

A study of analytical method for Benzo[a]pyrene in edible oils

Min-Jeong Kim[★], Jun-Young Park, Min-Ju Kim, Eun-Young Jo, Mi-Young Park,
Nan-Sook Han, and Sook-Nam Hwang

Food and Drug Research Division, Ulsan Research Institute of Health and Environment,
157, Munsu-ro, Ulsan 44642, Korea

(Received April 6, 2023; Revised October 24, 2023; Accepted November 1, 2023)

식용유지 중 벤조피렌 분석법 비교 연구

김민정[★] · 박준영 · 김민주 · 조은영 · 박미영 · 한난숙 · 황숙남

울산보건환경연구원 식약품연구과
(2023. 4. 6. 접수, 2023. 10. 24. 수정, 2023. 11. 1. 승인)

Abstract: The benzo[a]pyrene in edible oils is extracted using methods such as Liquid-liquid, Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. However these extraction methods have significant drawbacks, such as long extraction time and large amount of solvent usage. To overcome these drawbacks, this study attempted to improve the current complex benzo[a]pyrene analysis method by applying the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method that can be analyzed in a simple and short time. The QuEChERS method applied in this study includes extraction of benzo[a]pyrene into *n*-hexane saturated acetonitrile and *n*-hexane. After extraction and distribution using magnesium sulfate and sodium chloride, benzo[a]pyrene is analyzed by liquid chromatography with fluorescence detector (LC/FLR). As a result of method validation of the new method, the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.02 µg/kg and 0.05 µg/kg, respectively. The calibration curves were constructed using five levels (0.1~10 µg/kg) and coefficient (R^2) was above 0.99. Mean recovery ratio was ranged from 74.5 to 79.3 % with a relative standard deviation (RSD) between 0.52 to 1.58 %. The accuracy and precision were 72.6~79.4 % and 0.14~7.20 %, respectively. All results satisfied the criteria ranges requested in the Food Safety Evaluation Department guidelines (2016) and AOAC official method of analysis (2023). Therefore, the analysis method presented in this study was a relatively simple pretreatment method compared to the existing analysis method, which reduced the analysis time and solvent use to 92 % and 96 %, respectively.

요약: 식용유지 중 benzo[a]pyrene 추출법으로 액체-액체 추출법, Soxhlet 추출법, 초음파 추출법 등이 사용되고 있으나 이런 방법들은 추출 시간이 길고 많은 양의 용매를 사용하는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 간편하고 단시간에 분석이 가능한 QuEChERS법을 적용하여 현재의 복잡한 benzo[a]pyrene 분석법을 개선하고자 하였다. 본 연구에서 적용한 QuEChERS법은 식용유지를 *n*-hexane saturated acetonitrile

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)52-229-5234 Fax : +82-(0)52-229-5239

E-mail : mj0923@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과 *n*-hexane으로 녹인 후 magnesium sulfate, sodium chloride를 이용해 추출하는 방식이다. 이 시험법에 대한 유효성 검증 결과, 검출한계와 정량한계는 각각 0.02, 0.05 µg/kg 이며, 직선성은 0.1~10 µg/kg 농도 범위에서 검량선 결정계수 (R^2)는 0.99 이상이었다. 회수율과 회수율에 대한 상대표준편차는 각각 74.5~79.3 %, 0.52~1.58 % 였으며, 정확성 및 정밀성은 각각 72.6~79.4 %, 0.14~7.20%로 나타났다. 위의 결과들은 식품의약품안전평가원의 「식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인 (2016)」 및 「시험법 마련 표준절차 AOAC 가이드라인 (2023)」을 모두 만족하였다. 따라서 본 연구에서 제시된 분석법은 기존 분석법 대비 상대적으로 간편한 전처리 방법으로 분석 시간과 용매 사용량을 각각 92 %, 96 % 정도 절감할 수 있었다.

Key words: benzo[a]pyrene, edible oils, liquid chromatography-fluorescence, extraction method

1. 서 론

다환방향족탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)는 분자구조 내에 두 개 이상의 벤젠 고리를 가진 화합물로 benzo[a]pyrene (3,4-benzopyrene; 1,2-benzo-pyrene), benzo[b]fluoranthene, acenaphthene, anthracene, chrysene 등이 알려져 있다.

이 중에서 benzo[a]pyrene은 최근까지 많은 연구에서 그 위해성이 보고¹되고 있고 이들 결과들을 토대로 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission)와 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에서는 benzo[a]pyrene을 내분비계 장애물질 및 발암 가능 물질로 평가하고 있다. 동시에 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 인체발암물질인 Group 1로 분류하고 있다.

Benzo[a]pyrene은 원유, 화산, 화재 등 자연환경에서부터 주로 유래되거나 육류 및 생선의 고온 조리 과정, 훈제과정 등 식품의 가공 과정에서도 생성되는 것으로 알려져 있어² 우리나라를 포함한 여러 나라에서 식품에서의 benzo[a]pyrene 함량을 규제하여 관리하고 있다.

특히 식용유지는 고온에서 압착하여 생산하는 공정 특성상 benzo[a]pyrene의 발생 우려가 많은 식품으로 이미 JECFA에서는 유지 중 benzo[a]pyrene의 함량 기준을 최대 10 µg/kg, EU에서는 최대 2.0 µg/kg으로 설정하고 있다. 우리나라에서는 benzo[a]pyrene이 참기름, 올리브유, 들기름 등 다수의 압착 식용유와 정제 식용유에서 권장기준치를 상회하는 수준으로 지속적으로 검출되어 식품의약품안전처에서 2001년부터 국내 유통되는 육류 및 그 가공품, 식용유지류, 어패류 및 그 가공품, 과채류에 대한 다환방향족탄화수소의 모니터링 및 위해평가를 수행했고 이 중 식용유지

등 지방성 식품을 통해서 많이 노출되는 것으로 나타났다. 이에 따라 2008년부터는 식용유지 중 benzo[a]pyrene을 권장규격기준에서 법적규격기준[2.0 µg/kg]으로 전환·설정하여 저감화하기 위한 관리를 시작하였다.^{3,4}

식품 중 특정 물질을 분석하기 위해서는 적절한 전처리 방법과 분석기기가 선택되어야 하는데 benzo[a]pyrene과 같은 PAHs를 검출하기 위해서도 현재까지 많은 분석방법들이 개발, 적용되어 왔다. 최근에도 LC (Liquid Chromatography), GC (Gas Chromatography) 등 뛰어난 감도와 분리능을 갖춘 분석기와 검출기가 지속적으로 개발되어 적용하고 있으며 더불어 시료의 전처리 과정을 간소화하게 하는 정제법 등도 여러 분석 분야에 도입되면서 이를 활용한 다양한 분석법들이 보고되고 있다.^{3,5-7} European Food Safety Authority (EFSA)가 2008년 보고한 자료에 따르면 식품에서 benzo[a]pyrene과 같은 PAHs를 추출하는 방법은 그 식품의 matrix나 성질에 좌우된다고 하였다.⁸ 그러므로 지용성인 benzo[a]pyrene의 특성과 대상 식품의 지방 함유 여부, 물성 등에 따라 구분하여 그에 맞는 시료의 추출, 정제 등의 과정을 선택하는 것이 중요하다.⁹ 실제로 어류 등의 수산물 및 그 가공품에 대하여 알칼리 분해 후 액체-액체 추출법,¹⁰ 음료 등 액상식품에 대하여 액체-액체 추출법, 식용유지류에 대하여 액체-액체 역추출법, 지방이 많이 없는 채소 및 과일류에 대해서는 초음파추출법¹¹이 적용되고 있다. 이 외에도 Soxhlet 추출법, microwave를 이용한 추출법, ASE(Accelerated Solvent Extraction)법 등 여러 추출법들이 시료 특성에 따라 다양하게 적용되고 있다.¹⁰⁻¹⁵ 또한 상기 여러 방법들로 추출된 benzo[a]pyrene을 정제(clean-up)하기 위해 극성의 특성을 가진 고정상인 플로리실 카트리지(florisil cartridge)와 실리카 카트리지(silica cartridge)

등을 주로 이용하고 있다.

식품 중 benzo[a]pyrene 분석을 위해서는 추출에서 정제까지의 긴 분석 시간과 과도한 유기용매 사용으로 다량의 시료를 한번에 분석하기에는 그 효율이 낮은 실정이다. 식품공전에서는 식용유지 중 benzo[a]pyrene 분석을 위해 *n*-hexane과 *N,N*-dimethylformamide를 주된 추출용매로 사용하고 있는데 이 중 *N,N*-dimethylformamide는 무색 내지 담황색의 암모니아와 비슷한 냄새가 나는 생식세포 변이원성물질로 발암성과 생식독성을 나타내어 산업안전보건기준에 관한 규칙 제420조 6에 특별관리물질로 분류되어 있으며, 산업안전보건법 제 81조의 4에 규정된 허용기준대상물질 13종에 포함되어 있어¹⁶ 추출용매로서 사용 제한이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 현재 잔류농약분석에 보편적으로 이용되고 있는 QuEChERS법을 활용하여 식용유지 중 benzo[a]pyrene 전처리법을 간편하게 개선하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 시약

분석 시료로는 올리브유를 사용하였고, 표준원액은 benzo[a]pyrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, benzo[a]pyrene 추출용매로 *N,N*-dimethylformamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), *n*-hexane, acetonitrile, dichloromethane (Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 제품을 구입하여 사용하였다. 추출에 사용한 시약으로는 magnesium sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 sodium chloride (Daejung, Siheung, Korea) 제품을 사용하였다. 시료의 추출 및 분석을 위해 증류수(18.2 MΩ Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하였다.

2.2. 표준용액 및 시험용액의 조제

표준용액은 dichloromethane에 용해된 benzo[a]pyrene (100 µg/mL)을 단계별로 acetonitrile에 희석하여 0.1~10 µg/kg의 농도가 되도록 조제하였다. 선택성(Selectivity), 검출한계(Limit of detection, LOD), 정량한계(Limit of quantification, LOQ), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 회수율(reproductibility) 및 매트릭스 효과(Matrix effect) 등 유효성 검증을 수행하기 위한 시험용액으로 benzo[a]pyrene이 검출되지 않은 공시료에 benzo[a]pyrene 표준원액을 첨가하여 사용하였다.

2.3. 시료의 추출 및 정제

2.3.1. 식품공전 시험법¹⁷

시료 약 10 g을 정밀히 달아 분액깔때기(I)에 넣고 *n*-hexane 100 mL와 *N,N*-dimethylformamide:water (9:1) 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하였다. *N,N*-dimethylformamide:water (9:1)층을 다른 분액깔때기(II)로 옮기고 분액깔때기(I)에 남아 있는 *n*-hexane층에 *N,N*-dimethylformamide:water (9:1)를 25 mL 넣고 추출 과정을 2회 반복하여 *N,N*-dimethylformamide:water (9:1)층을 모두 분액깔때기(II)에 합쳤다. 여기에 1% sodium sulfate 용액 100 mL와 *n*-hexane 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하여 *n*-hexane층을 분액깔때기(III)에 옮겼다.

분액깔때기(II)의 *N,N*-dimethylformamide:water (9:1)층에 *n*-hexane 35 mL씩 넣어 추출하는 과정을 2회 반복하여 *n*-hexane층을 위의 분액깔때기(III)에 합쳤다. 물 40 mL씩을 넣고 흔들어 섞은 후 정치하여 물층을 버리는 조작을 2회 반복하였다. *n*-hexane층과 물층의 분리가 잘 되지 않을 경우 1시간 이상 방치한 후에 층을 분리하였다.

무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 *n*-hexane층을 탈수·여과한 후 40 °C 이하의 수욕상에서 감압하여 약 2 mL로 농축하였다. Sep-Pak florisisil cartridge (Waters)는 dichloromethane 10 mL와 *n*-hexane 20 mL를 초당 2-3방울의 속도로 유출시켜 활성화시킨 후 사용하였다. 활성화된 cartridge에 농축액을 1 mL/min의 속도로 가하여 유출시키고 *n*-hexane 5 mL와 *n*-hexane:dichloromethane (3:1) 15 mL로 각각 용출시킨 후 이 용출액을 40 °C 이하의 수욕상에서 질소가스 하에 날려 보내고 잔류물을 acetonitrile에 녹여 전량을 1 mL로 한 것을 0.2 µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

2.3.2. 신규 개발 시험법(QuEChERS법)

현행 식품공전 분석방법과 달리 본 연구에서는 QuEChERS법을 활용하여 시료의 전처리 과정을 수행하였고 Samira E 등¹⁸ 및 Hussain A 등¹⁹의 논문을 참고하였다.

시료 약 1 g을 conical tube에 취하고 여기에 *n*-hexane saturated acetonitrile을 넣어 전량을 10 mL로 한 후 유지의 지방성분을 충분히 녹이기 위해 *n*-hexane 2 mL를 추가하였다.

시료가 담긴 conical tube에 magnesium sulfate 1 g, sodium chloride 1 g을 첨가하여 5분간 진탕하고 1,769 g

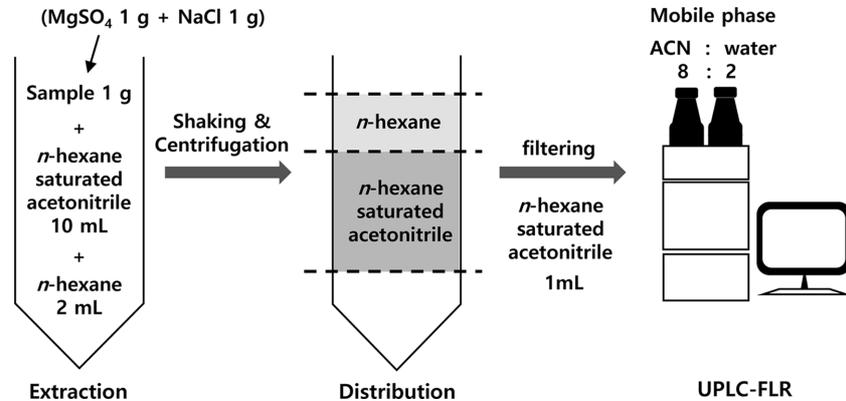


Fig. 1. Graphical diagram of the preparation for analysis of benzo[a]pyrene by QuEChERS.

에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리를 통해 상층액(*n*-hexane)은 버리고 하층액(*n*-hexane saturated acetonitrile) 1 mL를 취하여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 액을 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

국가표준식품성분표에 따르면 식용유지는 수분함량이 0~0.2% 정도로 수분제거 기능을 하는 magnesium sulfate는 필요 없을 것으로 판단했으나 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우를 비교했을 때 전자의 경우에서 유기용매 간 뚜렷한 층분리 효과를 보여 magnesium sulfate와 sodium chloride를 각 1 g씩 소량 사용하여 추출 시 사용하였다.

추출 후 정제를 위해서 일반적인 식품에 주로 사용하는 정제 kit (Agilent 5982-5022)와 지방산 제거에 효과 있는 kit (Agilent 5982-5122)를 사용 해본 결과 두 kit 모두에서 정제 전후 benzo[a]pyrene의 검출에 영향을 미치지 않음을 확인하고 정제과정은 생략하여 이 후 분석을 진행하였다.

2.4. 기기분석 조건

Benzo[a]pyrene 분석을 위해 Waters (Milford, MA, USA)사의 초고성능 액체 크로마토그래프-형광검출기 (UPLC-FLR)를 이용하여 분석하였다. 분석용 칼럼은 Waters사의 HSS T3 (2.1 \times 100 mm, particle size 1.8 μ m, Milford, MA, USA)를 사용하였고, acetonitrile:water (80:20, w/w) 혼합용매를 이동상으로 하여 0.35 mL/min의 속도로 여기과장(Excitation, Ex) 294 nm, 방출과장(Emission, Em) 404 nm에서 기기분석을 실시하였다.

2.5. 유효성 검증

본 연구 분석방법의 유효성 검증을 위해 식품의약

품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)²⁰ 및 시험법 마련 표준 절차 AOAC 가이드라인(2023)²¹을 근거로 하여 선택성, 검출한계, 정량한계, 직선성, 정확성, 정밀성, 회수율 및 매트릭스 효과를 확인하였다.

2.6. 통계처리

본 연구의 실험결과는 Microsoft Excel 프로그램 버전 2016을 사용하여 평균과 상대표준편차를 산출하였으며 현행 식품공전 시험법과 신규 개발 시험법에 대한 통계적 유의성은 t-검정 통해 95% 신뢰수준에서 검증하였다($p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출 조건 확립

QuEChERS법에는 과일과 채소의 잔류 농약을 추출하기 위해 Anastassiades 등²²이 개발한 original법, 미국 Association of Analytical Communities (AOAC) 2007.01 법, 유럽에서 널리 사용되는 EN 15662법이 있다.^{23,24} 이 중 original법을 참고하여 본 연구를 진행하였다. 현행 식품공전 시험법에서는 benzo[a]pyrene 추출은 극성물질인 *N,N*-dimethylformamide를 사용하여 1차로 benzo[a]pyrene을 추출한 다음 역으로 *n*-hexane에 benzo[a]pyrene을 재추출하는 복잡한 과정이 수행된다. QuEChERS법에서는 acetonitrile을 주된 추출용매로 사용하지만 본 연구에서는 식용유지 중 benzo[a]pyrene의 분석에 적합한 추출용매로 *n*-hexane saturated acetonitrile과 *n*-hexane 두 가지를 사용하였다.

Acetonitrile을 단독으로 추출용매로 사용할 경우 유

지의 지방성분과 acetonitrile이 섞이지 않는 특성이 있어 유지의 지방 성분을 녹이기 위한 추출용매로 *n*-hexane을 함께 사용하였다. *n*-hexane saturated acetonitrile과 *n*-hexane을 사용하여 추출을 진행한 결과 benzo[a]pyrene이 하층액에 검출됨을 확인하였고, *n*-hexane을 2 mL 부터 1 mL씩 증가하여 용매 비율에 따른 benzo[a]pyrene 검출 농도의 차이를 비교해 본 결과 *n*-hexane 양의 증가에 따른 benzo[a]pyrene 검출 농도에는 변화가 없는 것으로 확인되어 *n*-hexane의 최종 첨가량을 2 mL로 하였다.

3.2. 시험법에 대한 유효성 검증

3.2.1. 선택성

Benzo[a]pyrene이 검출되지 않은 공시료와 표준용액을 첨가한 시료의 크로마토그램을 비교하여 확인한 결과 benzo[a]pyrene과 동일한 retention time에서 간섭 피크가 발견되지 않아 본 시험법에서의 선택성을 확인하였다(Fig. 2).

3.2.2. 검출한계 및 정량한계

검출한계 및 정량한계는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 사용하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{검출한계(LOD)} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{정량한계(LOQ)} = 10 \times \sigma / S$$

이 때 σ 는 반복 분석 결과의 표준편차이며 S는 검

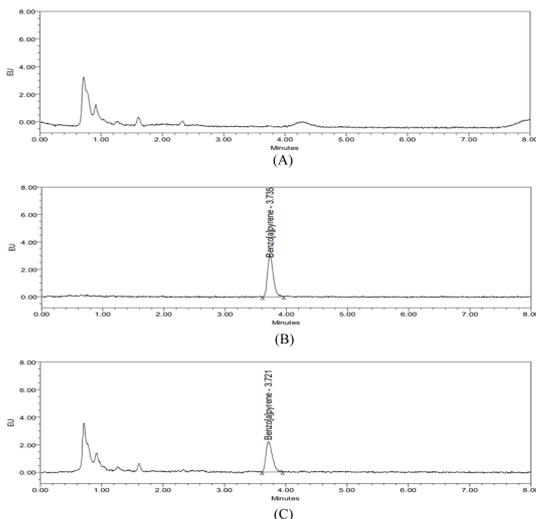


Fig. 2. Chromatograms of blank (A) benzo[a]pyrene standard (B) spiked olive oil containing benzo[a]pyrene (C).

량선의 기울기를 의미한다.

그 결과 검출한계는 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 정량한계는 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났다.

3.2.3. 직선성

직선성을 확인하기 위하여 표준용액 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도 범위에 대한 각각의 피크 면적으로부터 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, R^2) 값을 구하였다. 그 결과 R^2 값이 0.999로 정량 분석에 충분한 수준이었다.

3.2.4. 정확성 및 정밀성

정확성과 정밀성은 공시료에 정량한계 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 기준으로 10배, 20배 및 100배 농도가 되도록 표준용액을 첨가한 후, 회수율과 상대표준편차로 측정하였으며, 각 3반복 실험을 통하여 진행하였다. 당일 시간차를 두고 3반복 시행하여 구한 일내(intra-day) 정확성 및 정밀성은 0.5 (10LOQ) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 각각 77.6~79.4%, 0.14~1.07% 였고, 1.0 (20LOQ) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 73.5~76.7%, 1.58~2.25% 였으며, 5.0 (100LOQ) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 72.6~74.5%, 0.72~7.20% 였다. 3일간 같은 시간에 3반복 시행하여 구한 일간(inter-day) 정확성 및 정밀성은 0.5 (10LOQ) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 각각 78.0~79.3%, 0.52~3.69% 였고, 1.0 (20LOQ) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 73.6~76.7%, 1.58~2.34% 였으며, 5.0 (100LOQ) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 73.3~77.4%, 0.29~0.93%로 나타났다. 정확성 및 정밀성을 나타내는 기준인 60~115%, 21% 내로 모두 만족하는 수준이었다. 일내 정확성 및 정밀성, 일간 정확성 및 정밀성에 대한 결과는 Table 1과 같다.

3.2.5. 회수율

분석법의 정확성을 높이기 위해 benzo[a]pyrene이 검출되지 않은 공시료에 표준용액을 첨가하여 전처리 과정을 3반복 수행하여 그에 따른 회수율과 상대표준편차를 구하였다. 정량한계의 10배, 20배, 100배의 농도가 되도록 하여 분석한 결과 회수율 74.5~79.3%, 상대표준편차 0.52~1.58%로 AOAC에서 제시한 기준 범위²¹⁾인 회수율 60~115%, 상대표준편차 21% 이내를 모두 만족하는 결과를 나타내었다.

참기름, 카놀라유, 콩기름 등 matrix가 다른 식용유지에 새로운 분석법과 동일하게 적용하여 전처리 한 후 3반복 실험을 통해 회수율을 확인한 결과 회수율 74.3~78.2%로 기준인 60~115%를 만족하였고, 회수

Table 1. Accuracy and Precision of the analytical method for benzo[a]pyrene

Conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intra-day (n=3)		Inter-day (n=3)		
	Recovery \pm RSD ¹⁾ (%)	Ave ²⁾ (%)	Recovery \pm RSD ¹⁾ (%)	Ave ³⁾ (%)	
Benzo[a]pyrene	0.5	79.33 \pm 0.52	78.82	78.06 \pm 3.69	78.60
		79.46 \pm 0.14		78.40 \pm 2.84	
		77.66 \pm 1.07		79.33 \pm 0.52	
	1.0	76.70 \pm 1.58	75.36	74.00 \pm 2.34	74.78
		75.83 \pm 2.06		73.66 \pm 2.07	
		73.56 \pm 2.25		76.70 \pm 1.58	
5.0	74.56 \pm 0.93	74.57	77.42 \pm 0.29	75.10	
	76.54 \pm 0.72		73.34 \pm 0.83		
	72.63 \pm 7.20		74.56 \pm 0.93		

¹⁾Recovery \pm RSD: Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

²⁾Ave: Recovery average of Intra-day results

³⁾Ave: Recovery average of Inter-day results

Table 2. Recovery of benzo[a]pyrene spiked into 6 edible oils

Oils	Recovery \pm RSD ¹⁾ (%)
Soybean oil	74.39 \pm 6.17
Sesame oil	75.24 \pm 0.90
Grape seed oil	75.65 \pm 3.88
Sunflower seed oil	78.22 \pm 3.89
Canola oil	78.14 \pm 2.22
Perilla oil	76.03 \pm 8.07

¹⁾Recovery \pm RSD: Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

울의 상대표준편차는 0.90~8.07%로 반복성의 기준인 21% 이하를 만족하여 올리브유 외 다른 식용유에도 적용 가능성이 있는 추출법임을 확인하였다. 회수율과 상대표준편차는 Table 2 및 Fig 3와 같다.

3.2.6. 매트릭스 효과

매트릭스 효과를 확인하기 위하여 matrix matched standard와 pure standard를 모두 기기 분석하여 얻은 peak의 면적을 기준으로 calibration curve를 작성한 후 검량선의 기울기를 이용하여 matrix effect (ME, %)를

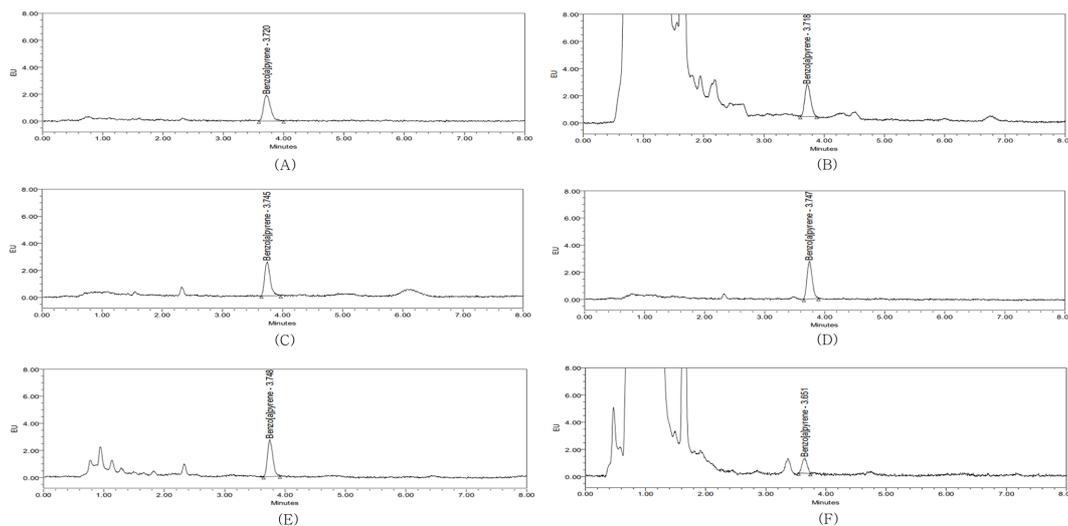


Fig. 3. Chromatograms spiked benzo[a]pyrene in soybean oil (A) sesame oil (B) grape seed oil (C) sunflower seed oil (D) canola oil (E) perilla oil (F).

Table 3. Recovery of the established analytical procedure and the proposed analytical procedure

	Conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	A ¹⁾		B ²⁾	
		Recovery \pm RSD ³⁾ (%)	Ave ⁴⁾ (%)	Recovery \pm RSD ³⁾ (%)	Ave ⁵⁾ (%)
Benzo[a]pyrene	0.5	77.20 \pm 5.62		79.33 \pm 0.52	
	1.0	69.93 \pm 6.09	73.29	76.70 \pm 1.58	76.86
	5.0	72.74 \pm 1.14		74.56 \pm 0.93	

¹⁾A: The established extraction method

²⁾B: The new extraction method

³⁾Recovery \pm RSD: Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

⁴⁾Ave: Recovery average of A method

⁵⁾Ave: Recovery average of B method

다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{ME (\%)} = (\text{Slope of matrix matched calibration} - \text{Slope of solvent standard calibration}) / \text{Slope of solvent standard calibration} \times 100$$

Matrix effect (ME, %)는 신호억제(signal suppression) 또는 신호상승(signal enhancement)의 강도(intensity)를 표현하는데 사용되는 수치로 ME value가 $-20\% < \text{ME} < +20\%$ 이면 낮음(low), $-50\% < \text{ME} < -20\%$ 또는 $+20\% < \text{ME} < +50\%$ 이면 중간(medium), $\text{ME} < -50\%$ 또는 $\text{ME} > +50\%$ 인 경우에는 matrix 영향이 높은(high)것으로 판정한다.²⁵

새로운 추출법에 대한 올리브유의 ME(%)는 2.15%로 낮은 matrix effect를 나타내어 solvent standard calibration으로 정량이 가능한 수준으로 판단하였다.

3.3. 기존 분석법과의 비교

본 연구에서 기존 분석법과 QuEChERS법과의 추출 효율을 비교해 본 결과는 Table 3과 같다. 두 분석법 간 회수율은 각각 69~77%, 74~79%로 회수율의 결과에 대한 유의성을 t-검정을 통해 확인한 결과, 유의성 있는 차이가 없음을 확인하였다($p > 0.05$).

반면 전처리에 소요되는 시간과 유기용매 사용량에서는 현저한 차이를 볼 수 있었는데, 기존 분석방법은 약 7시간(420분)이 걸리는 반면 QuEChERS법을 활용한 본 연구의 분석법의 경우 30분 내외로 기존 분석법과 비교하여 전처리 시간이 92% 단축되었으며, 유기용매 사용량은 기존 약 300 mL에서 본 연구에서는 12 mL로 기존 분석법 대비 96% 정도 감소하였다.

QuEChERS법은 농약의 잔류분석에 주로 이용되고 있으며 농약 외 토양, 식품 등 다양한 분야에서 분석 시간을 단축시키고 유기용매 사용을 줄일 방법으로

많이 시도되고 있다.²⁶⁻²⁸

앞선 결과들을 바탕으로 본 연구는 향후 benzo[a]pyrene 등과 같은 다환방향족탄화수소 물질의 시험법 개선 및 저감화에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 결 론

기존의 benzo[a]pyrene 전처리방법을 개선하기 위하여 새로운 시험방법을 확립하고 그 시험법에 대한 유효성 검증을 실시하였다.

QuEChERS법을 이용한 시료의 추출 및 정제 방법을 benzo[a]pyrene 전처리에 이용하여 전처리 과정을 단순화, 최소화하여 여러 단계의 전처리 과정에서 생기는 손실과 시간을 줄이고자 하였다.

현행 식품공전 분석법과 QuEChERS법 두 분석법간 비교실험을 통해 확인한 회수율은 69~77%와 74~79%로 비슷한 수준으로 나타났지만, 전처리 분석에 소요되는 시간은 식품공전에서 7시간(420분) 이상 걸리는 반면 QuEChERS법을 이용한 분석법은 30분 내외로 소요되어 기존 분석법 대비 92% 이상 시간을 단축할 수 있었다. 또한 전처리 과정에 사용되는 유기용매의 양을 비교했을 때 기존 액체-액체 역추출법의 경우 약 300 mL가 사용되는 반면 QuEChERS법을 이용한 분석법은 10 mL 내외로 96% 이상 유기용매 사용량을 절감하였다. 특히 생식독성물질인 *N,N*-dimethylformamide를 사용하지 않으면서 분석에 걸리는 시간을 줄임과 동시에 유기용매 사용량을 절감하였다. 추출용매로 *n*-hexane saturated acetonitrile과 *n*-hexane을 사용하여 식용유지 중 지방성분을 녹이고 benzo[a]pyrene을 추출 후 시험용액으로 사용하였다.

본 연구 시험법에 대한 유효성 검증 결과, 검출한계 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 정량한계 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 검량선 결정계수

$R^2=0.999$ 로 높은 직선성이 확인되어 정량분석에 충분한 수준이었다.

또한 반복 실험을 통해 구한 일내 정확성 및 정밀성은 72.6~79.4%, 0.14~7.20%이며, 일간 정확성 및 정밀성은 73.3~79.3%, 0.29~3.69%로 정확성 및 정밀성의 기준인 60~115%, 21% 이하 기준을 모두 만족하는 수준이었다. 회수율 및 회수율에 대한 상대표준편차는 74.5~79.3%, 0.52~1.58%로 AOAC에서 제시한 유효 회수율 범위인 60~115%를 만족하였고, 상대표준편차 또한 21% 이하의 값으로 산출되어 기준을 만족하였다.

앞선 결과들을 바탕으로 본 연구는 향후 benzo[a]pyrene 시험법 개선과 안전관리를 위한 자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. H. S. Shin and M. J. Kim, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **19**(2), 1-4. (2014).
2. B. R. Shin, S. O. Yang, and Y. S. Kim, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **19**(1), 5-12 (2014).
3. S. Y. Chung, Y. S. Sho, S. K. Park, E. J. Lee, J. H. Suh, W. J. Choi, J. S. Kim, M. H. Kim, K. S. Kwon, J. O. Lee, H. Y. Kim, and C. W. Lee, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**(4), 688-692 (2004).
4. H. Y. Kim and D. S. Song, *Korean J. Food Preserv.*, **15**(4), 556-561 (2008).
5. S. Y. Jung, J. S. Park, Y. J. Son, S. J. Choi, M. S. Kim, S. H. Park, S. M. Lee, J. I. Lee, I. S. Yu, and Y. Z. Chae, *Report of S.I.H.E.*, **45**, 12-20 (2009).
6. H. J. Nam, I. W. Seo, and H. S. Shin, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**(2), 157-161 (2009).
7. M. H. Lee, S. Y. Yee, X. Jin, D. S. Choi, H. J. Rhee, and J. K. Lee, *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **43**(30), 177-186 (2015). <https://doi.org/10.4014/mb.1508.08007>
8. European Food Safety Authority journal, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.724>, Assessed 4 Aug 2008.
9. H. S. Shin, 'Improvement of analytical method for benzo[a]pyrene in foods and study on monitoring and exposure', Korea Food & Drug Administration (KFDA), Republic of Korea, 2010.
10. S. J. Hu, H. M. Lee, Y. Z. Chae, and E. A. Yoo, *Anal. Sci. Technol.*, **18**(2), 403-409 (2005).
11. I. W. Seo, H. J. Nam, D. H. Kim, and H. S. Shin, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**(3), 339-344 (2009).
12. S. J. Hu, S. H. Jin, K. H. Lee, and D. M. Choi, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**(2), 196-204 (2010). <https://doi.org/10.5806/AST.2010.23.2.196>
13. L. Rey-Salgueiro, M. S. Garcia-Falcon, E. Martinez-carballo, and J. Simal-Gandara, *J. Food Chem.*, **108**(2), 607-615 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.026>
14. R. H. Mo, Y. P. Zhang, Z. G. Ni, and F. B. Tang, *Food Sci. Biotechnol.*, **26**(1), 15-19 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0002-9>
15. S. Y. Jung, J. S. Park, Y. J. Son, S. J. Choi, Y. J. Lee, M. S. Kim, S. H. Park, S. M. Lee, and Y. Z. Chae, *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**(5), 544-552 (2011). <https://doi.org/10.9721.KJFST.2011.43.5.544>
16. A. R. Choi, S. K. Lim, and G. Y. Lee, *KIHA*, **311**, 14-23 (2014).
17. Ministry of Food and Drug Safety Notification No. 2007-26(2007.05.07), Republic of Korea.
18. E. Samira, K. Farzad, J. Katayon, S. Ramezan, B. Mitra, S. Sara, K. Najmeh, and Y. Hassan, *Iran J. Pharm. Res.*, **15**, 165-174 (2016). <https://doi.org/10.22037/ijpr.2016.1817>
19. A. T. Hussain, A. T. Nada, and H. Helaleh, *Hindawi J. Anal. Method Chem.*, **2018**(2), 1-11 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/9206237>
20. Ministry of Food and Drug Safety, Guideline 0116-01(2017.6.), Republic of Korea
21. 'Official method of analysis of AOAC international 22nd edition-Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements', AOAC, 2023.
22. B. S. Asher, P. A. Dotray, R. A. Liebl, J. W. Keeling, G. D. Ritchie, T. K. Udeigwe, J. D. Reed, K. E. Keller, S. J. Bowe, R. B. Aldridge, and A. Simon, *Weed Technology*, **35**(1), 144-148 (2021). <http://doi.org/10.1017/wet.2020.95>
23. S. J. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukkiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, and N. Leepipatpiboon, *J. Chromatogr. A.*, **1217**(16), 2548-2 560 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>
24. T. Rejczak and T. Tuzimski, *Open Chem.*, **13**, 980-1010 (2015). <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>
25. A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, and D. Tsipi, *J. Chromatogr. A.*, **1216**(31), 5856-5867 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>
26. H. G. Kim, H. j. Ham, K. S. Hong, H. C. Shin, and J. H. Hur, *KJEA.*, **39**(1), 44-49 (2020). <https://doi.org/10.5338/>

- KJEA.2020.39.1.6
27. H. Zhao, Z. Zhao, X. Li, S. Di, P. Qi, Z. Wang, J. Wang, P. Tian, H. Xu, and X. Wang, *Food Chem.*, **395**, 133606 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133606>
28. M. Hu, J. Qiu, H. Zhang, X. Fan, K. Liu, D. Zeng, and H. Tan, *J. Agric. Food Chem.*, **66**(39), 10300-10308 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04186>

Authors' Positions

Min-Jeong Kim : Researcher
Jun-Young Park : Researcher
Min-Ju Kim : Researcher
Eun-Young Jo : Researcher
Mi-Young Park : Researcher
Nan-Sook Han : Director
Sook-Nam Hwang : Deputy Minister