

## An analysis of benzoic acid, methyl paraben and butyl paraben in soy sauce using isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry

Seonghee Ahn<sup>★</sup>

Center for Analytical Chemistry, Korea Research Institute of Standards and Science, 267 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34113, Korea

(Received September 6, 2018; Revised October 19, 2018; Accepted October 29, 2018)

### 동위원소희석 질량분석법을 이용한 간장 중의 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤의 분석

안 성 희<sup>★</sup>

한국표준과학연구원 분석화학표준센터

(2018. 9. 6. 접수, 2018. 10. 19. 수정, 2018. 10. 29. 승인)

**Abstract:** Benzoic acid, methyl paraben, and butyl paraben are preservatives that have been used in pharmaceutical, cosmetic, and food products. However, as their toxicities for human have been reported, many nations and organizations including Korea have established a regulation limit for their usage of these preservatives in food products. The present study developed the isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry method for accurate determination of three target preservatives in soy sauce. In this study, the isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry method was developed for accurate determination of three target preservatives in soy sauce. LC separation was optimized considering the *pKa* of benzoic acid which is lower than those of methyl and butyl parabens. A C18 column was used with 5 mM ammonium acetate and methanol as mobile phases. Mass spectrometry was operated in negative mode and selected reaction monitoring mode (SRM). Soy sauce sample was cleaned-up with C18 SPE cartridge for removing matrix interferences and color material. Optimized conditions and the method were validated with soy sauce reference materials for the analysis of food preservatives from Health Science Authority in Singapore. The measured values of benzoic acid, methyl and butyl paraben agreed well with reference values within their uncertainties.

**요약:** 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤은 식품, 의약품뿐 만 아니라 화장품 분야에서도 사용되는 보존료이다. 그러나 이들 보존료들의 여러 가지 독성이 보고되면서, 한국을 비롯하여 여러 나라들에서 식품 중의 이들 보존료의 사용을 규제하고 있다. 본 연구에서는 간장 중의 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤의 정확하고 정밀한 분석을 위하여 세가지 분석물질의 동위원소를 내부표준물질로 이용하는 동위원소 희석 액체크로마토그래피 질량분석법 (Isotope Dilution Liquid Chromatography Mass Spectrometry, ID-LC/

<sup>★</sup> Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-5652 Fax : +82-(0)42-868-5801

E-mail : sahn@kriss.re.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.

MS)을 개발하였다. 메틸, 부틸 파라벤보다  $pK_a$ 가 낮은 안식향산을 고려하여 acetic acid로 pH 4.0으로 조정된 5 mM ammonium acetate를 이동상 용매로 사용하여 C18 컬럼으로 분리하였다. 질량분석 조건으로는 전기분무이온화법으로 음이온을 생성하여 음이온 모드에서 분석하였으며, 방해물질로부터 선택성을 향상하기 위해 선택반응분석법 (Selected Reaction Monitoring)을 이용하여 분석하였다. 간장의 색깔과 간장 중의 여러 가지 방해물질들을 제거하기 위하여 C18 카트리지를 이용하여 정제하였다. 최적화된 조건과 방법을 이용하여 싱가포르 Health Science Authority(HSA)가 제공하는 간장 기준시료를 분석하였다. 본 연구원에서 측정된 결과값은 HSA가 제공하는 기준값과 불확도 내에서 일치하였다.

**Key words:** benzoic acid, methyl paraben, butyl paraben, ID-LC/MS/MS

## 1. 서 론

기술의 발전으로 농수산물을 비롯한 식품은 거대한 양으로 생산되고 있으며, 이 거대한 수확량을 보존하고 이동하려면 첨가물이나 보존료가 없이는 불가능한 상황이다.<sup>1</sup> 그렇지만 이러한 보존료가 암을 발생시키거나 내분비계 혼란을 야기시키는 등 인간의 건강에 문제가 되고 있다는 것은 보존료가 사용되면서부터 알려진 내용이기도 하다.<sup>2-6</sup> 그렇다고 이러한 보존료 사용을 하지 않는다면 불편함을 비롯한 또 다른 문제가 야기될 것이다. 다만 적당한 양을 사용하여 건강을 해치지 않으면서 사용하도록 유도해야 하는 것이다.

안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤은 음식뿐만 아니라 의약품, 화장품에도 사용되는 보존료이다.<sup>7-10</sup> 안식향산의 경우 비타민제 음료에서 자외선 아래 벤젠이 생성된다고 알려지면서<sup>11</sup> 비타민제 음료에서는 사용이 금지되었다. 하지만 아직도 자양강장제와 같은 의약품 외 음료에서는 사용이 되고 있다. 파라벤(파라옥시안식향산)은 음료, 식품뿐만 아니라 화장품, 의약품에서도 가장 많이 사용되고 있는 보존료 중 하나이다.<sup>9,12-14</sup> 파라벤의 알킬그룹 탄소수가 증가할수록 독성은 증가한다.<sup>15-16</sup> 한국에서는 프로필 및 부틸 파라벤은 식품에 첨가하는 것을 금지하고 있으며, 메틸, 에틸은 제한적으로 첨가량을 규제하고 있다.<sup>17</sup> 세가지 분석물질의 구조 및  $pK_a$ 값, 규제치를 Table 1에 소개하였다.

이러한 사용량에 대한 규제치가 제정된 이후 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤의 정확한 측정을 위한 분석법이 개발되었다. 이들 첨가물들은 휘발성이 없어서 유도체화를 통해 기체크로마토그래피를 이용한 방법이 사용되었다.<sup>18-20</sup> 또는 UV검출기를 이용한 액체크로마토그래피 방법이 많이 사용되는 분석법이다.<sup>21-24</sup> 최근에는 액체크로마토그래피와 연결된 tandem 질량분석법(Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry,

LC/MS/MS)을 이용하여 식품 중에 이러한 첨가물들의 분석을 선택적으로 민감하게 할 수 있다.<sup>25-28</sup> 이러한 LC/MS (or LC/MS/MS)법이 선택적이고 민감하게 분석할 수 있지만, 여전히 식품으로부터 같이 용출된 여러 가지 방해물질의 영향을 많이 받고 있다. 동위원소 물질을 내부표준물질로 이용하는 동위원소희석 질량분석법은 식품에서 분석물질과 같이 용출되는 방해물질에 의한 바이어스를 줄여주어 정확하고 정밀한 분석을 할 수 있는 방법이다.<sup>29-30</sup>

이 논문에서는 동위원소희석 질량분석법을 이용하여 간장 시료 안에 있는 안식향산, 메틸 파라벤, 부틸 파라벤의 정확한 측정을 할 수 있는 방법을 개발하였다. 안식향산과 파라벤의 화학적 성질이 다르지만 동시에 분리분석할 수 있는 최적화 조건들을 찾았으며, 시료로부터 용출되는 색깔과 방해물질을 제거하기 위하여 두 가지 SPE cartridges를 선택하여 비교하였다. 최적화된 분리조건, 질량분석기의 조건들을 이용하여 싱가포르 HSA가 제공한 간장 기준물질을 이용하여 분석법을 유효화하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약

표준용액 제조를 위한 안식향산은 National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였으며, 순도분석은 본 연구원에서 진행하였다. LC/MS와 LC/UV를 이용하여 구조적 불순물, 열분석기(Thermogravimetric Analysis)를 이용하여 잔류 무기물질, Headspace GC/MS를 이용하여 잔류용매, Karl-Fisher titration을 이용하여 물분석을 진행하여 (99.993±0.307)% 순도를 확인하였다. 메틸파라벤은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 본 연구원의 순도분석 절차에 따라 진행하여 (99.790

± 0.044)%의 순도를 확인하였다. 부틸파라벤은 Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany) 사에서 구입하여 본 연구원의 순도분석 절차에 따라 진행하여 (99.992±0.070)%의 순도를 확인하였다. 내부 표준물질로 사용하기 위하여 동위원소 <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-안식향산, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-메틸파라벤, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-부틸파라벤은 Cambridge Isotope Laboratories사 (Andover, MA, USA)에서 구입하였다. 이들 분석물질이 포함된 간장 기준물질은 Health Science Authority (HSA, Singapore)에서 제공해 주었다. 메탄올, 아세트나이트릴과 같은 유기 용매들은 HPLC 등급으로 Burdick and Jackson (Muskegon, MI, USA)에서 구입하였으며, 완충용액을 만들기 위한 ammonium acetate (minimum 98%)와 acetic acid (purified by double-distillation)는 Sigma-Aldrich (경기도, 한국)에서 구입하였다.

## 2.2. 표준용액의 준비

세 가지 분석물질의 표준용액은 본 연구원에서 약 100 mg/kg 수준이 되도록 무게 증량법으로 제조하였다. 백금편에 약 5 mg을 취하여 그 무게를 정확히 측정하고, 약 50 mL용매 (5 mM ammonium acetate: methanol, 1:1, v/v)를 첨가한 후 정확한 무게를 측정하여 계산하였다. 세 가지 분석물질의 동위원소 표준용액도 같은 방법으로 약 100 mg/kg 수준이 되도록 제조하였다. 동위원소비 표준용액은 분석물질의 표준용액과 동위원소 표준용액의 농도비가 1:1이 되도록 혼합하여 제조하였다.

## 2.3. 시료의 준비

간장 시료는 1 g의 무게를 정확하게 측정하고, 여기에 세 가지의 혼합 동위원소 표준용액을 첨가한 후 다시 무게를 측정하였다. 이 간장 시료는 근처 마트에서 구입한 한국 브랜드의 간장이었으며 시료에서 분석 물질 세 가지가 검출되지 않았다. 추출과정은 진행하지 않았으며, 정제과정은 두 가지 방법으로 진행하였다. 첫 번째는 간장 시료 1 g을 Carb 고체상 추출 카트리지 (Supelco, 6 mL, 0.25 g)를 통과하여 물 5 mL로 씻어낸 후 메탄올 5 mL로 용출한 용액, 마지막 두 번째는 간장 시료 1 g을 C18 고체상 추출 카트리지 (Supelco, 6 mL, 0.5 g)를 통과하여 물 5 mL로 씻어낸 후 메탄올 5 mL로 용출하였다. 이 메탄올 용액은 질소와 함께 증발시킨 후 이동상 용매인 5 mM ammonium acetate용액과 메탄올, 1:1 혼합액으로 복원한 용액을 PVDF로 필터한 후 사용하였다.

## 2.4. 액체크로마토그래피-질량분석기

분석에 사용된 고성능 액체크로마토그래피는 Waters 사 (Milford, MA, USA) Acquity UPLC system이며, 컬럼은 C18 가드컬럼이 연결된 Waters사의 Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 10 mm) 컬럼을 사용하였다. 이동상 A는 5 mM ammonium acetate (pH 4 acetic acid첨가)을, 이동상 B는 메탄올을 사용하였다. 이동상 비율은 A와 B의 비율이 처음 60%:40%로 시작하여 5분간 유지하다가 5분에서 10분까지 A와 B의 비율이 10%:90%가 되도록 증가시켰으며, 바로 이동상 B가 100이 되도록 하여 17분까지 유지하였다 이후 23분까지 A와 B의 비율이 처음 60%:40%로 유지하게 하였다. 유속은 0.2 mL/분으로 흘려주었으며, 시료는 10 mL씩 주입하였다.

분석에 사용된 질량분석기는 전기 분무 이온화 (Electrospray Ionization) 장치가 장착된 ThermoElectron (San Jose, CA, USA)사의 TSQ Quantum 질량분석기를 사용하였으며, 음이온모드 (negative ion mode)에서 이온화 분무 전압을 4000 V 가하여 분석을 수행하였다. tandem 질량분석기의 선택반응분석법 (Selected Reaction Monitoring, SRM)을 이용하여, 분석물질과 분석물질의 동위원소물질의 면적비를 측정하였다. 선택반응 분석법을 위한 충돌에너지와 조각이온들의 채널은 Table 2에 나타내었다.

## 2.5. 질량분율의 계산

동위원소희석 질량분석법을 이용하여 분석물질들의 결과는 간장 속의 분석물질들의 질량분율로 나타내었고, 이때 사용된 식은 한점 보정법(one-point calibration with isotope-ratio matching)으로, 식은 다음과 같다.

$$C_{\text{sample}} = \frac{M_{\text{is-sol,spiked}} \cdot AR_{\text{sample}} \cdot M_{\text{s-sol,std.mix}} \cdot C_{\text{s-sol}}}{M_{\text{sample}} \cdot AR_{\text{std.mix}} \cdot M_{\text{is-sol,std.mix}}}$$

이 때 사용된 약자는 다음과 같다,

$C_{\text{sample}}$	시료에 들어있는 분석물질의 농도 (the concentration of analyte in the sample);
$C_{\text{s-sol}}$	분석물질의 표준용액의 농도(the concentration of the analyte standard solution);
$M_{\text{sample}}$	분석에 사용된 시료의 양 (the mass of the sample taken for analysis);
$M_{\text{is-sol, spiked}}$	시료에 첨가한 분석물질의 동위원소의 양 (the mass of the isotope standard solution added to the sample aliquot);
$M_{\text{is-sol, std. mix}}$	동위원소비 표준용액에 첨가한 분석물

	질의 동위원소 표준용액의 양 (the mass of the isotope standard solution added to the isotope ratio standard solution);
$M_{s-sol, std. mix.}$	동위원소비 표준용액에 첨가한 분석물질의 표준용액의 양 (the mass of the analyte standard solution added to the isotope ratio standard solution);
$AR_{sample}$	LC/MS로 시료에서 측정된 분석물질/동위원소의 면적의 비 (the area ratio of analyte/isotope for sample extract, observed by LC/MS);
$AR_{std. mix.}$	LC/MS로 동위원소비 표준용액에서 측정된 분석물질/동위원소의 면적의 비 (the area ratio of analyte/isotope for the isotope ratio standard solution, observed by LC/MS).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. LC/MS/MS 분석의 최적화 조건

안식향산과 메틸 및 부틸 파라벤의 구조와  $pK_a$ , 용해도를 Table 1에 나타내었다. 용해도는 세가지 분석물질 모두 낮기 때문에 표준용액의 용매는 이동상 용매 5 mM ammonium acetate 용액과 메탄올을 1:1로 섞어서 제조하였다. 안식향산은  $pK_a$ 가 4.2이면서 전기 분무 이온화법으로 생성된 음이온은  $[C_6H_5CO_2]^-$  구조인 반면, 메틸 및 부틸 파라벤의 경우는  $pK_a$ 가 8.5이고 음이온도  $[CO_2CH_3(또는C_4H_9)C_6H_5O]^-$ 의 구조로 생성된다. 선택반응분석법(SRM, Selected Reaction Mode)에 이용되는 조각이온의 경우에도 안식향산과 파라벤의 조각경로는 다르게 생성된다. 안식향산의 경우 카르복실기가 떨어진  $[M-CO_2H]^-$ 로  $m/z$  77이온이

생성되나, 파라벤의 경우  $[M-H-CH_3(또는C_4H_9)]^-$ 와  $[M-H-CO_2CH_3(또는C_4H_9)]^-$  두 개의 딸이온이 생성된다. 이 중에서  $[M-H-CO_2CH_3(또는CO_2C_4H_9)]^-$ 로 생성된 딸이온( $m/z$  92)을 선택하여 분석하였다. 그러므로 메틸파라벤과 부틸파라벤의 조각이온은 같게 된다. 이 세가지 분석물질의 동위원소의 경우에도 이와같은 경로의 조각이온이 생성된다. 이들 분석물질의 정량분석을 위하여 선택반응분석법을 사용하였으며 이때 사용된 모분자이온과 조각이온 채널은  $m/z$ 와 함께 실험부본에서 설명하였다.

세가지 분석물질의 액체크로마토그래피 질량분석 조건들을 최적화하였다. 먼저 이동상 용매의 농도를 결정하기 위하여 5 mM ammonium acetate 용액과 20 mM ammonium acetate 용액을 각각 이동상 용매로 사용하여 비교하였고 이에 대한 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 파라벤의 경우 크로마토그램에서 피크 모양이 이동상 용매의 농도에 상관없었다. 하지만 안식향산의 경우 Fig. 1에서 보여지는 것처럼 20 mM ammonium

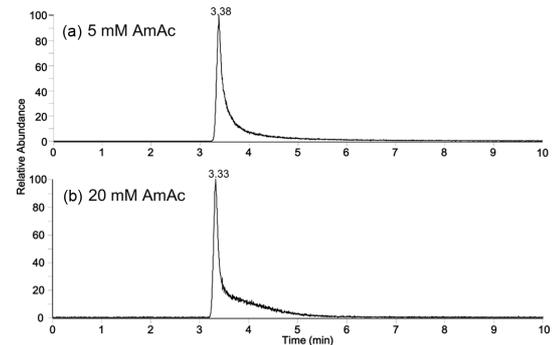


Fig. 1. Chromatograms of benzoic acid with 5 mM ammonium acetate (a) and 20 mM ammonium acetate (b) solution as an aqueous mobile phase. The mass fraction of benzoic acid was 40 mg/kg.

Table 1. Structures,  $pK_a$ , solubilities and regulation limits for benzoic acid, methyl paraben, and butyl paraben

Compound	Structure	$pK_a$	Solubility	Regulation limit (in soy sauce)
Benzoic acid	<chem>OC(=O)c1ccccc1</chem>	4.2	3.4 g/L	0.69 g/kg
Methyl paraben	<chem>CC(=O)Oc1ccc(O)cc1</chem>	8.5	2.5 g/L	0.25 g/kg
Butyl paraben	<chem>CCCC(=O)Oc1ccc(O)cc1</chem>	8.5	Less than 1 mg/mL	Banned in food

Table 2. Channels and collision energies for selected reaction monitoring of ID-LC/MS/MS

Compound	Channels	Collision energy (V)
Benzoic acid	$m/z$ 122 $\rightarrow$ 77	14
$^{13}\text{C}_6$ -Benzoic acid	$m/z$ 128 $\rightarrow$ 83	14
Methyl paraben	$m/z$ 151 $\rightarrow$ 92	23
$^{13}\text{C}_6$ -Methyl paraben	$m/z$ 157 $\rightarrow$ 98	23
Butyl paraben	$m/z$ 193 $\rightarrow$ 92	27
$^{13}\text{C}_6$ -Butyl paraben	$m/z$ 199 $\rightarrow$ 98	27

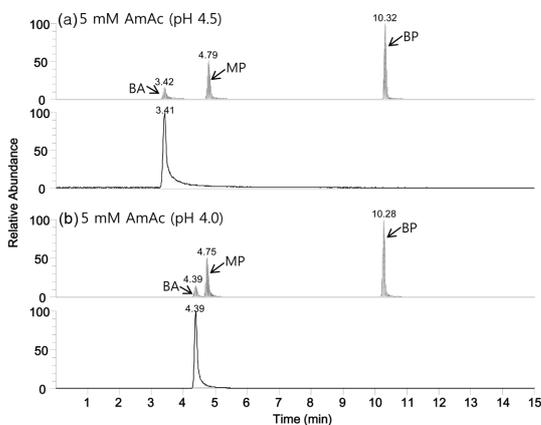


Fig. 2. Comparison of chromatograms for benzoic acid (3.4 min), methyl paraben (4.8 min) and butyl paraben (10.3 min) with 5 mM ammonium acetate solution (a) at pH 4.5 and (b) at pH 4.0. The mass fractions of benzoic acid, methyl paraben and butyl paraben were 40 mg/kg, 10 mg/kg and 10 mg/kg, respectively.

acetate 용액에서는 피크 모양에서 tailing이 심하게 나타났다. 피크의 세기도 5 mM ammonium acetate 용액에서 5배 정도 큰 것을 볼 수 있었다.

또한 이동상 용매의 pH에 따른 피크와 피크들의 분리를 관찰하였다. 안식향산의 pKa가 4.2이므로 이동상 용매의 pH를 4.0과 4.5에서 비교하였다. 5 mM ammonium acetate 용액을 제조 후 acetic acid로 pH를 조정하였다. 이동상 용매 pH 4.5에서 안식향산과 메틸 파라벤의 머무름 시간의 차이가 약 1.47분인(Fig. 2(a)) 반면 pH 4.0에서는 0.65분으로(Fig. 2(b)) 나타났다. 하지만 이동상 용매 pH 4.0에서 안식향산의 피크 tailing현상이 감소한 것을 알 수 있었다. 그래서 5 mM ammonium acetate 용액 pH 4.0의 이동상 용매로 선택하였다.

### 3.2. 간장 시료의 전처리 조건

최적화된 LC/MS/MS의 조건으로 간장 시료를 분석

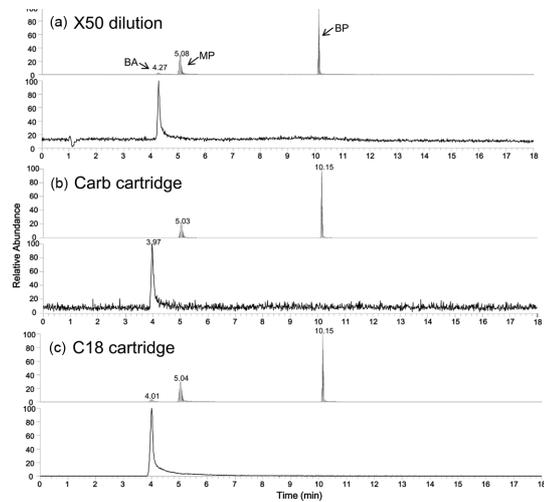


Fig. 3. Total ion chromatograms and benzoic acid chromatograms of soy sauce after (a) dilution, (b) Carb SPE cartridge and (c) C18 SPE cartridge. The soy sauce sample for (a) solution was from HSA. The soy sauce sample for (b) and (c) soy sauce was spiked with standard mixture solution into the soy sauce from the local market. The mass fraction of benzoic acid was 20 mg/kg, and the mass fractions of methyl paraben and butyl paraben were 4 mg/kg.

하기 전에 간장 시료의 정제 과정의 조건을 확립하였다. 간장 시료의 경우 물이 주된 원료이지만, 간장이 가진 색깔과 부유물을 제거해야만 한다. 처음에는 간장 시료의 색깔과 피크 세기를 비교해 보려고, 싱가포르 Health Science Authority (HSA)의 시료인 간장 시료를 50 배 묽힌 후 PVDF로 필터한 용액을 사용하였다. LC/MS/MS 분석한 결과 Fig. 3(a)에서 보는 것처럼 안식향산의 피크 세기가 메틸, 부틸 파라벤에 비하여 매우 작게 나온다. Fig. 3는 Total Ion Chromatogram (TIC)을 보여주며, 안식향산의 경우는 피크 세기가 다른 파라벤에 비하여 상대적으로 작아서 TIC 밑에 안식향산의 크로마토그램을 나타내었다. 이에 고체상 추출 카트리지를 사용하기 위해 Supelco사의 Carb 카트리지와 C18 카트리지를 두 가지 카트리지를 사용하여 비교하였다. Carb 카트리지의 경우 시료의 색깔을 제거하는 방법에 많이 사용되는 카트리지가이다. 하지만, 안식향산이 Carb 카트리지에 걸리지 않고 용출되어 TIC에서는 보이지 않는 정도로 50 배 묽힌 시료보다도 더 작은 세기의 피크를 보였다. C18 카트리지의 경우는 표준용액과 비슷한 정도로 안식향산의 피크가 보였으며, 간장의 색깔도 적절하게 제거할 수 있었다. 그러므로 간장시료의 정제과정은 C18 카트리지를 이

Table 3. ID-LC/MS/MS measurement results of 5 sub-samplings from soy sauce reference material

	Benzoic acid (mg/kg)	Methyl paraben (mg/kg)	Butyl paraben (mg/kg)
Sub sample # 1	153.74 ± 4.59	101.76 ± 2.48	101.07 ± 2.95
Sub sample # 2	153.79 ± 6.10	101.09 ± 2.44	101.17 ± 3.12
Sub sample # 3	155.38 ± 6.57	102.08 ± 2.46	101.22 ± 3.16
Sub sample # 4	156.36 ± 4.13	101.00 ± 2.69	100.81 ± 3.51
Sub sample # 5	155.86 ± 5.15	101.52 ± 2.70	101.19 ± 3.26
Average	155.02	101.49	101.09
Standard deviation	0.77 %	0.45 %	0.17 %

The number after “±” is the expanded uncertainty of the preceding value with the level of confidence of 95 %

용한 용액으로 분석하였다.

이러한 최적화된 LC/MS/MS 조건과 전처리 조건 아래 검출한계와 정량한계를 측정하였다. 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤의 검출한계(신호 대 잡음비 3 일때)는 각각 0.1 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.005 mg/kg 이었으며, 정량한계(신호 대 잡음비 10일때)는 각각 0.5 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.02 mg/kg으로 확인되었다.

### 3.3. ID-LC/MS/MS 분석법을 이용한 간장 시료의 분석

최적화된 전처리 방법과 LC/MS/MS 조건들을 이용하여 싱가포르 Health Science Authority (HSA)에서 제공한 기준시료인 간장 시료를 분석하여 유효성을 검증하였다. 먼저 간장 시료의 5 개의 sub-sampling의 분석 결과를 Table 3에 나타내었다. 5 개 시료의 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤의 표준편차는 1 % 이하로 반복성있는 결과를 보였다. 이들 결과는 기준 시료를 제공한 HSA의 기준값과 비교하였다. 비교 결과는 Table 4에서 나타내었다. 세가지 분석물질 모두 본 연구원에서 ID-LC/MS/MS를 이용하여 측정한 값과 HSA에서 제공한 기준값이 각각의 불확도 안에서 일치하는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Comparison of measured values by KRISS with reference values of benzoic acid, methyl paraben, and butyl paraben in soy sauce sample

Compound	Measured values by KRISS (mg/kg)	Reference values (mg/kg)
Benzoic acid	155.03 ± 4.28	154.55 ± 2.26
Methyl paraben	101.49 ± 2.44	100.95 ± 2.57
Butyl paraben	101.09 ± 2.85	99.05 ± 2.57

The number after “±” is the expanded uncertainty of the preceding value with the level of confidence of 95 %

## 4. 결 론

간장 시료에 들어있는 보존료인 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤을 분석하기 위하여 선택성이 뛰어난 LC/MS/MS법에 기초한 동위원소희석 액체크로마토그래피-질량분석법을 개발하였다. 세가지 분석물질을 C18 컬럼으로 분리하기 위하여 5 mM ammonium acetate 용액을 이동상 용매로 사용하였으며, 5 mM ammonium acetate 용액은 acetic acid를 이용하여 pH 4.0으로 조정하면 pH 4.5 용액보다 안식향산의 피크 tailing 현상을 줄일 수 있었다. 정제과정에서는 간장의 색깔과 방해물질들을 제거하기 위해 C18 카트리지를 이용하여 메탄올로 용출된 용액을 분석하였다. 최적화된 방법과 LC/MS/MS 조건들을 이용하여 싱가포르 HSA가 제공한 기준시료인 간장 시료를 분석한 결과 5개 sub-sampling의 반복성의 표준편차 1 % 이하로 나왔으며, 본 연구원에서 측정한 세가지 분석물질의 결과는 HAS가 제공한 기준값과 각각의 불확도 내에서 모두 일치하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 이 분석법이 간장 중 안식향산, 메틸파라벤, 부틸파라벤을 분석하는 데에 정확, 정밀한 정량값을 제시하는 방법임을 확인할 수 있었다.

## References

1. A. L. Branen, R. M. Davidson, S. Salminen, and J. H. Thorngate III, Food additives, 2<sup>nd</sup> Ed., Marcel Dekker; USA, 2005.
2. J. Boverg, C. Taxvig, S. Christiansen, and U. Hass, *Reproductive Toxicol.*, **30**(2), 301-312 (2010).
3. A. Azzouz and A. J. Rascon, E. Ballesteros, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **119**, 16-26 (2016).

4. C. Haman, X. Dauchy, and C. Rosin, J.-F. Munoz, *Water Res.*, **68**, 1-11 (2015).
5. D. Bledzka, J. Gromadzińska, and W. Wasowicz, *Environ. Int.*, **67**, 27-42 (2014).
6. R. S. Tavares, F. C. Martins, P. J. Oliveira, J. Rama, J. P. Santos, and F. P. Peixoto, *Reproductive Toxicol.*, **27**(1), 1-7 (2009).
7. F. A. Anderson, *Int. J. Toxicol.*, **27** (Suppl. 4), 1-82 (2008).
8. Y. Guo and K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.*, **47**(24), 14442-14449 (2013).
9. M. G. Soni, I. G. Carabin, and G. A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.*, **43**(7), 985-1015 (2005).
10. F. J. M. Mota, I. M. P. L. V. O. Ferreira, S. C. Cunha, M. Beatrix, and P. P. Oliveira, *Food Chem.*, **82**, 469-473 (2003).
11. L. K. Gardner, and G. D. Lawrence, *J. Agri. Food Chem.*, **41**, 693-695 (1993).
12. A. Panusa and L. Gagliardi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 786-789 (2008).
13. P. D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.*, **28**(5), 561-578 (2008).
14. A. L. Cashman, and E. M. Warshaw, *Dermatitis*, **16**(2), 57-66 (2005).
15. N. Aubert, T. Ameller, and J.-J. Legrand, *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 445-454 (2012).
16. N. Raza, K.-H. Kim, M. Abdollah, W. Raza, and R. J. C. Brown, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **98**, 161-173 (2018).
17. Korea Food Additives Code [https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04\\_03.jsp?idx=509](https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=509).
18. G. Shanmugam, B. R. Ranaswamy, V. Radhakrishnan, and H. Tao, *Microchem. J.*, **96**(2) 391-396 (2010).
19. F. De Crpp. J. de Schutter, W. Van den Bossche, and P. De Moerloose, *Chromatographia*, **18**(5), 260-264 (1984).
20. R. Jain, M. K. R. Mudiam, A. Chauhan, R. CH, R. C. Murthy, and H. A. Khan, *Food Chem.*, **141**, 436-443 (2013).
21. E. Sottofattori, M. Anzaldi, A. Balbi, and G. Tonello, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**, 213-217 (1998).
22. M. J. Akhtar, S. Khan, I. M. Roy, and I. A. Jafri, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 1609-1613 (1996).
23. C. Piao, L. Chen, and Y. Wang, *J. Chromatogr. B*, **969**(15), 139-148 (2014).
24. C.-W. Chen, W.-C. Hsu, Y.-C. Lu, J.-R. Weng, and C.-H. Feng, *Food Chem.*, **241**, 411-418 (2018).
25. J. Lv, L. Wang, X. Hu, Z. Tai, and Y. Yang, *Anal. Lett.*, **45**(14), 1960-1970 (2012).
26. A. Panusa and L. Gagliardi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 786-789 (2008).
27. S. Cao, Z. Liu, L. Zhang, C. Xi, X. Li, G. Wang, R. Yuan, and Z. Mu, *Anal. Methods*, **5**, 1016-1023 (2013).
28. C. Han, B. Xia, X. Chen, J. Shen, Q. Miao, and Y. Shen, *Food Chem.*, **194**, 1199-1207 (2016).
29. P. De Bivère, *Anal. Proc.*, **30**, 328-333 (1993).
30. K. G. Heumann, *J. Mass Spectrom. Rev.*, **11**, 41-67 (1992).

---

### Author' Positions

Seonghee Ahn : Principal Research Scientist

Vol. 31, No. 6, 2018