

사용자 활용 포인트

- ◆ 팜유에서 PAH 추출 및 정제를 위해 탠덤(Tandem) SPE를 이용한 간단한 샘플 전처리
- ◆ GC-MS/MS의 MRM 모드를 이용하여 팜유 안의 PAH를 선택적 고감도 분석 가능

■ 서론

다환방향족탄화수소(PAH)는 주로 유기 물질의 불완전 연소로 형성된 유기 화합물로 발암성, 기형, 돌연변이 유발 등을 일으킬 수 있는 인간의 건강에 유독한 물질이다¹. PAH는 매우 안정적으로 환경과 식품에 존재하게 되는데, 높은 친유성의 성질을 갖고 있으며 식용유를 포함하여 인간의 많은 소비로 인해 식품에 의한 PAH에 노출되는 주요 원인이라고 보고되었다². 2002년 식품과학위원회 (SCF: Scientific Committee on Food)는 잠재적으로 유전독성과 발암성으로 간주될 수 있는 15개의 PAH를 분류했으며³, 2005년 국제식량농업기구/세계보건기구 합동 식품첨가물 전문가위원회 (JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)는 PAH를 목록에 추가하였다. 이 목록은 15+1 EU Priority PAH (EUPAHs)로 알려져 있다.

EU No 835/2011은 이 목록 중에서 식용유에 포함된 benzo[a]pyrene 과 PAH4 (Benzo[a]pyrene, Benz[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene 및 Chrysene)의 합이 각각 최대 2.0 µg/kg 및 10.0 µg/kg으로 규정했다⁴. 본 연구에서는 팜유 중 15+1 PAH의 정성 및 정량 분석을 위해 Shimadzu GCMS-TQ8050 NX를 이용한 MRM 조건을 수립하고 평가하였다.

■ 실험

기기 및 분석 조건

삼중 사중극자 GC-MS/MS 시스템은 GCMS-TQ8050 NX (Shimadzu Corporation, Japan)를 사용하였으며, 기기 및 분석 조건은 표 1과 같다. 각각의 15+1 PAH는 한 개의 MRM 정량이온과 두 개의 MRM 정성이온을 통해 모니터링되었다. MRM 조건, 충돌 에너지(CE)값 및 내부 표준(IS) 그룹화에 대한 자세한 내용은 표 2에 나타났다.

표 1. GC-MS/MS 분석 조건

Instrumentation		
GC-MS/MS system	GCMS-TQ8050 NX	
Auto Injector	AOC-20i+s Plus	
Column	SH-I-PAH (P/N: 227-36074-01) (30 m x 0.25 mm x 0.10 µm)	
Gas Chromatograph		
Injection Condition	330 °C, splitless mode	
Split Ratio Program	Time	Split Ratio
	3.00	90
	8.00	20
Injection Volume	1 µL	
Carrier Gas	Helium	
Gas Flow Condition	Constant linear velocity mode Linear velocity 50.0 cm/s Purge flow 3.0 mL/min	
High Pressure Injection	2 min at 250 kPa	
Column Temperature Program	110 °C (1min) → 30 °C/min to 240 °C (2 min) → 3 °C/min to 270 °C (2 min) → 8 °C/min to 340 °C (8 min)	
Mass Spectrometer		
Ion Source Temperature	230 °C	
Interface Temperature	300 °C	
Solvent Cut Time	3 min	
Acquisition Mode	MRM	

표 2. PAH 및 내부표준물질의 MRM 전이, 충돌 에너지 (CE) 조건

Compound name	IS Grp	Target transition	CE (V)	Reference transition	CE (V)
Benzo[c]fluorene	1	216.10>215.10	22	216.10>189.10	30
Benz[a]anthracene	1	228.10>226.10	28	228.10>202.10	26
Chrysene-D12 (IS)	1	240.20>236.20	28	240.20>238.20	26
Cyclopenta[c,d]pyrene	1	226.10>224.10	38	226.10>200.10	30
Chrysene	1	228.10>226.10	28	228.10>202.10	26
5-Methylchrysene	1	242.10>239.10	32	242.10>215.10	22
Benzo[b]fluoranthene	2	252.10>250.10	28	252.10>226.10	30
Benzo[j]fluoranthene	2	252.10>250.10	30	252.10>226.10	30
Benzo[k]fluoranthene	2	252.10>250.10	30	252.10>226.10	30
Benzo[a]pyrene	2	252.10>250.10	30	252.10>226.10	24
Perylene-D12 (IS)	2	264.20>260.20	47	264.20>262.20	44
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	2	276.10>274.10	34	276.10>250.10	30
Dibenz[a,h]anthracene	2	278.10>276.10	30	278.10>252.10	30
Benzo[g,h,i]perylene	2	276.10>274.10	32	276.10>275.10	28
Dibenzo[a,l]pyrene	2	302.10>300.10	36	302.10>298.10	60
Dibenzo[a,e]pyrene	2	302.10>300.10	36	302.10>276.10	28
Dibenzo[a,i]pyrene	2	302.10>300.10	36	302.10>276.10	28
Dibenzo[a,h]pyrene	2	302.10>300.10	36	302.10>276.10	28

표준용액 및 시료 준비

EU 15+1 PAH 혼합 표준용액 (100 mg/L)은 Restek Corporation (USA)에서 구매했으며, 내부표준물질 Chrysene-D12, Perylene-D12는 Cambridge Isotope Laboratories Inc., (USA)에서 구매하였다.

매트릭스 바탕시료는 Xu et al.의 문헌을 참고하여 Merck KGaA.사에서 구입한 SupelMIP® SPE-PAHS (50 mg/3 mL)와 Supelclean™ ENVI-Carb™ (500 mg/ 6 mL) SPE를 함께 연결한 탠덤 SPE 정제법을 사용하였다¹. SupelMIP® SPE-PAHS와 Supelclean ENVI-Carb SPE는 각각 Cyclohexane 3, 6 mL로 conditioning 하여 준비하였다. 샘플인 팜유는 0.5 mL를 Cyclohexane 0.5 mL와 혼합한 후, SupelMIP SPE-PAHS (상단) Supelclean ENVI-Carb SPE (하단)에 위치하도록 연결한 후 0.1 mL/min의 유속으로 loading하였다. Cyclohexane 1 mL (3회)를 이용해 카트리지를 washing하고, 두개의 카트리지 위치를 바꿔준 후 5% Toluene (in Ethyl acetate) 용액 8 mL로 용리하였다. 용리액은 최종 1 mL의 볼륨이 되도록 TurboVap® (Biotage Sweden)를 사용하여 농축하였다.

PAH 표준용액은 10 mg/L, 내부표준용액 Chrysene-D12와 Perylene-D12는 100 µg/L 농도가 되도록 Toluene을 이용하여 준비한다. 매트릭스 바탕시료를 이용하여 내부표준물질을 포함한 표준용액을 제조하였으며, 제조된 PAH 표준용액의 농도는 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 µg/L (팜유 사용 무게에 따라 0.447-22.346 µg/kg)이었다. 내부표준용액의 농도는 Chrysene-D12와 Perylene-D12 모두 5 µg/L로 각각의 표준용액에 포함되었다.

회수를 평가를 위해 샘플 추출 전 단계에서 PAH 표준용액과 내부표준용액을 매트릭스 바탕시료에 첨가 후 진행하였다.

■ GC-MS/MS 를 이용한 PAH 분석 결과

검출 및 분리

EU 15+1 PAH는 GC-MS/MS를 이용한 SH-I-PAH 컬럼에서 분리하였으며, 모든 성분들의 크로마토그램은 그림 1, 내부표준용액 Chrysene-D12와 Perylene-D12는 그림 2에 나타났다.

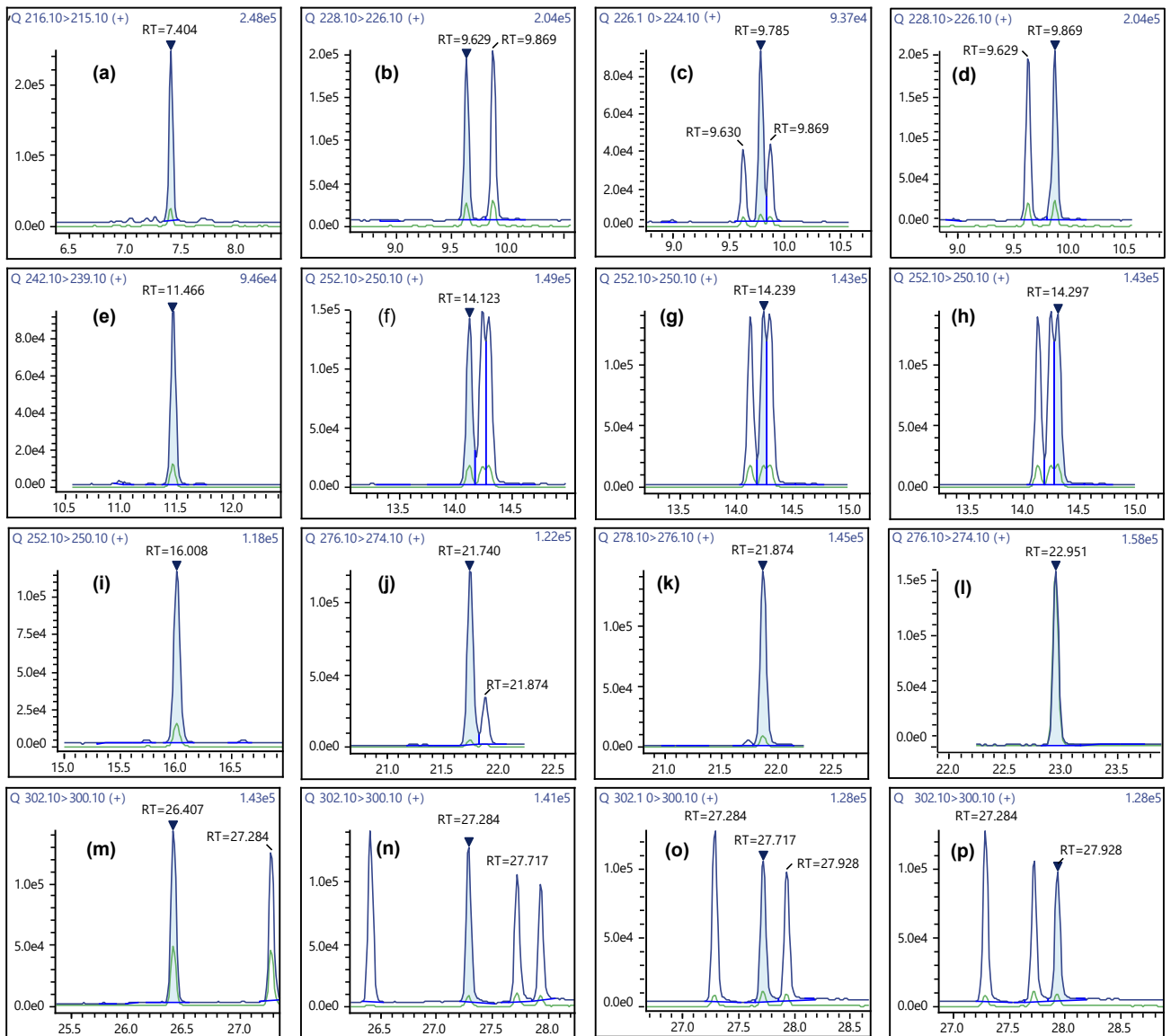


그림 1. PAH 5 µg/L 크로마토그램 (a) Benzo[c]fluorene, (b) Benz[a]anthracene, (c) Cyclopenta[cd]pyrene, (d) Chrysene, (e) 5-Methylchrysene, (f) Benzo[b]fluoranthene, (g) Benzo[j]fluoranthene, (h) Benzo[k]fluoranthene, (i) Benzo[a]pyrene, (j) Indeno[1,2,3-cd]pyrene, (k) Dibenz[a,h]anthracene, (l) Benzo[ghi]perylene, (m) Dibenzo[a,l]pyrene, (n) Dibenzo[a,e]pyrene, (o) Dibenzo[a,i]pyrene, (p) Dibenzo[a,h]pyrene

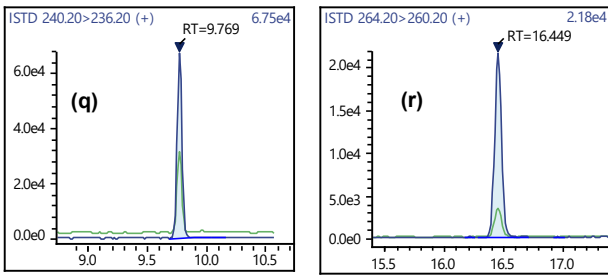


그림 2. 내부표준용액 5 µg/L 의 크로마토그램 (q) Chrysene-D12 (r) Perylene-D12

검정곡선 농도 및 직선성

15+1 PAH 표준용액에 매트릭스 바탕시료를 이용하여 내부표준물질 검정곡선을 측정한 농도 범위는 표 3과 같다. 모든 PAH 검정곡선의 직선성(R²)은 0.9979 (표 3) 이상으로 우수했으며, EU에서 규정된 PAH4 성분인 Benzo[a]pyrene, Benz[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene 그리고 Chrysene 에 대한 검정곡선은 그림 3과 같다.

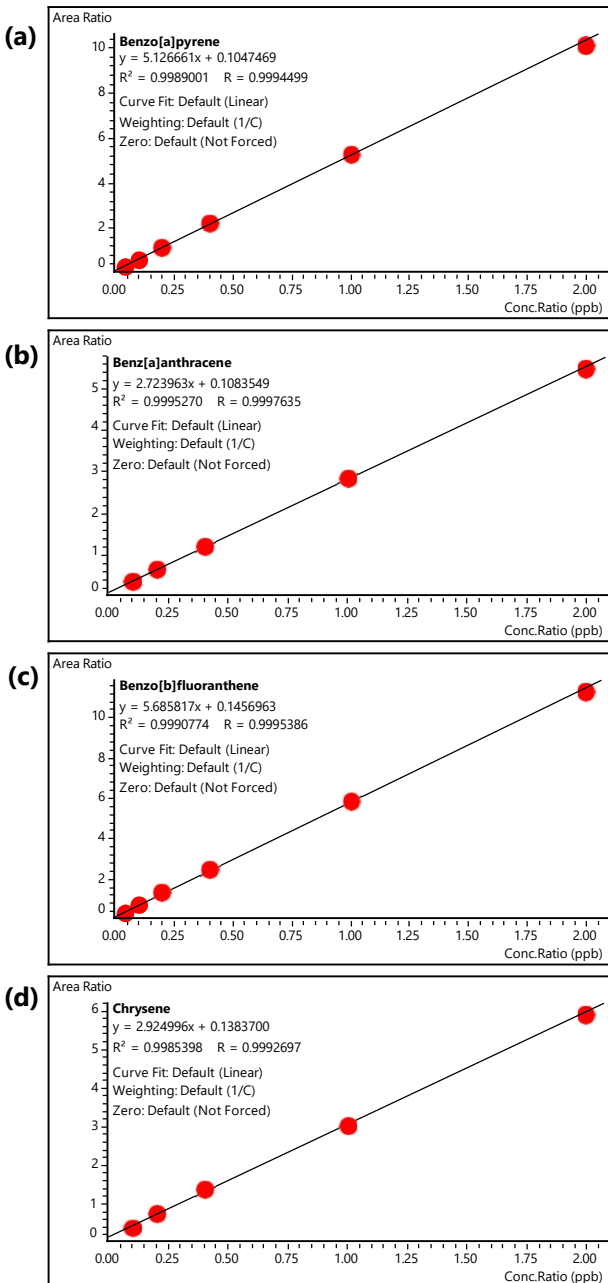


그림 3. 내부표준법 검량곡선 (a) Benzo[a]pyrene, (b) Benz[a]anthracene, (c) Benzo[b]fluoranthene, (d) Chrysene.

표 3. 15+1 PAH의 검정곡선 농도 및 직선성 (R²)

Compound name	Calibration range (µg/L)	R ²
Benzo[c]fluorene	1.0 – 10	0.9994
Benz[a]anthracene	0.5 – 10	0.9995
Cyclopenta[c,d]pyrene	0.5 – 10	0.9997
Chrysene	0.5 – 10	0.9985
5-Methylchrysene	0.2 – 10	0.9993
Benzo[b]fluoranthene	0.2 – 10	0.9991
Benzo[j]fluoranthene	0.2 – 10	0.9987
Benzo[k]fluoranthene	0.2 – 10	0.9985
Benzo[a]pyrene	0.2 – 10	0.9989
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.2 – 10	0.9988
Dibenz[a,h]anthracene	0.2 – 10	0.9990
Benzo[g,h,i]perylene	0.2 – 10	0.9991
Dibenzo[a,l]pyrene	0.2 – 10	0.9986
Dibenzo[a,e]pyrene	0.2 – 10	0.9981
Dibenzo[a,i]pyrene	0.2 – 10	0.9979
Dibenzo[a,h]pyrene	0.5 – 10	0.9988

팜유 샘플의 정량 및 회수율

팜유 샘플의 PAH 정량은 내부표준용액이 첨가된 매트릭스 바탕시료를 분석하였는데, 15+1 PAH 모두 검출되지 않았다. 회수율 평가를 위해 탠덤 SPE 정제 전에 매트릭스 바탕시료에 5 µg/L (팜유 11.173 µg/kg에 상당)의 내부표준물질 2종과 PAH 표준용액이 첨가되었다. PAH의 회수율은 76.15%-88.11 %로 EU No 836/2011 (회수율 50%-120% 사이)⁵에 적합한 결과가 나왔으며, 표 4에 나타났다.

Chrysene과 같은 MRM 전이를 가지고 있는 Triphenylene은 Chrysene 정량과정에서 간섭이 될 수 있다는 점에 주목하여, Chrysene 농도가 규정 상한을 초과할 경우 정량을 확인하기 위해 다른 컬럼을 사용하는 방법을 권장한다.

표 4. PAH가 첨가된 팜유 샘플의 15+1 PAH 정량 결과 및 회수율

Compound name	Concentration (µg/kg)	Recovery (%)
Benzo[c]fluorene	6.530	58.44
Benz[a]anthracene	8.508	76.15
Cyclopenta[c,d]pyrene	10.326	92.42
Chrysene	9.846	88.11
5-Methylchrysene	9.125	81.67
Benzo[b]fluoranthene	8.985	80.42
Benzo[j]fluoranthene	8.262	73.95
Benzo[k]fluoranthene	9.489	84.93
Benzo[a]pyrene	9.353	83.71
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	9.448	84.56
Dibenz[a,h]anthracene	9.493	84.96
Benzo[g,h,i]perylene	9.450	84.57
Dibenzo[a,l]pyrene	9.010	80.64
Dibenzo[a,e]pyrene	9.643	86.30
Dibenzo[a,i]pyrene	9.856	88.21
Dibenzo[a,h]pyrene	9.259	82.86

검출 한계 (LOD)

검량곡선의 가장 낮은 농도에서 PAH의 LOD (Cal. LOD)는 아래 식을 이용하여 계산되었다.

$$Cal. LOD = \frac{Conc. of the Lowest Calib Std}{Signal - to - Noise Value} \times 3$$

팜유 샘플의 모든 15+1 PAH 의 LODs는 0.038-0.327 µg/kg 범위로 나타났으며(표 5) EU 에서 규정한 Benzo[a]pyrene, Benz[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene 그리고 Chrysene (PAH4) 의 LODs는 0.071-0.157 µg/kg 범위로 EU No 836/2011⁵ 에 명시된 기준 ≤ 0.30 µg/kg 을 충족하였다.

이 결과는 팜유에서 저농도의 PAH를 검출하는데 MRM 분석법이 적합하다는 것을 보여준다.

정량 한계 (LOQ)

정량한계 (LOQ)는 LOD의 3.33배로 계산되었으며, 15+1 PAH의 LOQs는 0.127-1.090 µg/kg 범위로 계산되었다(표 5).

EU 에서 규정된 PAH4 의 LOQs는 0.236-0.522 µg/kg 범위였으며, 이는 EU No 836/2011⁵에 명시된 기준 ≤ 0.9 µg/kg 을 충족하였다. 이는 팜유의 PAH를 규정된 한도 내에서 정량화 하는데 MRM 분석법이 적합하다는 것을 보여준다.

반복성

분석법의 정밀도 평가는 매트릭스를 포함한 표준용액 저농도 (0.5 µg/L)와 중간농도 (5 µg/L)를 8회 반복 측정 결과 내부표준물질에 대한 PAH의 면적비 %RSD 는 저농도 및 중간농도에서 각각 <8%와 <5% 였다(표 5). 또한, 시험법의 안정성 및 정밀도를 확인하기 위해 표준용액 5 µg/L을 48시간 내에 72회 분석한 결과, 모든 PAH의 내부표준물질에 대한 피크 면적비 %RSD는 Dibenzo[a,i]pyrene (<8%)을 제외하고 <5% 이내였다(표 5). 이러한 결과는 최적화된 MRM 방법이 높은 안정성과 분석 정밀도를 가지고 있음을 보여준다.

표 5. LOQ, LOD 및 저농도 (0.5 µg/L), 중간농도 (5 µg/L) 에서의 반복 측정 결과

Compound name	Cal. LOD (µg/kg) in oil sample	Cal. LOQ (µg/kg) in oil sample	Area ratio %RSD of 0.5 µg/L solution (n=8)	Area ratio %RSD of 5 µg/L solution (n=8)	Area ratio %RSD of 5 µg/L solution (n=72)
Benzo[c]fluorene	0.327	1.090	6.2	1.5	2.2
Benz[a]anthracene	0.176	0.588	5.3	1.6	2.4
Cyclopenta[c,d]pyrene	0.157	0.522	3.1	1.5	4.2
Chrysene	0.175	0.583	5.9	2.0	3.2
5-Methylchrysene	0.112	0.373	2.8	1.6	2.4
Benzo[b]fluoranthene	0.088	0.293	3.0	1.8	2.7
Benzo[j]fluoranthene	0.077	0.256	5.2	4.1	4.3
Benzo[k]fluoranthene	0.077	0.255	5.1	3.9	4.8
Benzo[a]pyrene	0.071	0.236	4.0	2.1	2.8
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.049	0.163	1.4	2.2	2.3
Dibenz[a,h]anthracene	0.045	0.150	1.9	1.7	2.6
Benzo[g,h,i]perylene	0.038	0.127	2.7	2.2	2.5
Dibenzo[a,l]pyrene	0.107	0.358	7.3	3.4	4.4
Dibenzo[a,e]pyrene	0.127	0.423	7.2	2.4	3.7
Dibenzo[a,i]pyrene	0.114	0.378	5.3	3.0	7.9
Dibenzo[a,h]pyrene	0.137	0.458	5.3	3.0	4.3

■ 결론

본 뉴스레터는 팜유 내 다환방향족탄화수소 (PAH) 분석을 위해 탠덤 SPE 를 이용한 샘플 전처리 방법과 Shimadzu GCMS-TQ8050 NX 를 사용한 MRM 분석법을 소개한다. 이 분석법은 팜유 내 15+1 PAH 에 대해 LOD 및 LOQ 가 각각 0.071 µg/kg, 0.127 µg/kg 의 낮은 농도까지 검출 및 정량이 가능하다는 것을 보여준다. 내부표준 검량선의 R² 은 0.9979 이상으로 우수한 직선성을 나타냈다. 높은 감도 및 선택성과 함께, 최적화된 MRM 조건은 검량선의 저농도 및 중간농도에서 각각 <5% 와 <8% 의 재현성 (n=8)을 나타냈다.

■ References

1. Xu, T. et al, Simultaneous Determination of 24 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Oil by Tandem Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography Coupled/Tandem Mass Spectrometry, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 98(2), 529-537.
2. Zacs, D. et al, Multi-walled carbon nanotubes as effective sorbents for rapid analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils using dispersive solid-phase extraction (d-SPE) and gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), *Food Analytical Methods* (11), 2508–2517
3. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2007-136), *The EFSA Journal* (2008) 724, 1-114.
4. Commission Regulation (EU) No 835/2011
5. Commission Regulation (EU) No 836/2011