

Application News

No. 01-00450-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8050

LC-MS/MS를 이용한 식품 및 음료 중 아황산염의 정량 분석

Sulfite Quantification in Foods and Beverages Using Triple Quadrupole LC-MS/MS

사용자 활용 포인트

- ◆ 다양한 식품 및 음료에 항산화제로 첨가되는 아황산염을 신속하게 분석할 수 있다.
- ◆ 정량 범위가 넓어 아황산염 함량이 높은 시료를 재분석할 필요성이 줄어든다.
- ◆ 미국 FDA 방법(C-004.03)을 기반으로 한 분석법으로 우수한 정량성을 달성하였다.

■ 서론

아황산염은 다양한 식품에서 항산화제 및 표백제로 사용되는 가장 일반적인 식품 첨가물 중 하나이다. 아황산염은 건조 과일과 야채, 냉동 새우, 주스, 와인을 포함한 다양한 제품에 첨가된다. 매우 유용한 식품 첨가물이지만 아황산염이 함유된 제품을 섭취하면 경우에 따라 알레르기과 유사한 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 미국 식품의약국(FDA)에서는 아황산염 함량이 10 mg/kg 이상인 식품에 표시를 요구하고 있으며, 아황산염의 정량 분석법도 발표했다^{1,2,3}. 위의 FDA 분석법을 참고하여 UHPLC 기반의 LC-MS/MS를 이용하여 짧은 분석 시간으로 식품 및 음료 중 아황산염을 정량하는 분석법을 개발하였다.

이 분석법에서는 불안정한 유리 아황산염이 0.2% 포름알데히드 용액에 의해 변환되어 하이드록시메틸설포네이트(HMS)로 검출되었다. 정량분석은 Nexera™ UHPLC가 장착된 삼중 사중극자 질량분석기인 LCMS-8050을 사용하여 수행하였다. 건조 과일(건포도, 망고), 레드 와인, 화이트 와인의 경우에 10 mg/kg 와 그 이하의 농도에서 양호한 회수율 결과를 얻었으며, 이 농도는 대부분 국가의 표시 기준과도 부합하는 수준이다.

■ 분석 조건

0.2% 포름알데히드 용액: 50 mM 암모늄 아세테이트(pH 4.5로 아세트산으로 조정)를 함유한 2% 포름알데히드를 물로 10배 희석하여 추출 용액으로 사용했다.

건조 과일 샘플 전처리: 각각의 건조 과일 샘플(25 g)을 0.2% 포름알데히드 용액 50 mL와 혼합한 후 블렌더로 2분 간 분쇄하였다. 0.2% 포름알데히드 용액 20 mL를 균질액 15 g에 첨가하고 진탕기로 10분 간 교반 후 8분 간 초음파 처리하였다. 4000xg에서 10분 간 원심분리 후, 경사분리법을 통해 상층액을 새로운 원심분리 튜브로 옮긴다. 침전물에 추출 용액 20 mL를 추가로 첨가한 후 교반, 초음파 처리 및 원심분리 단계를 반복하였다. 상층액을 혼합하고 추출 용액을 50 mL까지 채웠다.

와인 샘플 준비: 각 와인 샘플(1 g)을 0.2% 포름알데히드 용액으로 10 mL로 희석한다.

SPE 정제 및 가열 유도체화: 샘플 추출물을 C18 SPE 카트리지로 정제하여 모든 친유성 매트릭스 성분을 제거하고 용리액을 가열하여 모든 아황산염-카르보닐 부가물을 HMS 부가물로 전환한다.

C18 SPE 카트리지(InertSep C18, 500 mg/6 mL, GL Sciences)를 SPE 진공 매니폴드를 사용하여 디클로로메탄, 메탄올 및 0.2% 포름알데히드 용액 각각 3 mL로 차례로 세척한다. 카트리지를 통과한 처음 2 mL의 샘플 용출액은 버리고 다음 2 mL의 샘플 추출물을 채취하였다.

용출액을 80°C에서 30분 간 가열한 후 실온으로 냉각하였다.

LC-MS/MS 분석: 냉각된 용출액 100 µL에 5 µg/mL의 Na₂³⁴SO₃ 내부표준용액 50 µL와 아세토니트릴 350 µL을 혼합하였다. 침전이 발생하는 경우, 용액을 0.2 µm PTFE filter로 여과하였다. LC-MS/MS 분석 조건 및 MRM 조건은 표 1과 표 2에 나타내었다.

표 1. LC-MS/MS 분석조건

HPLC conditions (Nexera X3)	
Column	: SeQuant ZIC HILIC (150 mm L x 2.1 mm I.D., 5 µm)
Mobile phase A	: 10 mM ammonium acetate / 90% Acetonitrile / Water
Mobile phase B	: 10 mM ammonium acetate / 50% Acetonitrile / Water
Flow rate	: 0.3 mL/min
Gradient Program	: B 30%(0-1 min) - 70% (3-5.5 min) - 100% (5.51 - 7.75 min) - 30% (8-12 min) The flow was loaded into the mass spectrometer between 3 to 5.5 min using a flow switching valve.
Column Temp.	: 40 °C
Injection volume	: 2 µL
MS conditions (LCMS-8050)	
Ionization	: ESI, Negative mode
Nebulizing gas	: 2.5 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp.	: 150 °C
Interface Temp.	: 200 °C
Heat Block Temp.	: 500 °C
Probe position	: +4 mm

표 2. MRM 조건

Compound	MRM transition	Collision (V)	Purpose
HMS	111.00>81.00	13.0	Quantification
	111.00>80.00	27.0	Reference
HMS(³⁴ S)	113.00>83.00	13.0	Quantification
	113.00>82.00	27.0	Reference

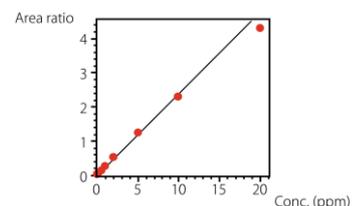


그림 1. HMS의 검량선

■ 검량선과 MS 크로마토그램

프로브 위치를 더 멀리 이동시키면 검량선의 선형성을 유지하며 정량 한계를 20 ppm으로 높일 수 있다. 이를 통해 샘플 희석과 관련된 노동력을 절약할 수 있다. 검량선은 그림 1과 같다. 또한 시간 프로그램을 조정하여 분석 시간을 24분에서 12분으로 줄였다.

■ 정량과 회수율 시험

아황산염은 건포도, 살구, 망고 2종, 레드 와인 2종, 화이트 와인 2종에서 정량 되었다. 정량 결과를 표 3에 나타내었다. 살구의 경우 SPE 카트리지가 용출액을 0.2% 포름알데히드 용출액으로 10배 희석한 후 내부표준품과 아세트니트릴을 혼합하여 LC-MS/MS 분석하였으며, 다른 샘플들은 추가적인 희석없이 LC-MS/MS로 분석하였다.

회수율 시험에는 아황산염이 없거나 낮은 농도 수준의 4개 샘플이 사용되었다. Na₂SO₃를 첨가한 후 추출 및 SPE 카트리지가 정제를 수행했다. 결과를 표 4에 나타내었다. 첨가량은 10 µg SO₂/g 이하일 때 모든 샘플에서 양호한 회수율을 얻었다. 또한 1 µg SO₂/g에서도 레드 와인의 우수한 회수율을 보였다.

■ 요약

이 뉴스레터에서는 건조 과일과 와인 중 아황산염 분석에 대해 소개하였다. 표시 의무 기준인 10 mg/kg 이하에서 양호한 회수율을 나타냈다. 또한 이 분석법은 정량 범위가 넓기 때문에 아황산염 농도가 높은 시료의 경우 희석 단계를 줄일 수 있다.

표 3. 건조 과일과 와인 중 아황산염 정량 결과

식품/음료	HMS 농도 (ppm)	SO ₂ 변환 값 (µg/g 식품)
건포도	(0.000)	(0.00)
망고 1	(0.004)	(0.11)
망고 2	16.27	413
살구	40.97	1041
레드 와인 1	(0.001)	(0.02)
레드 와인 2	1.40	36
화이트 와인 1	1.50	38
화이트 와인 2	3.96	101

표 4. 회수율 결과 (%)

식품/음료	첨가 농도 (µg SO ₂ /g 식품)		
	1	5	10
건포도		99.2	96.3
망고 1	99.7	84.9	91.2
망고 2		104.0	103.0
살구		95.2	100.5

■ 참고문헌

- [1] U.S. Food and Drug Administration (2016). Code of federal regulations: Part 101.100(a)(4), Title 21. Washington DC: Office of the Federal Register.
- [2] Carlos, K. S., & de Jager, L. S. (2017). Determination of sulfite in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Collaborative study. Journal of AOAC International, 100(6), 1785-1794.
- [3] U.S. Food and Drug Administration (2021). Method number: C-004.03, Determination of Sulfites in Food using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

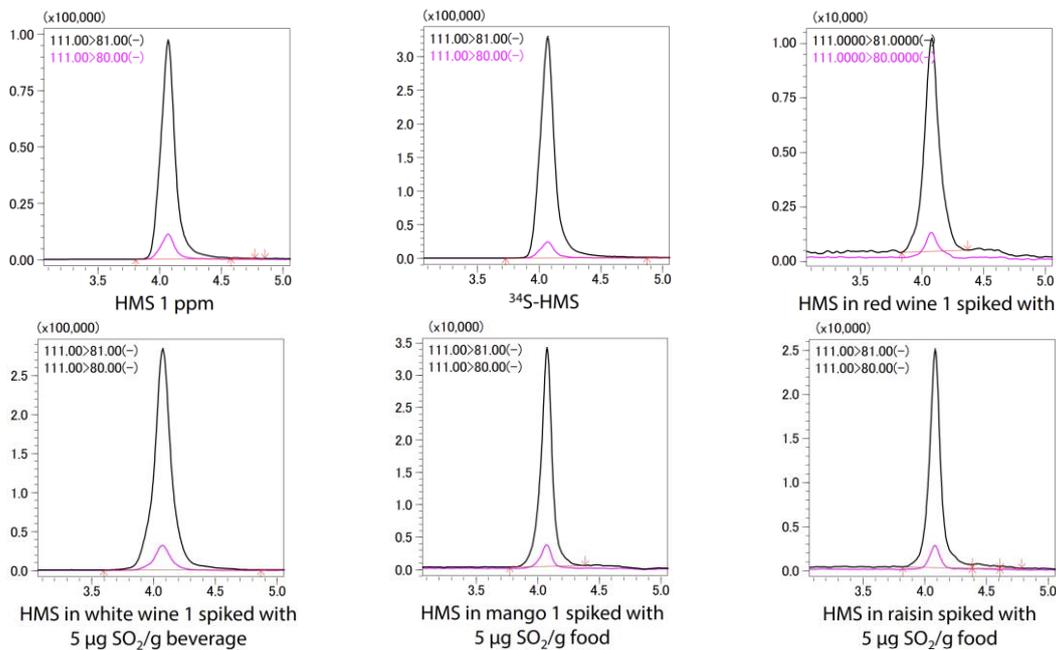


그림 2. HMS와 내부표준물질의 MS 크로마토그램

