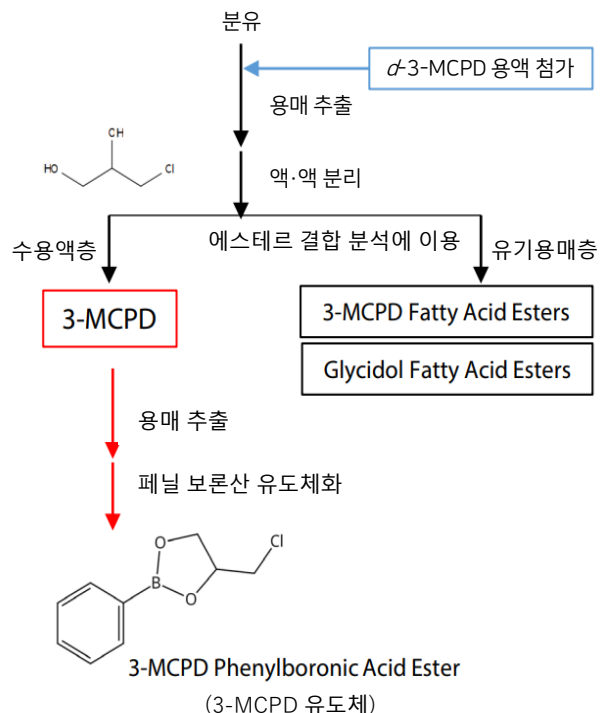


그림 2. 3-MCPD 분석을 위한 시료 전처리

■ 분석조건

Model	GCMS-TQ8050 NX
<u>GC</u>	
Injection Unit Temp.	: 250 °C
Injection Method	: Split
Split Ratio	: 20
Carrier Gas	: He
Carrier Gas Control	: Linear velocity (50 cm/s)
Column	: SH-5MS (30 m × 0.25 mm, I.D. 0.25 μm)
Column Temp.	: 50 °C (20 min) - 10 °C /min - 300 °C (3 min)
<u>MS (Electron Ionization, MRM)</u>	
Ion Source Temp.	: 200 °C
Interface Temp.	: 300 °C
Tuning Mode	: Standard
Measurement Mode	: MRM
	<i>α</i> -3-MCPD 150.0 > 93.0 (CE 12 V)
	3-MCPD 147.0 > 91.1 (CE 12 V)
	3-MBPD 242.0 > 147.2 (CE 15 V)
Event Time:	: 0.3 sec
<u>MS (Electron Ionization, SIM)</u>	
Measurement Mode	: Scan/SIM Simultaneous Measurement
	Scan (m/z 50 to 500)
	<i>α</i> -3-MCPD 201.0, 150.0, 93.0
	3-MCPD 147.0, 146.0, 91.0
	3-MBPD 242.0, 147.0, 91.0
Event Time	SIM (0.3 sec), Scan (0.1 sec)

■ 3-MCPD 표준물질 분석

3-MCPD의 검정곡선은 *α*-3-MCPD 내부 표준용액을 이용한 내부표준법을 이용하였으며, 표준물질은 3-MCPD의 농도가 50, 100, 500 및 1000 ppb에 해당하는 수준으로 페닐 보론산으로 유도체화하여 분석에 이용하였다. 검정곡선과 가장 낮은 농도 (50 ppb)에서의 SIM 및 MRM 크로마토그램을 그림 3에 나타내었다. 해당 농도에서의 SIM 및 MRM 분석에 대한 S/N 비는 각각 125.8, 275.7로 확인되어 두 방법 모두에서 충분한 감도를 얻을 수 있음을 확인하였다.

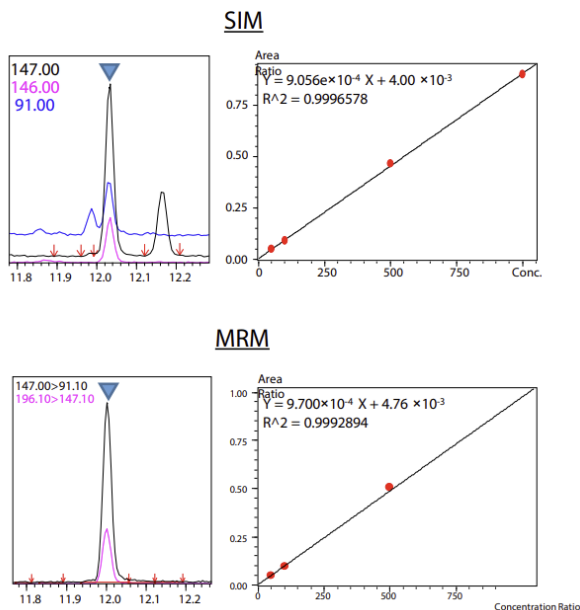


그림 3. 3-MCPD의 검정곡선과 SIM 및 MRM 크로마토그램 (50 ppb)

■ 분유 시료 중 3-MCPD 분석 결과

분유 시료 중 3-MCPD는 약 15 ppb 수준으로 검출되었으며, SIM 및 MRM 크로마토그램은 그림 4와 같다.

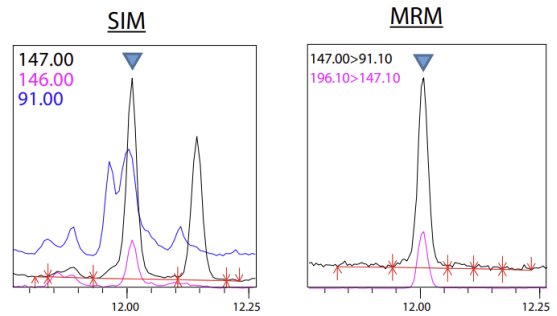


그림 4. 분유 시료 중 3-MCPD의 SIM 및 MRM 크로마토그램

■ 3-MCPD 지방산 에스테르 및 글리시돌 지방산 에스테르 시료의 제조

분유 중 지방산에스테르 결합 분석 성분은 유기용매 층에 존재하기 때문에 이를 질소 건조 시킨 후, 오일을 용해시키기 위해 3.0 mL의 tert-부틸 메틸 에테르를 첨가하였다. 그 다음 수산화나트륨/메탄올 용액 1.4 mL를 첨가하고, -25 °C에서 15~18시간 동안 방치하였다. 브롬화나트륨/인산수용액 2.4 mL를 첨가하여 혼합물을 중화시켜 완전히 혼합한 후, 시료를 두 층으로 분리한 뒤, 질소를 이용해 유기 용매층을 제거하였다. 이 과정 동안 글리시돌과 브롬화나트륨이 반응하여 3-MBPD를 형성한다. 남아있는 오일 성분을 제거하기 위해 헥산을 첨가하고 상등액을 버리는 과정을 3 회 반복하였다. 이때 남은 수용액층의 지방산 에스테르에서 유래된 MCPD와 MBPD는 앞서 언급한 수용액 층에서 사용한 유도체화 분석과정을 동일하게 진행하여 분석에 사용하였다.

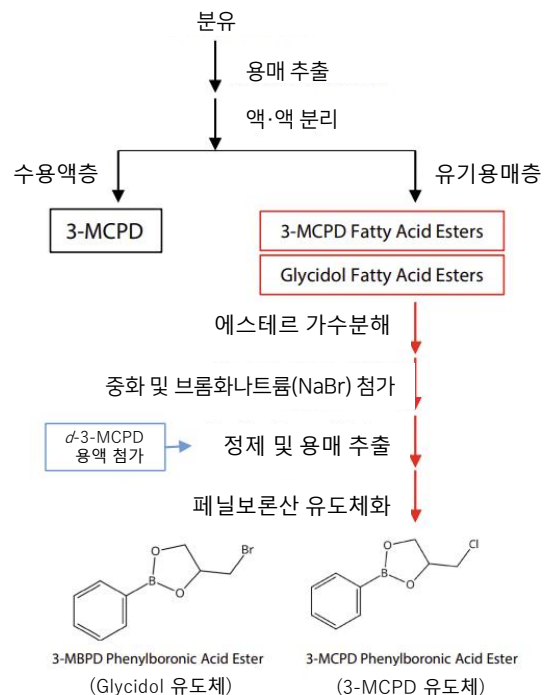
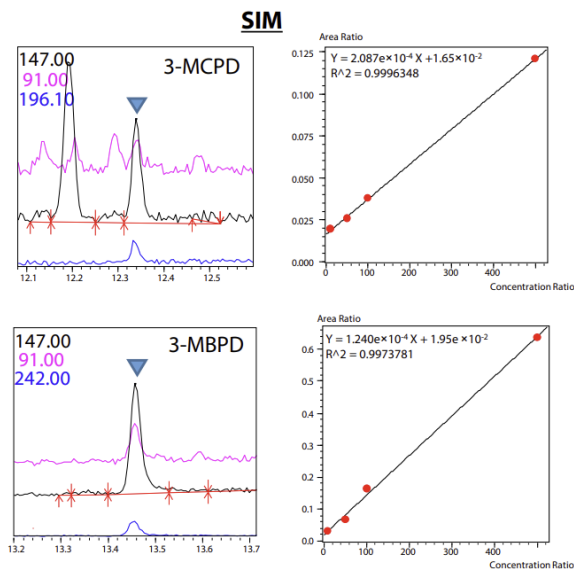


그림 5. MCPD 지방산 에스테르 분석을 위한 시료 전처리

■ 3-MCPD 지방산 에스테르 및 글리시돌 지방산 에스테르 표준물질 분석

3-MCPD 지방산 에스테르 및 글리시돌 지방산 에스테르 표준물질은 분유 중에서 10, 50, 100 및 500 ppb에 해당하도록 페닐보란산으로 유도체화하여 분석하였다. 결과는 α -3-MCPD 내부표준물질을 사용하여 보정하였으며, 검정곡선과 최저 농도 10 ppb에 해당하는 SIM 및 MRM 크로마토그램은 그림 6과 같다.



MRM

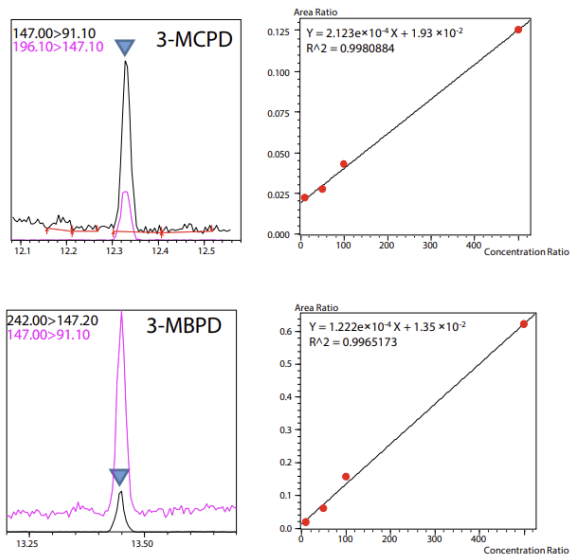
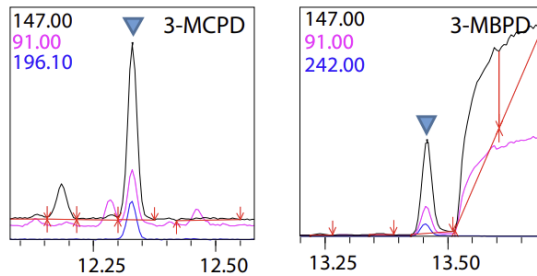


그림 6. MCPD 지방산 에스테르의 검정곡선과 SIM 및 MRM 크로마토그램 (10 ppb)

■ 실제 시료 분석결과

실제 분유 시료 중 MCPD 지방산 에스테르를 분석하여 얻은 SIM 및 MRM 크로마토그램은 아래 그림 7과 같으며, 두 방법 모두 분석 성분에 대해 선택적인 분석을 제공하고 있음을 확인하였다.

SIM



MRM

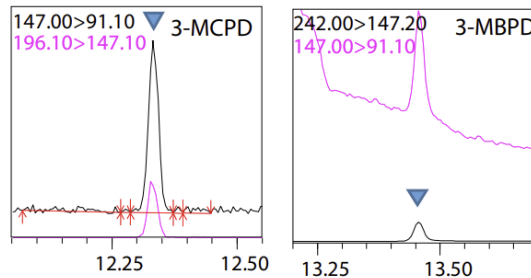


그림 6. 분유 중 MCPD 지방산 에스테르의 SIM 및 MRM 크로마토그램

■ 결론

AOAC법을 바탕으로 분유 시료를 전처리하여 3-MCPD, 3-MCPD 지방산 에스테르 및 글리시돌 지방산 에스테르를 SIM 및 MRM으로 분석한 결과, 두 방법 모두 충분한 수준의 감도를 보이는 것으로 확인되었다. 단, 실제 식품 매트릭스에서 기인하는 오염 성분에 대한 영향은 SIM에 비해 MRM 분석이 비교적 덜 받는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 내부표준 물질로 α -3-MCPD가 사용되었지만, α -3-MCPD-1,2-dioleoyl ester 와 α -glycidyl oleate를 사용하는 것을 추천한다. AOAC법의 GCMS에 대한 세부 조건은 참고문헌을 참조하고, 3-MCPD 외에 2-MCPD도 동일한 시료 전처리 조건으로 정량할 수 있다.

■ 참고문헌

- 1) AOAC Official Method 2018.12 "2-Monochloropropanediol (2-MCPD), 3-Monochloropropanediol (3-MCPD), and Glycidol in Infant and Adult/Pediatric Nutritional Formula"