KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 29, No. 1, pp. 183~187 (1997)

연구노트

고체상 추출에 의한 1,3-dichloro-2-propanol과 3-chloro-1,2-propanediol의 분석

채희정 · 인만진 · 김민홍 · 한금수
(주)미원 중앙연구소

Analysis of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol by Solid Phase Extraction

Hee Jeong Chae, Man-Jin In, Min-Hong Kim and Keum-Soo Han
R&D Center, Miwon Co., Ltd.

Abstract

The analytical conditions of 1,3-dichloro-2-propanol (DCP) and 3-chloro-1,2-propanediol (MCPD) by solid phase extraction were optimized to improve recovery. Selected-ion monitoring technique which was used for GC-MS analysis of both compounds gave substantially higher sensitivity. The detection limits of DCP and MCPD were 25 and 50 ppb, respectively. The effects of extraction column type, elution solvent and salt concentration on recovery were examined. A normal phase column was better than a reverse phase column in solid phase extraction of DCP and MCPD. It was explained in terms of polarity relationship of solvent-solute-solid phase. A maximum recovery was obtained at the salt concentration of 20% (w/v). Water-immiscible and chloropropanol-soluble solvents such as chloroform, diethyl ether, hexane and ethyl acetate were tested for elution solvent. Hexane and ethyl acetate were the most suitable solvents for the extraction of DCP and MCPD, respectively. High recovery better than 95% was obtained with the selected solvents.

서 론

1980년대 중반 산분해 HVP (hydrolyzed vegetable protein)의 제조 과정에서 부생하는 1,3-dichloro-2-propanol (DCP)과 3-chloro-1,2-propanediol (MCPD)의 존재가 알려지고 유해성 논란이 제기되면서 많은 관심이 집중되고 있다[1-3]. 현재 International Hydrolysed Protein Council (IHPC)에 의해 산분해 HVP 내의 MCPD의 수준이 모니터링되고 있으며[4] 구미 각국 식품업계의 자율적인 노력의 결과로 산분해 HVP 내의 MCPD와 DCP함량이 감소 추세에 있다.

조미식품 중의 DCP와 MCPD 함유량을 분석하기 위해 GC와 GC-MS를 이용한 방법이 소개된 바 있으며[5-7] 아직까지는 검출 한계가 충분히 낮지 못하며 분석법이 완벽하게 정형화되어 있지 못한 상태이다. 현재 IHPC에 의해 인증된 MCPD의 분석법은 GC-ECD를 기반으로 하고 1 ppm의 감도와 98~102%의 높은 회수율을 특징으로 갖는데[4] 이보다 더 우수한 감도를 갖는 분석법이 필요하다. 현행 유럽 식품업체들의 검출수준은 0.5 ppm이며 검출 한계를 낮추기 위한 다양한 시도들이 추진되고 있다. 유도체를 만들어 GC-ECD에 의해 분석하는 방법은 분석 오차가 큰 단점을 갖고 있으며, 그 대신에 신뢰할 만한 분석법으로서 GC-MS법이 추천되고 있다[6]. MS의 검출 조건이 일반적인 GC에 비해 비교적 까다롭고 시료의 전처리 조건에 따라 분석 데이타가 크게 영향을 받기 때문에 데이타의 신뢰성을 확보하기 위하여 정확성/정밀성이 검증된 방법이 필요하다. 특히 분석 대상에 고형분이 많이 함유된 제품인 경우에는 별도의 시료 전처리 과정이 필요하다.

본 연구에서는 검출 감도가 높으며 분석 물질의 확인까지 가능한 GC-MS를 이용한 분석을 소개하고자 한다. 고체상 추출 칼럼의 종류와 추출 유기용매의 종류에 의한 영향을 고찰하였으며 최적 추출 조건을 연구하였다.

Corresponding author: Hee Jeong Chae, R&D Center, Miwon Co., LTD.,125-8 Pyokyo-ri, Majang-myun, Icheon, Kyoungki-do 467-810, Korea

재료 및 방법

재료

고체상 추출 칼럼으로는 Merck사(독일)의 Extrelut-

20과 Waters사(미국)의 Sep-Pck C18 카트리지를 사용하였다. 분석 대상 물질인 3-chloro-1,2-propanediol (MCPD)과1,3-dichloro-2-propanol (DCP)의 표준품은 TCI사(일본)의 제품을 사용하였다.

고체상 추출

고체상 추출용(solid phase extraction) 칼럼인 Extrelut-20의 배출구에 스텐레스제 주사기 바늘 (24 게이지)을 부착하고 용매 도입구에는 400 mL 용량의 깔대기(별도 제작)를 부착하였다. 부착 부위는 테프론 테이프로 완벽하게 밀봉하였다. DCP와 MCPD 표준품 (10~250 ppm) 20 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 20% (w/v)의 염화나트륨 수용액을 10 mL 첨가하여 볼텍스 교반기(vortex agitator)로 교반하였다. 이 액을 Extrelut-20 칼럼에 붓고 20분 가량 상압 하에 방치하였다. Sep-Pak C18을 사용할 경우에는 사용 전에 메탄올로 습윤시킨 후 유리 주사기를 이용, 가압 하에 용매를 흘려 보내는 방식을 사용하였다. 1차로 DCP를 헥산 80 mL로 추출하고 무수 sodium sulfate (Na_2SO_4)로 탈수하여 GC-MS의 분석 시료로 사용하였다. 2차로 에틸 아세테이트 200 mL로 MCPD를 추출하여 동일하게 시료를 준비하였다.

GC-MS 분석

DCP와 MCPD의 분리를 위하여 DB-5 모세관 칼럼 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)이 장착된 GC (Hewlett Packard, HP5890A)를 이용하였고 검출기는 JEOL사(일본)의 질량분석기(MS)로 AX505WA모델을 이용하였다. 이동상 기체는 헬륨(He)을 사용하였고 주입구의 온도는 250°C로 하고, 칼럼 온도는 50°C에서 120°C까지 5°C/분의 속도로 승온하였다.

결과 및 고찰

GC-MS 검출 조건 확립

표준 물질을 갖고 GC-MS분석을 실시하여 MS Library에 있는 스펙트럼 데이타베이스와 비교한 결과 5.1분과 6.2분의 피크가 각각 DCP와 MCPD임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 두 물질에 대한 질량분석 스펙트럼을 Fig. 2에 나타내었다. 정량분석을 위해서 DCP의 경우 79 m/z에서, MCPD의 경우 61 m/z에서 특성 이온(characteristic ion)을 SIM(selected ion monitoring)모드로 모니터링하였다. 이 때 DCP와 MCPD의 검출 한계는 각각 25 ppb와 50 ppb이었다. 이는 IHPC에서 개발한 GC-ECD법의 MCPD 검출 한계인 1 ppm에 비해 월등히 높은 감도의 검출 한계이며[4] Van Bergen 등[6]의 GC-MS분석법을 이용한 MCPD의 검출 한계인 50~100 ppb와 견줄만 한 결과이다.

추출 용매의 선정

Extrelut-20에 사용 가능한 유기용매는 물과 섞이지 않아야 하며 추출하고자 하는 DCP와 MCPD에 대한 용해도가 높아야 한다. 따라서 사용 가능한 유기용매는 에틸 아세테이트, 에테르, 클로로포름과 헥산 등이며, 단일 용매 또는 이들 혼합 용매의 극성을 용매 선택의 주요인자로 하여 용매를 준비하였다. 극성의 지표로서 logP (P는 유기용매의 n-octanol과 물 간의 분배계수)를 사용하였는데[8] logP가 작을수록 극성이 큰 용매임을 의미한다. 혼합 용매의 경우는 아래의 식에 의거 logP를 계산하였다.

$$\log P \text{ of solvent mixture} = x_1 \cdot \log P_1 + x_2 \cdot \log P_2$$

여기서 x_1와 x_2는 각 성분의 몰 비, $\log P_1$와 $\log P_2$는 각 성분의 logP.

고체상 추출 칼럼의 종류에 따른 영향

에틸 아세테이트를 추출 용매로 하고 Extrelut-20과 Sep-Pak C18을 고체상 추출 칼럼으로 하여 DCP와 MCPD의 표준 물질의 추출 실험을 실시한 결과 고체상 추출 칼럼의 종류에 따라 매우 상이한 회수율을 보

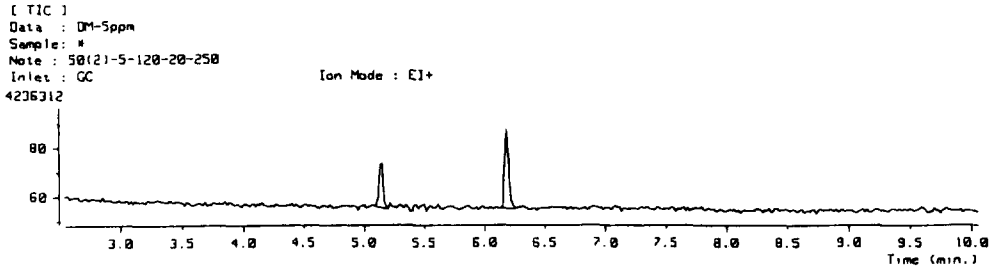

Fig. 1. Total ion chromatography of DCP and MCPD standards.

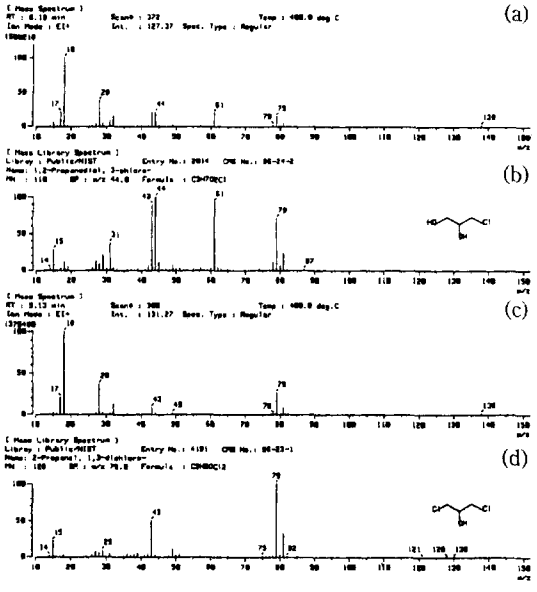

Fig. 2. Mass spectrums and mass library spectrums of DCP and MCPD peaks. (a) Mass spectrum at retention time=6.2 min, (b) Mass library spectrum of MCPD, (c) Mass spectrum at retention time=5.1 min, (d) Mass library spectrum of DCP.

Table 1. Comparison of extraction column type for the recovery of DCP and MCPD[1)]

Solid phase extraction column	Recovery (%)	
	DCP	MCPD
Extrelut-20	31.7	62.6
Sep-Pak C18	45.0	27.9

[1)]Initial loading of DCP=3, MCPD=20 ppm.

였다(Table 1). Extrelut-20은 MCPD의 추출에, Sep-Pak C18은 DCP의 추출에서 높은 성능을 보였는데 이는 칼럼과 추출 성분 간의 극성 관계에 의해 설명될 수 있다. Extrelut-20은 규조토를 충진물로 하는 normal phase의 칼럼인 반면 Sep-Pak C18은 전형적인 reverse phase의 칼럼이다. 따라서 상대적으로 극성이 높은 MCPD는 normal phase인 Extrelut-20에, DCP는 reverse phase인 Sep-Pak C18에 각각 보다 큰 친화력을 보이기 때문에 나타난 결과로 보인다.

유기용매의 종류, 시료의 농도와 염 농도의 영향

전반적으로 회수율이 높은 Extrelut-20을 이용하되 Extrelut-20에서 저조한 회수율을 보이는 DCP의 회수 성능을 높이기 위하여 에틸 아세테이트보다 극성이 덜한 유기용매를 이용하는 방법을 시험하였다. Table 2(a)에서 보는 바와 같이 극성이 낮아 질수록(log P가 증가할수록) DCP의 추출 회수율이 높아졌고 반면에 MCPD의 회수율은 감소하였다. 따라서 극성이 작은(logP가 큰) 유기용매를 사용하여 DCP를 1차 추출시키고 극성이 높은(logP가 작은) 유기용매로 MCPD를 2차 추출시키는 2단계 추출법을 실시한 결과 두 성분의 추출 회수율을 모두 높일 수 있었다(Table 2(b-c)).

Table 2. Effects of elution solvents, loading and salt concentration on DCP and MCPD recovery in two-step extraction

Exp.	Sample conc. (ppm)	NaCl (%)	Elution solvent[1)] (volume ratio) 1st	2nd	logP	Recovery (%) DCP	MCPD
(a)			H+E(9:1)		3.17	106.5	0.0
	12	20	H+E(5:5)		2.02	90.7	16.0
			H+E(1:9)		1.06	69.3	42.2
(b)	3					109.4	74.7
	50	20	H+E(9:1)	E	3.17->0.85	93.1	61.0
	250					98.8	73.7
(c)		10				49.3	35.1
	10	20	H+E(9:1)	E	3.17->0.85	94.7	74.8
		30				72.7	62.2

[1)]Elution solvent: H=Hexane, E=Diethyl ether.

시료의 농도를 달리하여 추출한 실험에서는 추출 회수율이 시료 농도에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 2(b)). Extrelut-20을 사용할 경우 염이 함유되어 있지 않는 시료는 DCP와 MCPD이 검출되지 않았으나 염의 첨가된 시료의 경우 분석이 가능하였다. Normal phase인 Extrelut-20의 충진물(규조토)에 수용액상의 DCP와 MCPD이 쉽게 결합되는데, 뒤이어 첨가하는 추출 용매는 물과는 섞이지 않지만 수용액상에 녹아 있는 DCP와 MCPD에 대하여 일정한 친화력을 갖으므로 이 들 물질을 용리시키는 것이다. DCP와 MCPD가 충진물에 대한 결합력이 매우 강력하면 추출 용매에 의해 용리되기 어렵기 때문에, 염을 첨가하여 충진물에 대한 DCP와 MCPD의 결합을 적정 수준 이하로 낮추는 것이 DCP와 MCPD의 추출에 유리하였다. DCP와 MCPD 부하량의 변화는 회수율에 큰 영향이 없었으며 염의 농도는 20%일 때 적정한 것으로 나타났다(Table 2(b-c)).

2단계 추출 조건 최적화

Table 3에서 보는 바와 같이 DCP추출의 경우 MCPD의 경우와 달리 헥산과 같은 비극성의 유기용매에서 높은 회수율을 보였으며 이는 -OH의 수가 적은 DCP가 MCPD에 비하여 극성이 낮기 때문이다. 2차 추출에 의해서도 DCP의 일부가 추출될 수 있으

Table 3. Effect of elution solvent and solvent loading on DCP and MCPD recovery

Elution solvent[1)]	logP	Solvent loading (ml)	Recovery (%)	
			DCP	MCPD
H	3.50	80	109.2	0.3
H+E (95:5)	3.33	80	118.6	0.5
H+E (90:10)	3.17	80	87.1	0.0
E	0.85	250	74.7	75.6
H+E (5:95)	0.97	300	37.5	44.5
EA+H (90:10)	0.90	300	59.3	88.7
EA	0.68	200	63.6	95.0

[1)]H=Hexane, E=Diethyl ether, EA=Ethyl acetate.

Table 4. DCP and MCPD contents in HVP-related products

Product name	Chloropropanols content (ppm)[1)]	
	DCP	MCPD
HVP A	0.5	62
HVP B	0.3	24
soy sauce A	0.8	60
soy sauce B	0.1	17
ramen soup A	ND	2.7

[1)]based on weight of products.

므로 1차 추출에서 DCP를 완전히 추출하지 않아도 무방하였다. 헥산만을 사용하는 경우나 적절한 혼합비의 헥산과 에테르의 혼합 용매를 사용하는 경우 모두 100%의 DCP회수율을 얻을 수 있었다. 따라서 1차 추출 용매로 헥산을 선정하였다. MCPD추출용 유기용매로 비교적 극성이 높은 에테르를 사용하였을 경우 MCPD회수율이 저조하여(75% 이하), 극성을 낮추기 위하여 소량의 헥산을 첨가하여 실험한 결과 회수율은 더욱 낮아졌다. DCP와는 반대로 MCPD의 회수율은 극성에 비례하였다(Table 3). 이를 확인하기 위하여 에테르보다 극성이 높은 에틸 아세테이트로 용리한 결과 매우 높은 수준(95%)으로 MCPD를 회수할 수 있었다.

이상의 결과로부터 DCP의 경우 헥산(80 mL)이, MCPD의 경우 에틸 아세테이트(200 mL)가 적합한 유기용매로 선정되었으며 DCP와 MCPD의 추출 회수율은 각각 100%과 95%이었다.

HVP 함유 식품 시료의 분석

이상의 최적화된 분석 조건으로 HVP를 함유하는 식품 시료의 DCP와 MCPD의 함량을 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 라면 스프와 같이 불용성 고형분을 다량 함유하는 시료는 고체상 추출 전에 적당한 비의 물과 혼합하여 상온에서 2시간 가량 교반한 후 원심분리하여 그 상등액을 고체상 추출에 이용하였다. 시료의 종류별, 제조사별로 서로 상이한 함유량을 보였으며 전반적으로 높은 수준의 DCP와 MCPD의 함유량을 보였다.

요 약

산분해 HVP제조 공정에서 부산물로 생성되는 DCP와 MCPD의 분석을 위한 GC-MS의 분석 조건 및 추출 조건 최적화를 수행하였다. DB-5 모세관 칼럼을 이용하여 DCP와 MCPD가 각각 분리되었으며 SIM 기법을 사용한 결과 25-50 ppb까지 검출 한계를 낮출 수 있었다. 고체상 추출 칼럼의 종류, 희석액의 염 농도, 추출 유기용매의 종류 등에 따라 상이한 분석 결과를 보였으며 고체상 추출 칼럼 중에서는 normal phase가 적합하였고, 희석액의 염화나트륨의 농도가 20% (w/v) 일 때 최대의 추출 회수율을 보였다. 고체상 추출시 용리제로 사용되는 유기용매의 극성이 회수율을 결정하는 중요한 인자인 것으로 밝혀졌다. MCPD와 DCP의 추출에 적합한 유기용매의 선정을 위하여 물에 섞이지 않으면서 DCP와 MCPD에 용해도가 높은 클로로포름, 에테르, 헥산과 에틸 아세테이트 등의 유기용매 및 각각의 혼합 용매를 용리제로 테스트한 결과 DCP의 경우 헥산이, MCPD의 경우 에틸 아세테이트가 적합한 유기용매로 선정되었다. 이 때 DCP와 MCPD의 추출 회수율은 각각 100%와 95%이었다. HVP를 함유하는 식품 시료를 분석한 결과 DCP와 MCPD의 함량은 각각 1 ppm이하와 수십 ppm의 값을 보였다.

문 헌

1. Ericsson, R.J. and Youngdale, G.A.: Male antifertility compounds: structure and activity relationships of U-5897, U-15,646 and related substances. *J. Reprod. Fert.*, **21**, 263 (1970)
2. Dixit, V.P., Lohiya, N.K. and Araya, M.: Observations of the effects of 3-chloro-1,2-propanediol on the female reproductive tract and pituitary gonadotrophs of the gerbil (Meriones hurrianae). *Folia Biologica*, **22**, 281 (1974)
3. Hoyt, J.A., Fisher, L.F., Hoffman, Swisher, D.K. and Seyler D.E.: Utilization of a short-term reproductive toxicity study design to examine effects of α-chlorohydrin (3-chloro-1,2-propanediol). *Reproductive Toxicology*, **8**, 237 (1994)
4. IHPC Report 3-6-95: Position paper on 3-monochloropropanediol (3-MCPD), IHPC board, Washington (1995)
5. Wittmann, R.: Bestimmung von dichlorpropanolen und

monochlorpropandiolen in wüzen und wüzehaltigen lebensmitteln. *Z. Lebensm Unters Forsch.*, **193**, 224 (1991)
6. Van Bergen, C.A., Collier, P.D., Cromie, D.D.O., Lucas R.A., Preston, H.D. and Sissons, D.J.: Determination of chloropropanols in protein hydrolysates. *J. Chromatography*, **589**, 109 (1992)
7. Spyres, G.: Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in hydrolysed vegetable proteins by capillary gas chromatography with electrolytic conductivity detetection. *J. Chromatography*, **638**, 71 (1993)
8. Chaplin, M.F. and Bucke C.: *Enzyme Technology.*, Cambridge Univ. Press, New York, p.223 (1990)

(1996년 9월 25일 접수)