

올리브유 중 벤조피렌 분석

허수정 · 우건조 · 최동미★

식품의약품안전청, 식품평가부
(2007. 3. 30. 접수, 2007. 4. 9. 승인)

Determination of benzo(a)pyrene in olive oils

Soojung Hu, Gun-Jo Woo and Dongmi Choi★

Food Safety Evaluation Department, Korea Food & Drug Administration,
#194 Tongil-Ro, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea

(Received March 30, 2007; Accepted April 9, 2007)

요 약: 올리브유중 벤조피렌을 분석하기 위하여 고속액체크로마토그래피/형광검출기를 이용하였다. 시료의 지방성분을 헥산으로 제거한 후 N,N-DMF 수용액을 다시 헥산으로 추출하여 후로리실 SPE 카트리지로 정제한 후 기기분석하였다. 이동상으로는 아세토니트릴과 물의 혼합용액(8:2)을 사용하였으며 형광검출기의 여기파장은 294 nm이었고 형광파장은 404 nm이었다. 평균 회수율은 95 %이었으며, 정량한계는 0.9 µg/kg이었다. 대상 식품인 올리브유 중 벤조피렌의 검출수준은 불검출~1.9 µg/kg이었으나, 식품공전의 기준인 올리브유중 벤조피렌의 최대수준 2.0 µg/kg이하이었다.

Abstract: To determine levels of benzopyrene in olive oils, a selective analytical method of HPLC/FLD has been applied. After removing fat in food samples with hexane, it was extracted in aqueous N,N-DMF solution, cleaned-up on florisil SPE cartridge and analyzed by the instrumental analysis. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water in 8:2 by the isocratic elution and the excitation wavelength of fluorescence detector was 294 nm and emission wavelength of it was 404 nm. The average recovery was about 95 % and the limit of quantitation was 0.9 µg/kg. The levels of benzopyrene in the selected olive oil samples were ranged from not detected to 1.9 µg/kg, however, they were under 2.0 µg/kg, the maximum level of benzopyrene in olive oil which was established in the food code.

Key words: benzopyrene, olive oil, food, HPLC/FLD

1. 서 론

Polyaromatic hydrocarbons (PAHs)는 기름, 나무, 쓰레기 또는 석탄과 같은 유기물질의 불완전 연소나 담

배, 산불과 같이 500~700°C에서의 열분해에 의해 생성되는데 10,000개 정도의 화합물 그룹으로 구성되어 있다. PAHs는 방향족 고리로 구성되어진 화합물로서 치환기가 없는 구조로 방향족 고리가 4개 이하이면

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-380-1664 Fax : +82-(0)2-382-4892

E-mail: mechoi@kfda.go.kr

light PAHs, 5개 이상이면 heavy PAHs라 칭하기도 한다.¹⁻³ 이 중 다수의 PAHs는 발암성 및 돌연변이성을 지니고 있다고 알려져 있는데 유럽연합(European Union)의 경우 33개의 PAHs를 평가하여 유전독성 및 발암성이 있는 15개의 PAHs를 선정하고 5개의 고리로 구성되어 있는 benzo(a)pyrene인 [B(a)P]를 marker로 사용하여 지속적으로 연구검토하고 있다.⁴ 국제암연구소 International Agency for Research on Cancer (IARC)의 경우 1989년에 1차 독성평가를 하였고, 2006년 8월 재평가를 하여 benzo(a)pyrene은 1 그룹(인체발암물질), dibenzo(a, h)anthracene 등 3종은 2A 그룹(발암가능물질), benzo(a)anthracene 등 11종은 2B 그룹(발암우려물질), benzo(g, h, i)perylene 등 45종은 3 그룹(인체발암물질로 분류할 수 없는 물질)으로 분류하고 있다.^{5,6}

인간은 주로 육류, 어류, 유지류 등 지방성 식품에 의해 PAHs에 노출된다.⁷⁻⁹ 식품오염은 환경에서 유래되기도 하지만 제조공정 중에도 이루어질 수 있다. 특히 지용성인 성상으로 인하여 식용유 생산을 위한 곡류나 원재료에 간접 건조나 온도 조절 등 주의를 기울이지 않으면 인위적인 건조나 열 공정과정 중 PAHs에 오염될 수 있다. 따라서 수확기의 비 등 일기 조건에 따른 고농도의 습기 제거를 위한 건조, 저장 중 이차 독성 대사물질인 곰팡이 생성을 방지하기 위하여 종자나 낱알의 건조 등은 식용유 제조 중 PAHs 생성의 원인이 될 수 있다. 또한 식용유 제조·가공 시 착유를 위한 가열공정에 의해서도 PAHs가 생성될 수 있다.¹⁰

유지를 함유한 식물 또는 동물로부터 얻은 원유나 이를 제조·가공한 식용유지에는 콩기름, 옥수수기름,

참기름, 들기름, 땅콩기름, 올리브유, 팜유류, 쇼트닝, 마아가린류, 고추씨기름 등이 있다. 이 중 올리브과육을 물리적 또는 기계적인 방법에 의해 압착·여과한 올리브유는 압착올리브유, 정제올리브유, 혼합올리브유로 분류되며, 올리브유 제조공정 중 생기는 잔여물(올리브 박)을 용제 처리 및 정제하여 얻은 올리브퍼메이스유도 있다.¹¹ 일반적으로 식용유지는 튀김, 무침의 조리과정이나 샐러드의 소스로 사용되고 있으며, 콩기름>참기름>옥수수기름, 들기름 순으로 소비되고 있다.¹² 최근에는 웰빙의 열풍으로 인해 올리브유의 소비가 점차 증가함과 동시에 인체건강에 대한 생물학적 영향에 관심이 집중되고 있는 추세이다. 이에 따라 올리브유 중 PAHs의 오염실태조사가 시급히 요구되고 있는 실정이다.

식용유지 중 PAHs를 분석하기 위한 여러 방법이 보고되고 있는데, 주로 액-액추출이나 비누화 반응 등에 의해 시료를 전처리한 후 고속액체크로마토그래피/형광검출기 (HPLC/FLD), 가스크로마토그래피/질량분석기 (GC/MS) 등으로 분석하고 있다.¹³⁻¹⁷ 또한 Table 1과 같이 우리나라 및 EU의 경우 benzo(a)pyrene에 대해 기준을 설정하고 있으며 대상물질을 benzo(a)pyrene 1종에 한하고 있지만 이태리 및 스페인에서는 식품 중 기준설정에 따라 7종 혹은 8종으로 선정하고 있다.

이에 본 연구에서는 현재 우리나라에 기준이 설정되어 있고 marker PAH로 사용되는 benzo(a)pyrene (벤조피렌)을 대상물질로 하여 간편하고 보편적으로 사용할 수 있는 식용유 시료의 전처리 방법 및 HPLC/FLD의 분석조건을 최적화하고 올리브유에 대한 잔류실태를 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

Table 1. The maximum levels of PAHs in edible oil

| Food | Targets | Maximum level (µg/kg) |
|--------|---|---|
| Korea | Olive oil (including olive pomace oil) | B(a)P 2.0 |
| EU | Oils & Fats | B(a)P 2.0 |
| Italy | Olive pomace oil & refined olive pomace oil | 7 Light PAHs ¹ 2.0 sum of above 5.0 |
| Spain | Olive residue oils | 8 Total PAHs ² 2.0 sum of above 5.0 |
| Canada | Pomace olive oil | 8 Total PAHs ³ 3 TEQ |

1. Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene, Benzo(a)anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Dibenzo(g, h, i)pyrene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene

2. Benzo(a)anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene, Dibenzo(a, h)anthracene, Benzo(g, h, i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene

3. Benzo(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene Dibenzo(a,h)anthracene, Benzo(g, h, i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

분석에 사용되는 시약, N,N-dimethylformamide (N, N-DMF)는 Fluka Chemie GmbH Inc. (Germany), 그 외 사용된 시약은 Wako Pure Chemical Industries Inc. (Japan) 및 Merck Inc. (USA) 등에서 HPLC급이나 잔류농약용을 구매하였다. 표준물질인 벤조피렌은 Chem Service Inc. (USA), 내부표준물질인 3-메틸 콜란트렌은 Supelco Inc. (USA)에서 구매하였다. 후로리실 카트리지는 Waters Inc. (Ireland)에서 구매하였다.

2.2. 기기

고속액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography) 및 형광검출기(Fluorescence Detector)는 Nanospace SI-2 (Shiseido, Japan)를 사용하였으며, 컬럼은 Supelguard LC-18(Supelco, USA)을 장착시킨 LC-PAH column (25 cm×4.6 mm, I.D. particle size 5 µm, Supelco, USA)을 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 대상물질

벤조피렌(CAS No.: 50-32-8)의 구조식, 물리·화학적 성상은 Table 2와 같다.

2.3.2. 대상시료

시중에 유통되는 올리브유 6종을 채취하였다. 특히, 올리브 열매를 오직 기계적 혹은 물리적 공정(세척, 으깨기, 압착, 가만히 따르기, 원심분리, 여과)에 의해 제조된 기름으로, 일체의 용제를 사용하지 않고 다른 종류의 기름과 혼합하지 않은 버진 올리브유중 엑스트라 버진 올리브유를 대상으로 하였다.

2.3.3. 실험방법

1) 시료 중 대상물질 추출 및 정제

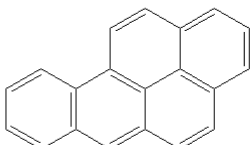
검체 약 10 g을 정밀히 달아 내부표준용액 10 µg/kg을 1 mL를 첨가하고 헥산 100 mL에 녹여 분액깔때기(I)에 옮기고 DMF-물(9:1) 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하여 DMF-물(9:1)층을 분리하여 다른 분액깔때기(II)에 옮긴다. 헥산층에 DMF-물 25 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 DMF-물(9:1)층을 분액깔때기(II)에 합친다. 여기에 1% 황산나트륨 용액 100 mL를 넣어 섞고 헥산 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하여 헥산층을 분액깔때기(III)에 옮긴다. DMF-물(9:1)층에 헥산 35 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 헥산층을 위의 분액깔때기(III)에 합친다. 물 40 mL씩을 넣고 흔들어 섞은 후 정치하여 물층은 버리는 조작을 2회 되풀이한다. 헥산층을 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수여과한 후 40 °C 이하의 수욕 상에서 감압하여 약 2 mL로 농축한다.

후로리실 카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20 mL를 초당 2~3 방울의 속도로 유출시킨 후 사용한다. 이 카트리지에 위의 농축액을 1 mL/분의 속도로 가한다. 이어서 헥산 10 mL와 헥산/디클로로메탄(3:1) 8 mL로 각각 용출시킨 후 이 용출액을 40 °C 이하의 수욕 상에서 질소가스 하에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴에 녹여 전량을 1 mL로 하고 이를 0.5 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

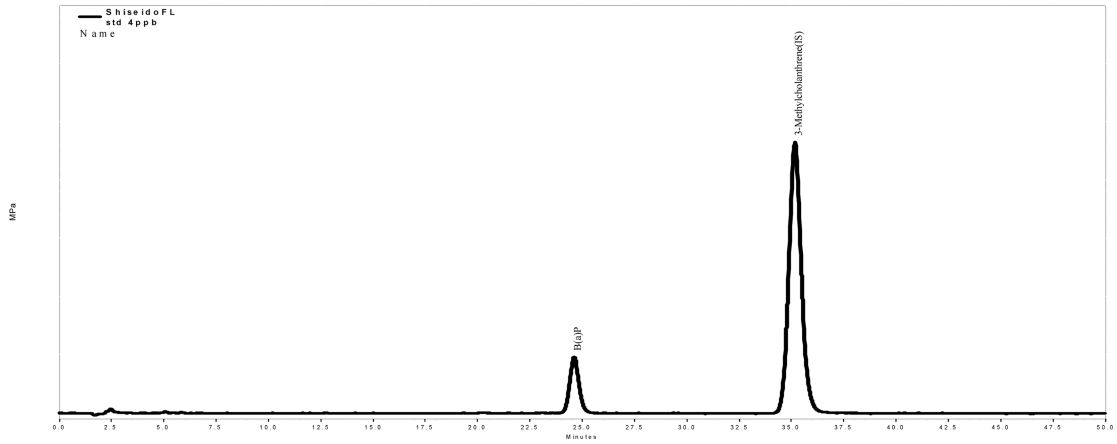
2) 기기 분석

HPLC 컬럼은 LC-PAH column(25 cm×4.6 mm, I.D. particle size 5 µm)를 사용하였으며 형광검출기의 여기파장은 294 nm이고 형광파장 404 nm이었다. 이동상으로는 아세토니트릴과 물의 혼합액(8:2)을 사용하였으며 isocratic 조건으로 분석하였다. 시료는 20 µL를 주입하였으며 유속은 1.0 mL/min이었다. 분석결과 머무름 시간에 의해 정성 확인을 하였으며 내부표준법에 따른 피크 면적법으로 정

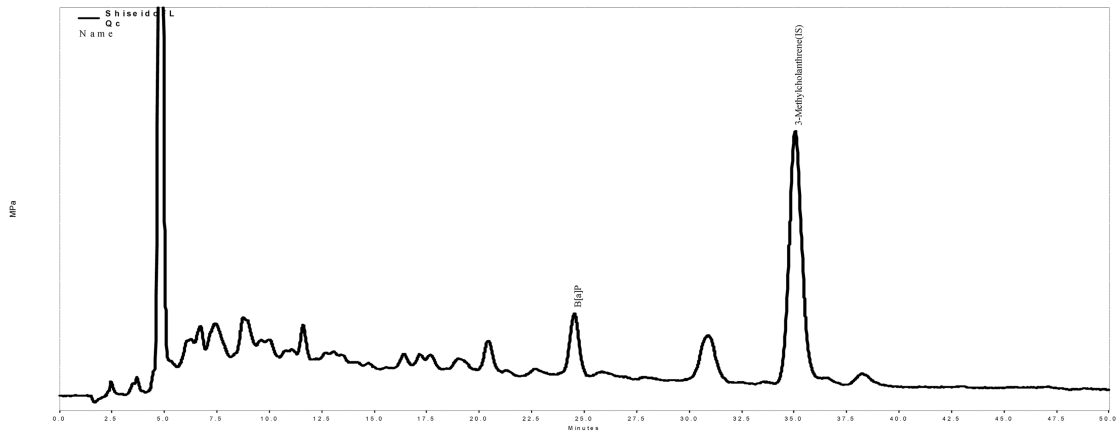
Table 2. Chemical structure and properties of benzo(a)pyrene

| Structure | Molecular formula | Molecular weight | Melting point (°C) | Boiling point (°C) |
|---|---------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
|  | C ₂₀ H ₁₂ | 252.32 | 177~179 | 493~496 |

(a)



(b)



(c)

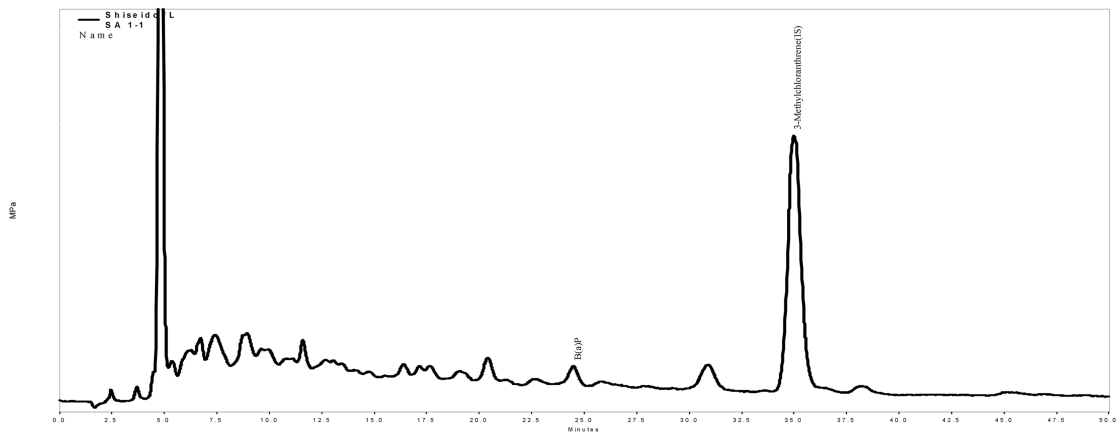


Fig. 1. Typical chromatogram of benzo(a)pyrene for standard (a) spiked sample (b) and sample (c).

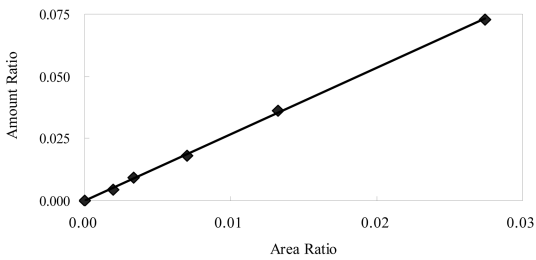


Fig. 2. Calibration curve for benzo(a)pyrene in olive oil.

Table 3. Recovery of benzo(a)pyrene spiked in the olive oil

| Spiked (µg/kg) | Found (µg/kg) | Recovery (%) | C.V. (%) |
|----------------|---------------|--------------|----------|
| 2.0 | 1.9 | 95 | 5.2 |

(n=3)

량을 하였다.

3. 결과 및 고찰

벤조피렌에 대한 표준물질 및 내부표준물질인 3-메틸콜란트렌 혼합 표준용액의 크로마토그램, 공시료에 혼합표준용액을 첨가하여 전처리 후 고속액체크로마토그래피에 주입하여 얻은 크로마토그램 및 벤조피렌이 검출된 시료의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. PAH 분석용으로 특수 제작된 컬럼인 LC-PAH를 사용하여 이동상인 아세트니트릴과 물의 혼합액(8:2)을 isocratic 조건 하에서 분석한 결과 벤조피렌 > 3-메틸콜란트렌의 순으로 용리되었다. 대상물질인 벤조피렌이나 내부표준물질인 3-메틸콜란트렌은 강한 형광성이 있으므로 형광검출기를 사용함으로써 식품 중 parts per billion (ppb, µg/kg) 수준으로 미량 존재하는 벤조피렌을 분석할 수 있었다. 대상시료 분석 시 회수율 및 민감도를 상승시키기 위하여 헥산과 DMF에 의한 액-액 추출 단계에서 지방을 모두 제거하였으며, 시간이 다소 소요되더라도 에멀전을 완전히 분리한 후 다음 과정을 수행하였다. 그리고 비극성 물질 등 방해물질을 제거하기 위한 SPE 정제과정에서는 식품 분석에 가장 많이 이용되는 후로리실 카트리지를 사용하였다.

검량선 작성을 위하여 올리브유 중 벤조피렌 잔류기준의 $\times 0.25$, $\times 0.5$, $\times 1$, $\times 2$, $\times 4$ 에 해당되는 표준물질 5개 농도범위(0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 µg/kg)에서 측정·분석한 결과 검량선의 식은 $y=2.06062x-0.490658$ 이었으며, 상관계수 r^2 은 0.9994로써 정량분석 수행에 충분한 수준이었다.

대상물질을 포함하고 있지 않은 올리브유 공시료에 표준물질 벤조피렌을 첨가하여 시료 전처리법으로 정량분석을 시험한 결과 검출한계는 0.1 µg/kg이고 정량한계는 0.9 µg/kg로 EU에서 제시하고 있는 규격인 검출한계 0.3 µg/kg, 정량한계 0.9 µg/kg를 만족하는 수준이었다.

또한 공시료에 표준물질 2.0 µg/kg을 첨가하여 3회 반복실험을 수행하여 회수율을 측정한 결과 평균 회수율은 95%이고 상대표준편차(coefficient of variation, CV)는 5.2%로 EU 규격인 50~120%를 만족하는 결과를 얻었다.

이와 같이 최적화된 분석방법을 시중에 유통 중인 올리브유 중 벤조피렌을 검사하기 위하여 채취한 엑스트라 버진 올리브유 실제시료 분석에 적용하였다. 분석의 정확성을 높이기 위하여 항상 실제시료에 Quality Control(QC) 시료를 포함한 그룹을 만들어 분석하였다. 분석결과 대상 식품인 올리브유 6 품목 중 4 품목에서는 분석대상물질이 검출되지 않았으며 2 품목에서 각각 1.9 µg/kg 및 1.1 µg/kg이 검출되었으나, 모두 국내 기준 2.0 µg/kg 이하이었다.

연구결과에서 보는 바와 같이 정량분석결과 및 시험대상 시료의 조사 분석 결과에 따르면 올리브유 중 벤조피렌을 분석하는 위의 방법을 향후 참기름, 들기름, 옥수수기름, 콩기름 등 식용유지 분석에 적용함으로써 국내 유통식품의 안전을 확보하기 위한 시험분석에 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결론

올리브유중 벤조피렌을 분석하기 위하여 시료의 지방성분을 헥산으로 제거한 후 N,N-DMF 수용액을 다시 헥산으로 추출하여 후로리실 SPE 카트리지로 정제한 후 고속액체크로마토그래피/형광검출기를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, 공시료에 표준물질을 첨가하여 회수율을 측정한 결과 평균 회수율은 약 95%이고 상대표준편차(CV)는 5.2%이었다.

둘째, 벤조피렌 표준물질 5개 농도범위에서 측정·분석한 결과 검량선의 식은 $y=2.06062x-0.490658$ 이었으며, 상관계수 r^2 은 0.9994로써 정량분석에 충분한 방법을 확립하였고, 검출한계는 0.1 µg/kg이었으며 정량한계는 0.9 µg/kg이었다.

셋째, 올리브유를 포함한 다른 식용유지 분석에도 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam, *Trends in Anal. Chem.*, **25**, 716-725 (2006).
2. N. Kazerouni, R. Sinha, C.-H. Hsu, A. Greenberg, N. Rothman, *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 423-436 (2001).
3. A. M. Pupin, M. C. F. Toledo, *Food Chem.*, **55**, 185-188 (1996).
4. European Commission, SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final (2002)
(http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html).
5. C. Smith, T. Perfetti, M. Rumble, A. Rodgman, D. Doolittle, *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 371-3836 (2000).
6. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, **92** (2006).
7. 허수정, 오남수, 김수연, 이효민, *분석과학*, **19**, 415-421 (2006).
8. 내분비계 장애물질 연구보고서, 3, 451-474 (2001).
9. 내분비계 장애물질 연구보고서, 4, 133-151 (2002).
10. S. Moret, L. Conte, *J. Chromatogr. A*, **882**, 245-253 (2000).
11. 식품공전, 식품의약품안전청, 2005.
12. 국민건강영양조사, 보건복지부, 2006.
13. A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L.A. Berueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, *J. Chromatogr. A*, **988**, 33-40 (2003).
14. A. Meudec, J. Dussauze, E. Deslandes, N. Poupart, *Chemosphere*, **65**, 474-481 (2006).
15. M.A. Lage Yusty, J.L. Cortizo Davina, *Food Cont.*, **16**, 59-64 (2005).
16. G. Diletti, G. Scortichini, R. Scarpone, G. Gatti, L. Torreti, G. Migliorati, *J. Chromatogr. A*, **1062**, 247-254 (2005).
17. S. Tfouni, R. Machado, M. Camargo, S. Vitorino, E. Vicente, M. Toledo, *Food Chem.*, **101**, 334-338 (2007).