



## 가열 조리된 돼지고기의 Heterocyclic Amines 분석을 위한 Solid-phase 추출 방법의 비교

이재환 · 백유미 · 이광근 · 신한승\*  
동국대학교 식품공학과

### Comparison of Different Solid-Phase Extraction Methods for the Analysis of Heterocyclic Amines from Pan-Fried Pork Meat

Jae-Hwan Lee, Yu-Mi Back, Kwang-Geun Lee, and Han-Seung Shin\*  
Department of Food Science & Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

#### Abstract

Four different extraction and purification methods were evaluated to determine the heterocyclic amines (HCAs) in fried pork patties. Pork patties were cooked in the teflon-coated electric frying pan at 230°C for 8 min per side. HCAs in the fried pork patties were extracted and purified using four different solid-phase extraction (SPE) methods and quantitated by LC-MS (API-ESI). Recovery of four different extraction and purification methods was evaluated by comparing the HCAs amounts quantified by the standard addition method. Validation of extraction and purification methods for fried pork patties was determined to establish accurate sample preparation. The recoveries of HCAs from different SPE methods were calculated. The recovery yields were 15.7-68.7% (Polar amine group) and 25.0-74.7% (less-polar amine group) in method A. Method D provided recovery yields ranging from 14.1% to 68.7% in polar amine groups and from 3.0% to 72.3% in less-polar amine groups, respectively. Modified procedures of Method A and D were the most suitable extraction and purification method for HCAs analysis from fried pork patties.

**Key words** : heterocyclic amine, solid-phase extraction, pork, food mutagen

#### 서 론

식품의 가열처리는 식품의 기호성과 위생 안전성 향상에 기여하지만, 돼지고기, 쇠고기, 가공육, 어패류, 단백질 식품 등을 굽고 튀길 때는 돌연변이성, 발암가능물질 등과 같은 유해물질들이 생성된다(Sugimura, 2002; Shin *et al.*, 2005; Shin, 2005). Heterocyclic amines란 직화 또는 숯불 등과 같은 고온에서 가열 조리된 육류, 어패류, 단백질 식품의 탄 표면에서 형성되는 돌연변이성, 발암성 유해물질이다(Sugimura *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 1978; Matsukura *et al.*, 1981; Jänoszka *et al.*, 1983). 1970년대 초 Sugimura 등(1977)이 처음 발견한 이환방향족아민은 Maillard reaction과 밀접한 관계가 있다. 아미노산과 크레

아틴 또는 크레아티닌, 당의 열분해에 의해 생성된다. Maillard reaction은 여러 가지 화합물이 궁극적으로 갈색을 나타내는 색소를 형성하는 반응을 일컫지만 부산물로써 여러 가지 방향물질들과 다른 반응의 전구체로 쓰일 수 있는 화합물을 만들어낸다(Becher *et al.*, 1988; Hatch *et al.*, 1988; Sugimura *et al.*, 1990; Knize *et al.*, 1991).

이환방향족아민은 화학적인 구조에 따라 순수 아미노산의 가열 분해 산물들인 amino[ $\alpha$ ]carboline 들과 아미노기를 가진 imidazole 고리가 quinoline이나 quinoxaline 또는 pyridine에 붙어 있는 aminoimidazoazarene으로 나눌 수 있다. Amino[ $\alpha$ ]carboline 은 300°C 이상의 온도에서 생성되지만 aminoimidazoazarene 은 가정의 조리조건과 비슷한 300°C 미만에서도 생성되므로 일상생활에서 이환방향족아민의 섭취가 계속 일어날 수 있다(Augustsson *et al.*, 1997; Rohrmann *et al.*, 2002).

건강 안전성 측면에서 보면 이환방향족아민을 효과적으로 감소 또는 분해시키거나 식품변이원의 생성을 막는 것이 바람직하므로 돌연변이원성 억제인자를 찾는 것이 매

\*Corresponding author : Han-Seung Shin, Department of Food Science & Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea. Tel: 82-2-2260-8590, Fax: 82-2-2260-8740, E-mail: spartan@dongguk.edu

우 중요해졌다. 올리고당(Shin *et al.*, 2004), 비타민E(Balogh *et al.*, 2000) 마늘에 함유된 황 화합물(Shin *et al.*, 2002), 공액리놀레산(conjugated linoleic acid)(Ha *et al.*, 1987), 농축대두단백(Wang *et al.*, 1982), 양파(Aoyama *et al.* 2007, Gibis *et al.*, 2007), 복분자(Lee *et al.*, 2007) 등을 육류 및 가공육에 첨가하여 가열 조리한 경우 돌연변이원성, 발암성물질들이 감소되었다.

국제 암 연구기구(International Agency for Research on Cancer; IARC)는 이환방향족아민을 발암가능성물질(possibly carcinogenic to human)로 규정하고 있으며 일상생활에서 이환방향족아민에 노출되는 빈도를 줄이라고 권장하고 있다. Rohmann 등(2002)은 인간이 하루 동안 103-160 ng/day의 이환방향족아민을 섭취한다고 보고하였으며 Felton 등(1990)의 연구결과에서 보면 MeIQx(2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline)는 0.5-1.8 µg, PhIP(2-amino-1-methyl-6-p henylimidazo[4,5-b]pyridine)는 0.1-13.8 µg정도를 인간이 섭취한다고 하였다. 이환방향족아민과 강한 독성을 가진 aflatoxin B1과 비교해보면 aflatoxin B1 1 µg당 *S. typhimurium* TA98의 역 돌연변이 집락수가 6,000개인데 반해 돌연변이원성이 매우 큰 것으로 알려진 IQ(2-amino-3-methyl imidazo[4,5-f]quinoline)의 경우 433,000개의 역 돌연변이 집락수를 보인다(Felton *et al.*, 1997).

이러한 돌연변이성, 발암성 물질인 이환방향족아민을 효과적으로 추출, 정제, 분리하기 위해서 liquid-liquid chromatography(Gross *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1991), solid phase extraction(Schwarzenbach *et al.*, 1992; Thiébaud *et al.*, 1995), liquid-solid chromatography, immune affinity purification(Gross *et al.*, 1992; Kataoka *et al.*, 1999; Toribio *et al.*, 1999) 등의 전처리 방법이 사용되어 왔으며 high performance liquid chromatography(HPLC), gas chromatography(GC), capillary electrophoresis separation(Knize *et al.*, 1992; Olsson *et al.*, 1997; Pais *et al.*, 2000), liquid chromatography with mass spectrometry(LC-MS) 등을 이용하여 정량, 정성분석을 하고 있다. 최근에는 검출의 선택성과 정밀성을 향상시키기 위해 electrospray ionization tandem mass spectrometry(LC/ESI-MS/MS) 등을 사용한다(Holder *et al.*, 1997; Richling *et al.*, 1997; Pais *et al.*, 2000).

식품 중 이환방향족아민의 생성에 영향을 미치는 인자들은 조리온도 및 시간, 전구물질(당, 크레아틴, 아미노산 등), 지방 및 단백질 물질, 수분 등이 보고되어 있다(Skog *et al.*, 1993). 식품 중 이환방향족아민을 분석하는데 있어서 가장 큰 문제점은 이 물질이 식품 중에 극히 미량 존재하고 많은 복합화합물(matrix)들을 포함하며 분석 과정에서 회수를 편차가 크므로 이러한 문제를 해결해서 정확하고 효과적인 분석을 하기 위해서는 기존의 전처리 방법들이 개선되어야 한다.

따라서 본 연구의 목적은 서로 다른 4가지 solid phase extraction(SPE)방법을 이용한 전처리 방법의 회수율과 LC/MS를 이용한 가열 조리된 돼지고기의 HCAs 정량, 정성 분석결과를 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 연구에 사용된 돼지고기(삼겹살부위)는 지역 슈퍼마켓에서 지방정형 후 구입하여 사용 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 15종의 HCAs 표준물질인 IQ, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), MeIQx, 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(7,8-DiMeIQx), 2-amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (TriMeIQx), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2), 2-amino-6-methylpyridopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole(Glu-P-1), 2-aminopyridopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole(Glu-P-2), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole(AαC), 2-amino-3methyl-9H-pyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole(MeAαC), PhIP, 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole(Harman) and 9H-pyrido[3,4-b]indole(Norharman))은 Toronto Research Chemicals(Toronto, Canada)사에서 구입하였으며 표준용액은 표준물질을 HPLC급 메탄올에 녹여 조제하였다. 내부표준물질인 caffeine은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Polysulfonic acid(PRS) Bond Elute columns(500 mg), C-18 cartridge(100 mg), Extrelut-20 columns은 Varian(Harbor City, CA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 모든 유기용매는 Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA)사의 HPLC등급을 사용하였다.

### 돼지고기 패티 준비 및 조리

분쇄돈육(100 g)은 petri dish(9×1.5 cm)를 이용하여 패티 형태로 성형화한 다음 사용하기 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 돼지고기 패티는 Teflon-coated electric frying pan(Cheflin Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 표면온도가 230-260°C인 상태에서 돼지고기 패티의 앞·뒷면을 각각 8분씩 가열하였다. 프라이팬의 표면온도와 돼지고기 패티의 내부온도는 surface temperature thermometer(Trend Instruments Inc. Lawrenceville, GA, USA)와 thermocouple thermometer(Pacific Transducer Corp., Los Angeles, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 16분 조리 후 돼지고기 패티의 내부온도는 70-80°C이었다. 가열 조리된 돼지고기 패티는 잘게 자른 뒤 냉동고에 3시간 동안 넣고 열린 다음 이를 동결건조기(Labconco, Kansas City, MO, USA)를 이용하여 동결건조 시키고 동

결 건조된 패티를 막자사발과 교반기(Hanil Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 잘게 부수었다.

**돼지고기 패티에서의 HCAs 정제 및 추출**

식품 중에서 HCAs를 검출하기 위한 최적 전처리 방법을 확립하기 위하여 Fig. 1과 같이 4가지 방법의 각각 다른 SPE방법으로 비교하였다. 전처리 방법 중 방법 A와 방법 C 그리고 방법 D는 Gross 등(1992)의 방법을 변형하여 실험하였으며 방법 B는 Toribio 등(2000)의 방법을 변형하여 실험하였다.

**Solid-phase extraction 방법 A**

방법A의 전처리 방법은 4g의 동결 건조된 같은 돼지고기에 내부표준물질은 caffeine을 spike한 뒤 1 M NaOH 16 mL에 넣고 약 3시간 균질화시켰다. 이 알칼리 용액은 재사용이 가능한 Extrelut-20 columns에 넣고 0.1 M HCl 6 mL, 0.1 M HCl:MeOH(4:6) 15 mL, H<sub>2</sub>O 2 mL로 pre-

conditioning한 PRS cartridge(500 mg)에 직접 연결했다. Extrelut-20 columns에 흡착된 분석물은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:toluene (95:5, v/v) 60 mL을 사용하여 다음 PRS cartridge으로 용출시킨다. 이때 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:toluene(95:5,v/v)을 20 mL씩 3번에 걸쳐 용출시킨다. Extrelut-20 columns은 버리고 PRS cartridge은 건조시킨 뒤 H<sub>2</sub>O 15 mL로 씻어주면서 C<sub>18</sub> cartridge(100 mg)을 MeOH 5 mL, H<sub>2</sub>O 5 mL로 preconditioning 시켰다. 그 다음 PRS cartridge와 C<sub>18</sub> cartridge을 연결한 뒤 0.5 M AcONH<sub>4</sub>(pH 8) 20 mL로 용출시킨다. PRS cartridge는 버리고 C<sub>18</sub> cartridge는 건조 뒤 H<sub>2</sub>O 2 mL로 씻어주고 MeOH:NH<sub>3</sub>(9:1, v/v) 0.8 mL로 용출시켰다. 이 용출액을 온화한 조건에서 질소 농축기(MGS-2200, Tpkyo Rikakjkai Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 완전히 건조한 뒤 MeOH 1 mL에 용해시킨 후 LC/MS에 주입하였다.

**Solid-phase extraction 방법 B**

방법 B는 Toribio 등(2000)의 방법을 변형하여 사용하였다. 다른 전처리 방법에 비해 과정이 간단하고 시간이 절약되는 방법 B는 방법 A와 다르게 PRS cartridge와 C<sub>18</sub> cartridge를 preconditioning 시키지 않고 사용하였으며 Extrelut-20 columns에 흡착된 HCAs는 오직 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 75 mL로 용출시켰다.

**Solid-phase extraction 방법 C**

방법 C는 Gross 등(1992)의 방법을 변형하여 사용하였으며 방법 A와 비교적 유사한 방법이다. 그러나 PRS cartridge를 washing 할 때 MeOH:H<sub>2</sub>O(4:6, v/v) 15 mL을 사용하는데 이 때 washing용액에 미량의 HCAs가 속해 있으므로 rotary evaporator(B481, Buchi, Switzerland)로 최종 부피가 1 mL이 되도록 건조시킨 뒤 C<sub>18</sub> cartridge에 함께 loading 시켰다. 그리고 C<sub>18</sub> cartridge에 흡착된 HCAs을 용출시키기 위해 MeOH:NH<sub>3</sub>(9:1, v/v) 2.0 mL를 사용하였다.

**Solid-phase extraction 방법 D**

방법 D는 PRS cartridge와 C<sub>18</sub> cartridge을 preconditioning 시킨 후 건조시키지 않고 사용하였으며 washing단계를 생략하고 바로 용출하였다. 그리고 PRS cartridge를 preconditioning할 때 0.01 M HCl 6 mL, 0.1 M HCl:MeOH (4:6) 15 mL, H<sub>2</sub>O 2 mL를 이용하였다. C<sub>18</sub> cartridge의 흡착물은 MeOH:NH<sub>3</sub>(9:1, v/v) 0.8 mL로 용출시키고 이 용출액을 온화한 조건에서 질소 농축기를 사용하여 완전히 건조한 뒤 MeOH 1 mL에 용해시켜 사용하였다.

**HCAs 분석을 위한 LC/MS 조건**

식품 중 HCAs의 분석을 위해 사용된 HPLC 장비는 Agilent 1100 series(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며 MS는 Agilent 1100 series LC/MSD

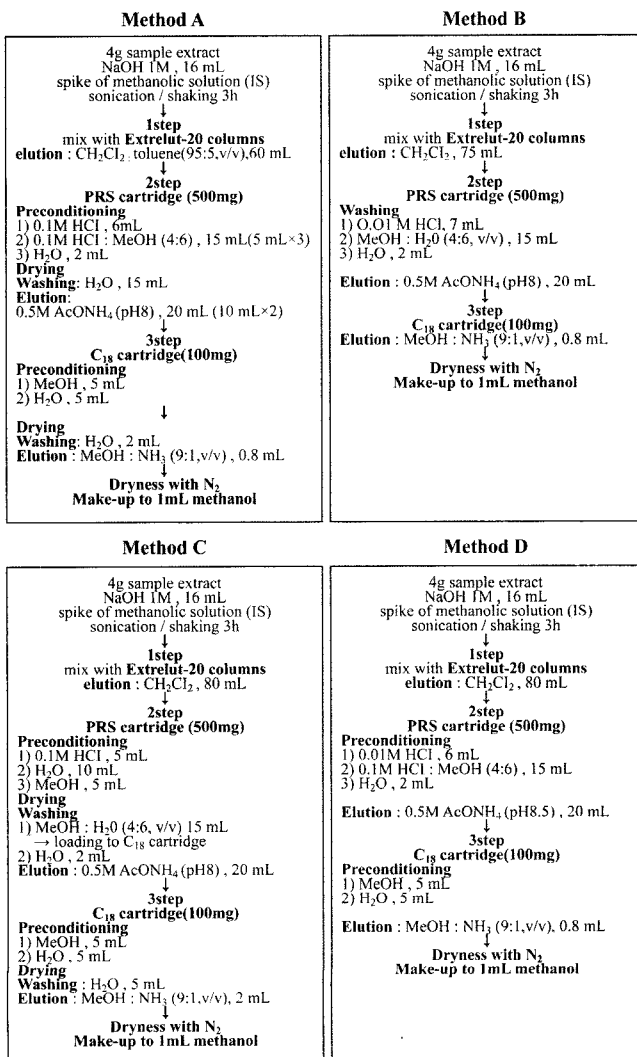


Fig. 1. Solid-phase extraction (SPE) method for HCAs analysis.

을 사용하였다. 식품 중 HCAs의 분석에 대한 크로마토그래픽 분리를 위한 LC 분석조건은 다음과 같았다. Column은 Zorbox RX-C8 Column(Agilent Technologies, Narrow-Bore 2.1×150 mm 5 μm)을 사용하였으며 column temperature는 25°C 이다. 샘플의 injection volum은 5 μL이다. 각 표준물질에 대한 분리를 위해 0.3 μL/min의 유속으로 이성분 시스템을 사용하였으며, 이동상 A는 30 mM ammonium formate buffer(pH 3.7)를 사용하였고 이동상 B는 acetonitrile 이었으며 기울기 용매 조건을 사용하였다. 기울기 용매 조건은 초기에 A가 92%이었으며 30초-10분 동안 83%, 10-20분 동안에는 67%, 20-24분 동안에는 40%, 24-30 분 동안에는 55%로 흘러주었으며 초기 조건으로 돌아오기 위해 30-33분에 걸쳐서 92%를 흘러주었으며, 컬럼의 재평형을 위해 20분간 흘러주었다.

사용된 질량 분석기는 Agilent 1100 series LC/MSD 이었으며, 이온화는 양이온(positive ion) 방법의 전자 분무 이온화(electrospray ionization, ESI)이었다. 질량분석기는 quadrupole mass analyzer와 연결된 분석기를 사용하였다. Capillary voltage와 nebulizer pressure는 4 kV과 30 psig이었고, drying gas flow와 dry gas temperature는 10 L/min과 350°C이다.

### 통계처리

모든 실험 data는 3회 반복한 것이며 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 Sigma-Stat 2.0(Jandel Co. San Rafael, CA, USA)를 이용하였다. 각 군간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하였으며 유의성은 신뢰구간  $p < 0.05$  수준에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

식품 중에서 HCAs를 검출하기 위한 최적 전처리 방법을 확립하고 개선, 향상시키기 위해 4가지 방법의 각각 다른 SPE방법을 비교하였다. 여기서 방법 A, 방법C 그리고 방법D는 Gross 등(1992)의 방법을 토대로 수행하였으며 방법B는 Toribio 등(2000)의 방법을 토대로 변형하여 사용하였다.

서로 다른 4가지의 전처리 방법은 공통된 3단계의 전처리 방법을 거친다. 첫 단계에서는 돼지고기를 구웠을 때 형성되는 다양한 matrix 중 단백질과 지방과 같은 거대분자 matrix를 분리하는 것이 목적이다. 단백질, 지방과 같은 거대분자는 HCAs의 추출 및 정제 효율성을 떨어뜨린다. 용출과정에서 diatomaceous earth는 거품형성을 막고 단백질 matrix를 효과적으로 분리하기 위해 지방과 결합한다. 두 번째 단계의 목적은 HCAs의 다양한 matrix 중 PRS cartridge와 극성 상호작용과 수소결합을 하여 목적물질만 선택적으로 분리시키는 것이다. 세 번째 전처리 단

계에 사용되는 C<sub>18</sub> cartridge는 비극성 물질과 흡착하는 특징을 가진다.

가열조리 된 돼지고기 패티를 이용하여 4가지 전처리 방법을 수행한 결과를 Table 1에 나타내었다. 서로 다른 4가지 전처리 방법의 적합성을 알아보기 위해 회수율과 표준편차를 구하였다. 회수율은 15가지 표준물질을 같은 돼지고기 패티(4 g) 첨가하여 전처리를 거친 값과 표준물질의 절대값을 비교하여 구하였다. 서로 다른 4가지 전처리 방법을 통해 얻은 15가지 HCAs 회수율은 3.0%(방법 D, Tri-P-2)-74.7%(방법 A, Tri-P-2)이었다. Shin 등(2005)의 결과에서는 MeIQx, Di-MeIQx, PhIP 등에서 66.2-74.2%의 회수율을 보였으며 Toribio 등(1999)은 26.2-90.6%의 회수율을 구하였다. 15가지 HCAs 중 평균적으로 MeAαC가 73.4%로 가장 높은 회수율을 보였으며 Tri-MeIQx에서 15.3%의 가장 낮은 회수율을 보였다. F.Oz 등(2007)과 Messner 등(2004)에서도 MeIQ, IQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP, AαC, MeAαC 등에서 40-60%정도의 회수율을 보였다.

4가지 서로 다른 전처리 방법 중 방법A와 방법D가 가장 높은 회수율과 검출빈도를 보였다. 방법A 경우 Gross 등(1992)의 방법을 변형, 개선하여 확립한 방법이다. 이 방법의 경우 다른 방법들과는 다르게 Extrelut-20 columns에 흡착된 HCAs를 toluene이 5% 첨가된 dichloromethane을 사용하여 용출하였으며 PRS cartridge와 C<sub>18</sub> cartridge를 사용하기 전 preconditioning 시킨 뒤 건조하여 사용하였다. 방법 A에서 15가지 HCAs의 전체적인 회수율은 15.7-74.7%이었다. 그 중에서 α-carbolines(AαC, MeAαC)가 62.3-74.6%으로 가장 높은 회수율을 보였으며 β-carbolines(Norharman, Harman)이 약 25%정도로 가장 낮은 회수율을 보였다. 그러나 Toribio 등(2007)의 결과에서는 α-carbolines의 회수율이 38-45%이었으며 β-carbolines의 경우는 48-65%의 회수율을 보였다. 그리고 quinolines(IQ, MeIQx)와 quinoxalines(7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, MeIQx, Tri-MeIQx)의 회수율이 Tri-MeIQx를 제외하고 35.9-66.3%이었는데 이 결과는 Janoszka 등(2001)의 결과(46-85%)와 유사하다. 그 밖에도 γ-carbolines(Tri-P-1, Tri-P-2)는 57.1-74.7%, δ-carbolines(Glu-P-1, Glu-P-2)는 48.7-68.7%, PhIP는 54.3%의 회수율을 보였다.

방법D도 Gross 등(1992)의 전처리 방법을 변형하여 사용하였는데 방법A와는 다르게 Extrelut-20 columns에 흡착된 HCAs를 오직 dichloromethane만을 이용해서 용출하였으며 두 번째와 세 번째 전처리 단계에서의 cartridge washing단계를 생략하였다.

방법D에서의 15가지 HCAs의 전체적인 회수율은 3.0-72.3%로 방법 A와 비슷한 양상을 보였다. 방법D역시 α-carbolines에서 66.3-72.3%의 가장 높은 회수율을 보였으며 γ-carbolines에서 3.0-6.3%의 가장 낮은 회수율을 보였다. 그 밖에도 β-carbolines은 12.0-18.6%, δ-carbolines은

Table 1. Comparison of recovery for HCAs standard separated from spiked pork samples using four of preparation methods<sup>1)</sup>

Compound	Method A		Method B		Method C		Method D		
	Recovery (%)	S.D. <sup>2)</sup>	Recovery (%)	S.D.	Recovery (%)	S.D.	Recovery (%)	S.D.	
Less-polar amines	$\alpha$ -carbolines	A $\alpha$ C	62.3	4.3	n.r. <sup>3)</sup>		n.r.	66.2	8.6
		MeA $\alpha$ C	74.6	5.0	n.r.		n.r.	72.3	6.0
	$\beta$ -carbolines	Norharman	25.0	1.8	n.r.		n.r.	18.6	0.7
		Harman	25.6	0.3	n.r.		14.8	0.6	12.0
	$\gamma$ -carbolines	Trp-P-1	57.1	0.3	n.r.		n.r.	3.0	0.2
		Trp-P-2	74.7	0.2	n.r.		n.r.	6.3	0.4
Pyridines	PhIP	54.3	2.3	n.r.		n.r.	39.9	2.2	
Polar amines	$\delta$ -carbolines	Glu-P-1	48.7	1.1	n.r.		n.r.	32.8	4.9
		Glu-P-2	68.7	1.4	n.r.		n.r.	68.7	2.5
	Quinolines	IQ	66.3	7.6	n.r.		n.r.	65.7	0.8
		MeIQ	51.6	0.6	n.r.		n.r.	14.1	0.7
Quinoxalines	MeIQx	64.0	5.1	n.r.		n.r.	56.1	2.9	
	4,8-DiMeIQx	35.9	3.3	n.r.		n.r.	27.7	2.3	
	7,8-DiMeIQx	40.9	2.8	n.r.		n.r.	31.7	2.0	
	Tri-MeIQx	15.7	0.7	n.r.		n.r.	14.8	1.5	

<sup>1)</sup>Means in the same columns bearing different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>2)</sup>Standard deviation of five analyses per treatment ( $n=5$ ).

<sup>3)</sup>n.r. = Not recovered.

32.8-68.7% 범위의 회수율을 보였으며 quinolines(14.1-65.7%), quinoxalines(14.8-56.1%), PhIP(39.9%)의 회수율도 구하였다.

국제 암 연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)의 독성분류에 따르면 IQ는 그룹2A(발암가능물질)에 속하는데 방법 A와 방법 D 모두 약 66% 정도의 회수율을 보였다. 그러나 그룹2B(발암우려물질; A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Glu-P-1, Glu-P-2, MeIQ, MeIQx, PhIP)에 속하는 물질들 경우 방법 A는 48.7-74.6%의 회수율을 보였고 방법 D는 14.1-72.3%의 회수율을 보였다. 따라서 방법 A와 방법 D 중 발암 가능 물질(possibly carcinogenic to human)을 검출하고 분석하는데 방법 A가 더 효과적이다. Turesky 등(2005)도 역시 가열 조리한 쇠고기 패티를 SPE 방법을 통해 전처리 하였는데 그 결과 IQ는 54 $\pm$ 2%의 회수율을 보였으며 A $\alpha$ C는 20 $\pm$ 1%, PhIP는 31 $\pm$ 1%, MeIQx는 51 $\pm$ 2%의 회수율을 보였다.

방법 B의 경우 Toribio 등(2000)의 방법을 변형시킨 전처리 방법으로 다른 3가지 방법과는 다르게 두 번째 단계에서의 preconditioning 단계를 생략하였으며 세 번째 단계에서의 세척단계 또한 생략하였다. 즉, 다른 방법들에 비해 과정이 간단하며 시간을 절약 할 수 있다. 그러나 Table 1에서 보듯이 15가지 HCAs 모두 검출되지 않았고 회수율을 구할 수 없었다. 방법 C의 경우 두 번째 단계에서 PRS cartridge를 통과한 세척용액에 존재하는 미량의 HCAs을 보정하기 위해 세척용액을 1 mL로 농축시켜 C<sub>18</sub> cartridge에 loading시킨 후 계속 전처리 하였다. 그러나 예

상과는 다르게 Harman(14.8%)을 제외한 나머지 HCAs 모두 검출되지 않았다.

15가지 HCAs는 극성에 따라 polar amines과 less-polar amines으로 나눌 수 있다. Polar amines에는 Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Tri-MeIQx 등이 속하고 less-polar amines에는 A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Norharman, Harman, Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP 등이 속한다. 방법 A에서 polar amine은 15.7-68.7% 정도의 회수율을 가지며 less-polar amines은 25.0-74.7%의 회수율을 가진다. 방법 D의 경우는 polar amine은 14.1-68.7%의 회수율을 가지며 less-polar amine은 3.0-72.3%의 회수율을 가진다. 즉 방법 A는 less-polar amines 검출에 유리하며 방법 D는 polar amines의 검출에 유의적으로 유리하다. 방법 B와 방법 C의 전처리 방법은 Harman 제외하고 polar amines과 less-polar amines 모두 검출되지 않았다.

HCAs 표준물질 15 종은 positive ion mode로 분석되었으며 30분 이내에 대체로 일관적인 패턴 양상을 보이며 분석되었다. 15종의 HCAs의 total ion chromatogram(TIC)와 extracted ion chromatogram(EIC)를 Fig. 2에 나타내었다. TIC와 각 물질에 대한 EIC는 selected ion monitoring(SIM) mode에서 확인되었다.

15가지 HCAs 모두 방법 A와 방법 D의 전처리 방법을 통해 확실하게 분리되었다. 그러나 SIM mode에서 관찰해보면 quinoxalines에 속하는 Tri-MeIQx가 방법 D보다 방법 A에서 더 잘 분리되는 것을 알 수 있다. 또한 A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C 처럼 화학적인 성질과 구조가 비슷한 물질들은 단계의 복

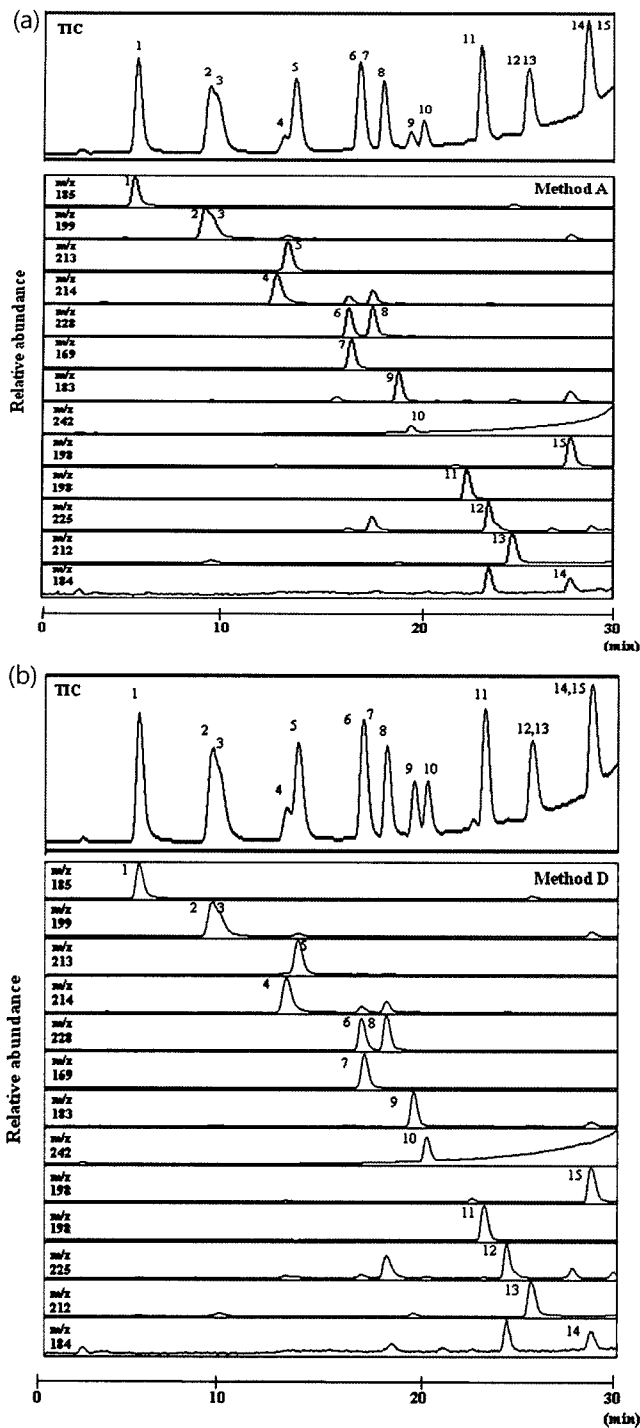


Fig. 2. LC-MS chromatograms (total ion chromatogram) of HCAs from pan-fried pork patty with the individual chromatogram in the SIM mode. (a) method A and (b) method D: 1, Glu-P-2; 2, IQ; 3, Glu-P-1; 4, MeIQx; 5, MeIQ; 6, 7,8-DiMeIQx; 7, Norharman; 8, 4,8-DiMeIQx; 9, Harman; 10, TriMeIQx; 11, Trp-P-2; 12, PhIP; 13, Trp-P-1; 14, A $\alpha$ C; 15, MeA $\alpha$ C.

잡한 전처리 단계를 거처도 잘 분리되지 않았다.

SPE 전처리 방법 및 LC/MS 분석방법에 대한 유효성을 확인하기 위해 정량한계(Limit of quantification, LOQ)와

검출한계(Limit of detection, LOD)을 구했는데 이때 LOD와 LOQ는 Harris(2007)의 방법을 사용하였다. 15가지 HCAs에 대하여 식품 중에서 LOD는 0.2-2.1 ng/mL이었으며 정량을 위한 LOQ는 0.8-9.7 ng/mL이었으며 예외적으로 A $\alpha$ C와 MeA $\alpha$ C는 각각 12.6, 23.9 ng/mL이었다. Sentellus 등(2004)의 결과에서는 HCAs의 분석방법의 LOD가 0.3-45.0 ng/mL이었으며 Vollenbröcker 등(2000)은 2.8-9.1 ng/mL이었다.

본 실험의 결과 식품 중에서 HCAs의 검출하기 위한 최적 전처리 방법은 방법A와 방법D이며 그 중 방법A가 발암 가능 물질 검출에 더욱 유리하다. 그리고 방법A는 less-polar amines 검출에 유리하며 방법 D는 polar amines의 검출에 조금 더 유리하다는 것을 확인할 수 있었다.

## 요 약

식품 중 HCAs를 검출하기 위한 최적 전처리 방법을 확립하기 위해 가열 조리된 돼지고기 패티를 이용하여 서로 다른 4가지 SPE(solid-phase extraction)방법을 비교하였다. 4가지 전처리 방법을 통해 얻은 15가지 HCAs 회수율은 3.0%(방법 A, Tri-P-1)-74.7%(방법A, Tri-P-2)이었다. 그 중 MeA $\alpha$ C가 평균적으로 73.4%로 가장 높은 회수율을 보였으며 Tri-MeIQx가 15.2%의 가장 낮은 회수율을 보였다. 4가지 전처리 방법 중 방법A와 방법D가 가장 높은 회수율과 검출빈도를 보였으며 방법B와 방법C는 Harman(14.8%)을 제외하고는 전혀 검출되지 않았고 회수율을 구할 수 없었다. 발암 가능 물질인 IQ, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Glu-P-1, Glu-P-2, MeIQ, MeIQx, PhIP 등을 검출하는 방법에는 방법A(48.7-74.6%)가 4가지 방법 중 가장 유리하다. HCAs는 극성에 따라 polar amines과 less-polar amines으로 구분할 수 있는데 방법A는 less-polar amines검출에 유리하고 방법D는 polar amines검출에 유리하다. 방법A와 방법D의 chromatogram을 비교한 결과 방법A와 방법D 모두 15가지 HCAs가 깨끗하게 분리되었지만 Tri-MeIQx 등을 검출하는데 방법A가 더욱 유리하다. SPE 전처리 방법 및 LC/MS 분석방법에 대한 유효성을 확인하기 위해 LOD(0.2-2.1 ng/mL)와 LOQ(0.8-9.7 ng/mL), 표준 편차(0.2-8.6)를 구하였다.

## 참고문헌

- Aoyama, S. and Yamamoto, Y. (2007) Antioxidant activity and flavonoid content of Welsh onion (*Allium fistulosum*) and the effect of thermal treatment. *Food Sci. Technol. Res.* **13**, 67-72.
- Augustsson, K., Skog, K., Jagerstad, M., and Steineck, G. (1997) Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis* **18**, 1931-1935.

3. Balogh, Z., Gray, J. I., Gomaa, E. A., and Booren, A. M. (2000) Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 395-401.
4. Becher, G., Knize, M. G., Nes, I. F., and Felton, J. S. (1988) Isolation and identification of mutagens from a fried Norwegian meat product. *Carcinogenesis* **9**, 247-253.
5. Felton, J. S. and Knize, M. G. (1990) New mutagens from cooked food. *Prog. Clin. Biol. Res.* **347**, 19-38.
6. Felton, J. S., Malfatti, M. A., Knize, M. G., Salmon, C. P., Hopmans, E. C., and Wu, R. W. (1997) Health risks of heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **376**, 37-41.
7. Gibis, M. (2007) Effect of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the Formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10240-10247.
8. Grose, K. R., Grant, J. L., Bjeldanes, L. F., Andresen, B. D., Healy, S. K., Lewis, P. R., Felton, J. S., and Hatch, F. T. (1986) Isolation of the carcinogen IQ from fried egg patties. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 201-202.
9. Gross, G. A. and Grüter, A. (1992) Quantitation of mutagenic /carcinogenic heterocyclic amines in food products. *J. Chromatogr.* **592**, 271-278.
10. Harris, D.C. Quantitative Chemical Analysis. 7th ed. W. H. Freeman and company, New York, pp. 78-95.
11. Hatch, F. T., Felton, J. S., and Knize, M.G. (1988) Mutagens formed in foods during cooking. ICI Atlas of Science: *Pharmacol.* 222-228.
12. Ha, Y. L., Grimm, N. K., and Pariza, M. W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* **8**, 1881-1887.
13. Holder, C. L., Preece, S.W., Conway, S. C., Pu, Y. M., and Doerge, D.R. (1997) Quantification of heterocyclic amine carcinogens in cooked meats using isotope dilution liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1667-1672.
14. Jägerstad, M., Reuterswärd, A. L., Olsson, R., Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K., and Dahlqvist, A. (1983) Creatin(in)e and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds: effects of various amino acids. *Food Chem.* **12**, 239-244.
15. Janoszka, B., Baszczyk, U., Warzecha, L., Strózyk, M., Damasiewicz-Bodzek, A., and Bodzek, D. (2001) Clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazaarenes) from heat-treated meat samples. *J. Chromatogr. A.* **938**, 155-165.
16. Kataoka, H. and Pawliszyn, J. (1999) Development of In-tube solid-phase microextraction/Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of mutagenic heterocyclic amines. *Chromatographia* **50**, 532-538.
17. Knize, M. G., Felton, J. S., and Gross, G. A. (1992) Chromatographic methods for the analysis of heterocyclic amine food mutagens/carcinogens : Applications of chromatography and electrophoresis in food science. *J. Chromatogr.* **624**, 253-265.
18. Knize, M. G., Hopmans, E., and Happe, J. A. (1991) The identification of a new heterocyclic amine mutagen from a heated mixture of creatine, glutamic acid and glucose. *Mutat. Res.* **260**, 313-319.
19. Lee, H. and Tsai, S. J. (1991) Effect of emodin on cooked-food mutagen activation. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 765-770.
20. Lee, J. H. and Shin, H. S. (2007) Influence of Genotoxic Heterocyclic Aromatic Amine Formation and Overall Mutagenicity in Ground Beef Patties Using Korean Bramble (*Rubus coreanum* Miquel). *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 576-579.
21. Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T., and Takayama, S. (1981) Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolysate. *Science* **213**, 346-347.
22. Messner, C. and Murkovic, M. (2004) Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. A* **802**, 19-26.
23. Olsson, J. C., Dyremark, A., and Karlberg, B. (1997) Determination of heterocyclic aromatic amines by micellar electrokinetic chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **765**, 329-335.
24. Oz, F., Kaban, G., and Kaya, M. (2007) Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chem.* **104**, 67-72.
25. Pais, P. and Knize, M. G. (2000) Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J. Chromatogr. B.* **747**, 139-169.
26. Pais, P., Tanga, M. J., Salmon, C. P., and Knize, M. G. (2000) Formation of the Mutagen IFP in Model Systems and Detection in Restaurant Meats. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1721-1726.
27. Richling, E., Decker, C., Häring, D., Herderich, M., and Schreier, P. (1997) Analysis of heterocyclic aromatic amines in wine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **791**, 71-77.
28. Rohrmann, S. and Becker, N. (2002) Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines. *Public Health Nutr.* **5**, 699-705.
29. Schwarzenbach, R. and Gubler, D. (1992) Detection of heterocyclic aromatic amines in food flavours. *J. Chromatogr. A.* **624**, 491-495.
30. Sentellas, S., Moyano, E., Puignou, L., and Galceran, M. T. (2004) Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1032**, 193-201.
31. Shin H. S. (2005) Influence of food ingredients on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in cooked pork patties. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 572-575.
32. Shin, H. S. and Lee, Y. S. (2005) Influence of commercial marinades on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried beef steaks. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 323-327.
33. Shin, H. S., Rodgers, W. J., Gomaa, E. A., Strasburg, G. M.,

- and Gray J. I. (2002) Inhibition of heterocyclic aromatic amine formation in fried beef patties by garlic and selected garlic-related sulfur compounds. *J. Food Prot.* **65**, 1766-1770.
34. Shin, H. S., Rodgers, W. J., Strasburg, G. M., and Gray, J. I. (2002) Reduction of heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried beef patties by organosulfur compounds. *J. Food Sci.* **67**, 3304-3308.
35. Shin, H. S., Yang, H. K., and Kim, J. N. (2004) Influence of different oligosaccharides and inulin on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried beef steak. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 162-166.
36. Skog, K. (1993) Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food Chem. Toxicol.* **31**, 655-675.
37. Sugimura, T. (2002) Food and Cancer. *Toxicol.* **181**, 17-21.
38. Sugimura, T. (1988) New environmental carcinogens in daily life. *Trends Pharmacol Sci.* **9**, 205-209.
39. Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y., and Itai, A. (1977) Mutagenic Principle(s) in Tryptophan and Phenylalanine Pyrolysis Products. *P. Jap. Acad.* **53**, 58-61.
40. Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1990) Mutagens and carcinogens in food. *Prog. Clin. Biol. Res.* **347**, 1-18.
41. Thiébaud, H.P., Knize, M. G., Kuzmicky, P. A., Hsieh, D. P., and Felton, J. S. (1995) Airborne mutagens produced by frying beef, pork and a soy-based food. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 821-828.
42. Toribio, F., Busquets, R., Puignou, L., and Galceran, M. T. (2007) Heterocyclic amines in griddled beef steak analysed using a single extract clean-up procedure. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 667-675.
43. Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L., and Galceran, M. T. (2000) Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion-trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **869**, 307-317.
44. Toribio, F., Puignou, L., and Galceran, M. T. (1999) Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract. *J. Chromatogr. A* **836**, 223-233.
45. Turesky, R. J., Taylor, J., Schnackenberg, L., Freeman, J. P., and Holland R. D. (2005) Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 3248-3258.
46. Vollenbröcker, M. and Eichner, K. (2000) A new quick solid-phase extraction method for the quantification of heterocyclic aromatic amines. *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 122-125.
47. Wang, Y. Y., Vuolo, L. L., Spingarn, N. E., and Weisburger, J. H. (1982) Formation of mutagens in cooked foods: The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef. *Cancer Lett.* **16**, 179-189.
48. Yamamoto, T., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Iitaka, K., Yamaguchi, K., Seino, Y., Yahagi, T., Nagao, M., and Sugimura, T. (1978) Isolation and structure determination of mutagenic substances in L-glutamic acid pyrolysate. *P. Jpn. Acad.* **54**, 248-250.

---

(2008.08.11 접수/2008.12.01 수정/2008.12.04 채택)