

## LC/MS를 이용한 heterocyclic amines의 분석법

명 승 운\*

경기대학교 이과대학 화학과  
(2007. 3. 12. 접수, 2007. 4. 4. 승인)

### An analytical method of heterocyclic amines by LC/MS

Seung-Woon Myung\*

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon, Kyeonggi-do, 443-760, Korea  
(Received March 12, 2007; Accepted April 4, 2007)

**요 약:** 헤테로싸이클릭 아민류(heterocyclic amines, HAs)는 소고기, 돼지고기, 닭고기 그리고 생선과 같은 근육질의 육류를 조리 할 때 생겨나는 돌연변이원성/발암성 화학물질로 잘 알려져 있다. 식품으로부터 HAs의 분석에 있어 가장 큰 어려움은 HAs가 식품 중에 극히 미량(수 ng/g)으로 존재한다는 것과 많은 방해물질이 존재한다는 것이다. 식품으로부터 HAs를 추출하고 정제하기 위해 고체-상 추출(solid-phase extraction, SPE)이 많이 사용되고 있다. HAs 분석을 위해 여러 단계의 SPE 과정을 수행하였다. HAs의 회수율은 표준물질이 녹여져 있는 메탄올 수용액과 조리되지 않은 돼지고기에 표준용액을 스파이크하여 서로를 비교하여 얻었다. 회수율은 25.0 ng/g에서 25.3~93.0%의 값을 얻을 수 있었다. 확립된 감도 좋고 재현성있는 시료전처리방법을 통해서  $\mu$ -LC/ESI-MS에 주입함으로써 조리된 육류로부터 HAs를 분석하는데 응용될 수 있을 것이다. 다른 방법으로는 freezing filtration 방법으로써 보다 좋은 추출 효율과 재현성을 나타내었다.

**Abstract:** The heterocyclic amines (HAs) are a family of mutagenic/carcinogenic chemicals formed from the cooking of muscle meats such as beef, meat, fowl, and fish. A major draw back in the analysis of HAs from foods is their very low level of concentration (ng/g) and a number of matrix interferences in samples. Solid-phase extraction (SPE) is one of the procedures widely used for the extraction and purification of HAs in food samples. In this study, several SPE procedures of HAs determination were performed. Recoveries of the HAs were obtained from comparing a matrix such as a standard methanolic solution and pre-cooked meat extracts. Recovery values were ranging between 25.3 and 93.0 % at a concentration of 25.0 ng/g. HAs were determined with high sensitivity by micro-HPLC ( $\mu$ -HPLC) analysis with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Another developed method, which is freezing filtration method, shows better extraction recoveries and good precisions. The established method will be applicable to monitoring of heterocyclic amines from the cooked meat.

**Key words :** Heterocyclic amines, LC/MS, food

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-249-9647 Fax : +82-(0)31-249-9647

E-mail: swmyung@kgu.ac.kr

## 1. 서 론

인체에서의 발암과정은 식생활 습관과 매우 밀접한 상관성을 가지고 있거나 그 발생의 위험도를 높이는 경우가 많다. 1987년 중 미국인 사망의 원인 70% 이상이 식이와 관련된 7가지 요인에 의한 것으로 밝혀졌는데 이들은 심장병, 암, 심장발작, 알코올 관련사고, 당뇨병, 간 질환과 동맥경화였고 이들 질환 모두는 식품섭취와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>1</sup>

식품의 조리과정 중 생성되는 유해성분으로는 식품의 구성성분과 조리조건에 따라 여러 가지 화합물이 분리 확인되고 있으나 대부분 그들의 독성은 아직 규명되지 않았다. 특히 식품은 여러 가지 성분으로 구성되어 있고 조리과정 중 생성되는 새로운 분해생성물이 공존하게 될 때 식품 전체로서 어떠한 독성 영향이 나타날 것인가를 판단하기는 매우 어려운 일이다. 이들 열분해 생성물 중 발암성을 나타내는 물질 중에는 헤테로사이클릭 아민(heterocyclic amines, HAs)이 있다<sup>2</sup>. HAs는 육류, 닭, 오리, 그리고 생선 등을 열에

서 굽고 기름에 튀길 때 아미노산과 크레아틴 또는 크레아티닌의 열분해에 의해서 생성되는 여러 물질중 하나의 그룹에 속해 있다고 보고되고 있다.<sup>3-14</sup>

HAs의 분석에 있어서 주된 관심사는 복잡한 시료 매트릭스 안에 비교적 낮은 농도(part per billion, ppb)로 존재하고 있는 십 수 종이 되는 HAs를 효과적으로 매트릭스로부터 분리해서 재현성이 있으면서 정확하게 측정할 수 있는 방법을 확립하는 것이다. 지금까지 연구된 논문들에서는 주로 고체상추출방법이나 액체-액체추출법을 이용하여 시료로부터 HAs를 추출한 후 HPLC, CE/MS, LC/MS 등을 사용하여 측정하는 방법을 보고하고 있다. 하지만 이 방법들은 재현성이 부족하거나 지루한 실험과정이 필요하고 선택성이 낮은 것으로 나타났다.<sup>15-19</sup>

따라서 본 연구에서는 기존의 시험방법<sup>19,20</sup>을 참고하여 식품 중에서 15종의 HAs(Fig. 1)를 효과적으로 추출정제하는 방법을 수정 개발하고,  $\mu$ -LC/ESI-MS를 사용하여 이동상의 용매 조성, 다양한 완충용액, pH, 컬럼 등을 이용한 분리방법을 확립하고, ESI의 최적 이온

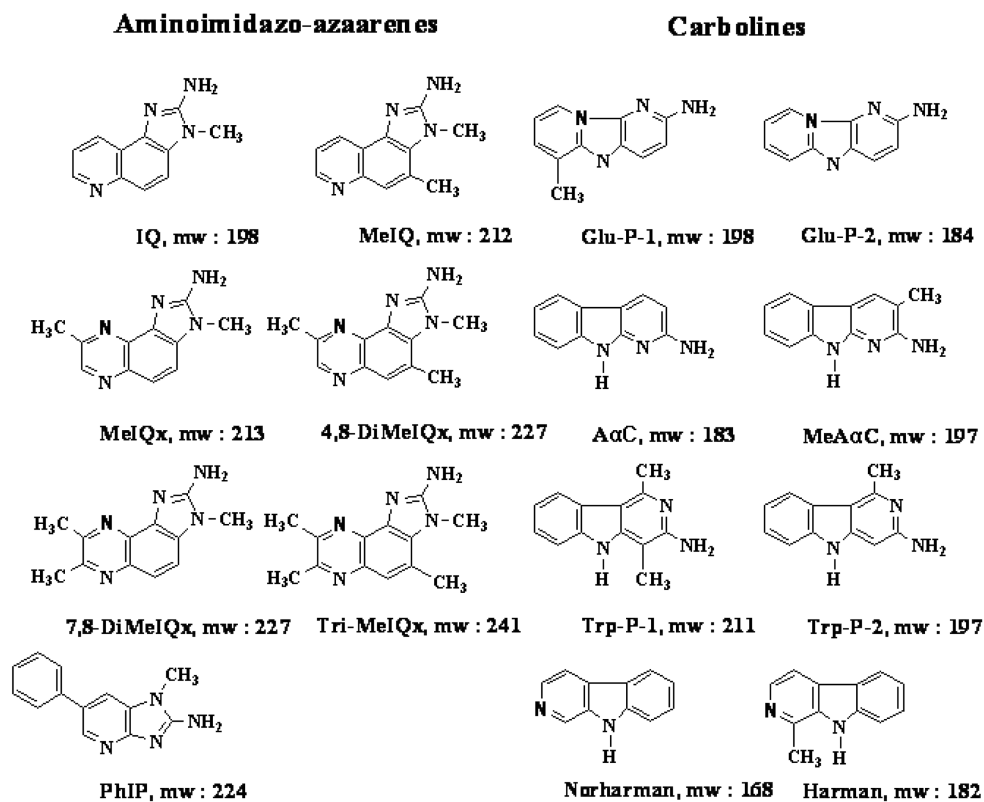


Fig. 1. Structures and abbreviations names of HAs.

화를 이룸으로서 빠르고 정확한 분석방법을 확립하고자 한다. 또한 회수율과 정밀도를 향상시킨 freezing filtration 후 SPE로 추출하는 방법도 제시하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 재료

헤테로사이클릭 아민 표준물질 15종, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Tri-MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, PhIP, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Harman, Norharman은 Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada)사에서 구입하였으며, 표준용액은 표준물질을 HPLC급 메탄올에 녹여 1 mg/g의 농도로 조제하였으며, 분석하기 전 500 ng/g 이하로 희석하여 사용하였다. Diatomaceous earth extraction cartridges (Extrelut-20)을 Merck (Darmstadt, Germany)사로부터, PRS column과 C<sub>18</sub> Bond Elut cartridges는 Varian (Harbor City, USA)사로부터, Oasis HLB cartridge (60 mg, 3 mL)는 Waters Corporation (Milford, MA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 추출 및 정제를 비롯한 실험에 사용된 모든 유기용매는 Burdick & Jackson (Muskegon, MI)사의 HPLC 등급을 사용하였다. 내부 표준물질인 1-naphthylamine은 Aldrich (WI, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 장치 및 기구

시료의 동결 건조를 위해 사용한 동결건조기는 Labconco (Kansas, USA)사의 Stoppering tray Dryer를 사용하였다. 시료의 농축을 위해서 Eyela (Tokyo, Japan)사의 질소농축기와 회전증발농축기를 사용하였고, 고체상 추출은 Supelco (PA, USA)사의 SPE vacuum manifold를 사용하였다. 시료 혼합을 위해서 Termolyne (Iowa, USA)사의 vortex mixer와 Eyela (Tokyo, Japan)사의 Multi Shaker를 사용하였고, 시료의 초음파 혼합을 위해 NEURON FIT (Tokyo, Japan)사의 TAC ultrasonic

4020을 사용하였다. 온도 측정을 위해서는 -32°C~535°C까지 측정이 가능한 Raynger ST<sup>TM</sup> (Seoul, Korea)을 사용하였다.

### 2.3. 분석기기

식품 중 HAs의 분석을 위해 사용된 HPLC 장비는 binary pump system이 장착된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, MS는 Agilent 1100 series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다.

식품 중 HAs의 분석을 위한 크로마토그래픽 분리는 Zorbax 300SB-C<sub>18</sub> (Agilent Technologies; 0.30 mm  $\times$  150 mm I.D., 5  $\mu$ m particle size)의 모세관 컬럼을 사용하였으며 각 표준물질에 대한 분리는 15  $\mu$ L/min의 유속으로 이성분 시스템을 사용하였다. 이동상 A는 7.5 mM ammonium formate buffer (pH 2.8)를 사용하였고, 이동상 B는 acetonitrile이었으며 기울기 용매 조건을 사용하였는데 초기에 A가 100%이었고 20분에 걸쳐서 60%까지 감소시켰으며 컬럼의 재-평형을 위해 A를 100%로 15분간 흘려주었다(Table 1).

사용된 질량분석기는 이온포집(ion trap) 형태의 Agilent 1100 series LC/MSD Trap이었으며, 이온화하는 양이온 방법의 전자 분무 이온화(electrospray ionization, ESI)이었다. Capillary voltage와 nebulizer는 각각 3.5 kV와 15 psi 이었고 drying gas flow와 온도는 각각 5 L/min과 325°C 이었다. Skimmer와 capillary exit offset은 각각 40 V와 137.7 V 이었다. 그리고 Max. accu time와 averages는 각각 200 ms와 3이었으며, Full scan mode에서 데이터 수집을 위한 질량 분석 범위는 m/z 50~300에서 수행되었다(Table 2).

### 2.4. 시료의 정제과정

#### 2.4.1. 방법 1

구운 육류를 가위로 얇게 잘게 잘라 -70°C deep-freezer에 3시간 동안 넣어 얼린 다음 이를 동결건조기

Table 1. Operating conditions for HPLC

Parameters	Conditions
Column	Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies) 0.30 mm $\times$ 150 mm I.D., 5 $\mu$ m particle size
Flow rate	15 $\mu$ L/min
Column Temp.	25°C
Mobile phase	A : 7.5 mM Ammonium formate buffer(pH 2.8), B : ACN (100% A, 0 min; 60% A in B, 0-20 min; 100% A for re-equilibrium, 20~30 min)
Injection Vol.	1 $\mu$ L

Table 2. Operating conditions for mass spectrometer

Parameters	Conditions
Source	ESI in the positive mode
Capillary voltage	-3.5 kV
Nebulizer	15 psi
Drying gas flow	5 L/min
Drying gas temperature	325°C
Skimmer	40 V
Capillary exit offset	137.7 V
ICC	on
Max. accu time	200 ms
Averages	3
Mass range in full scan mode	m/z 50~300

에 넣고 3일 동안 건조시킨다. 동결 건조된 육류를 막자사발을 이용하여 잘게 부순 다음 이중 3g을 취하여 1 M의 NaOH 12 mL에 넣는다. 그리고 1시간 동안 sonication 시킨 뒤 2시간 동안 shaker로 흔들어 줌으로써 지방질을 녹임과 동시에 완전히 균일화 시킨다.

이 알칼리 용액을 Extrelut-20 컬럼에 넣고 10분 동안 흡착을 시킨 뒤 미리 5 mL의 HCl 0.1 M과 10 mL H<sub>2</sub>O, 5 mL MeOH로 활성화 시킨 Bond-Elut PRS 컬럼에 연결한다. 80 mL 디클로로메탄으로 용출시켜 분석물이 Extrelut-20 컬럼에서 Bond-Elut PRS 컬럼으로 이동하게 한다. 그런 다음 Bond-Elut PRS 컬럼을 15 mL MeOH:H<sub>2</sub>O (4:6, v/v)과 2 mL H<sub>2</sub>O로 씻어 준다. 이때 씻음 용액 15 mL MeOH:H<sub>2</sub>O (4:6, v/v)에는 미량의 HAs가 속해 있으므로 회전증발농축기로 최종부피가 1 mL이 되도록 건조시킨 뒤 C<sub>18</sub> 카트리지에 함께 용출시킨다. 미리 5 mL MeOH와 5 mL H<sub>2</sub>O로 활성화 시킨 C<sub>18</sub> 카트리지를 Bond-Elut PRS 컬럼에 연결하여 20 mL의 0.5 M AcONH<sub>4</sub> (pH 8) 20 mL로 용출시킨다. 5 mL H<sub>2</sub>O로 C<sub>18</sub> 카트리지를 씻어주고 다시 2.0 mL의 MeOH:NH<sub>3</sub> (9:1)로 용출시킨 다음 이 용출액을 질소 농축기로 온화한 조건에서 날린 뒤 내부 표준물질인 1-naphthylamine이 녹아 있는 1 mL의 MeOH 용액으로 묽혀 LC/MS에 주입한다. 추출정제

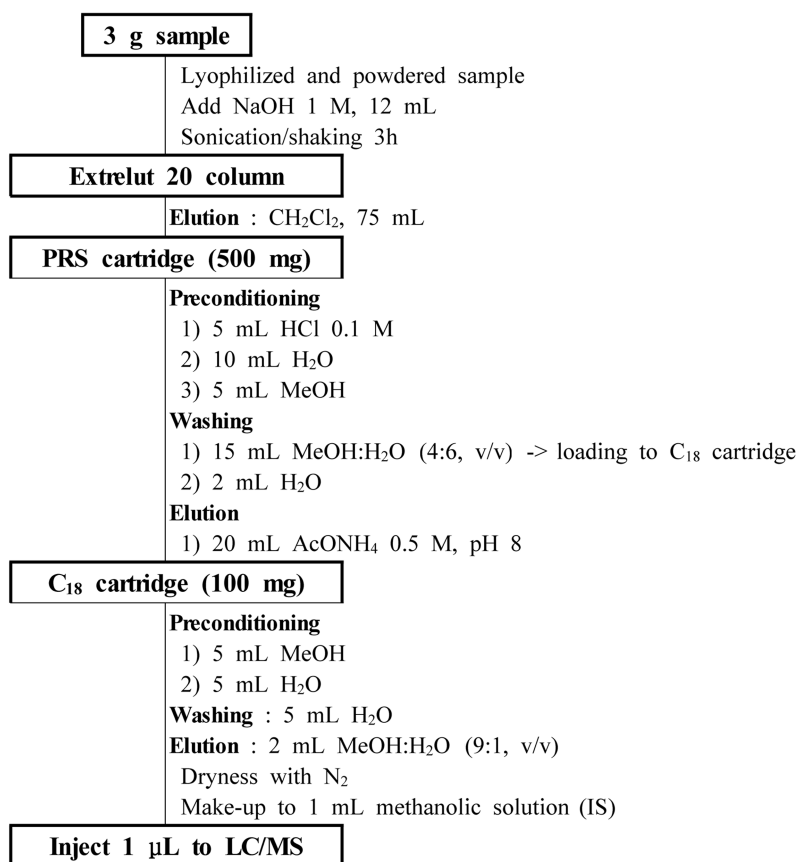


Fig. 2. Sample clean-up and extraction method 1.

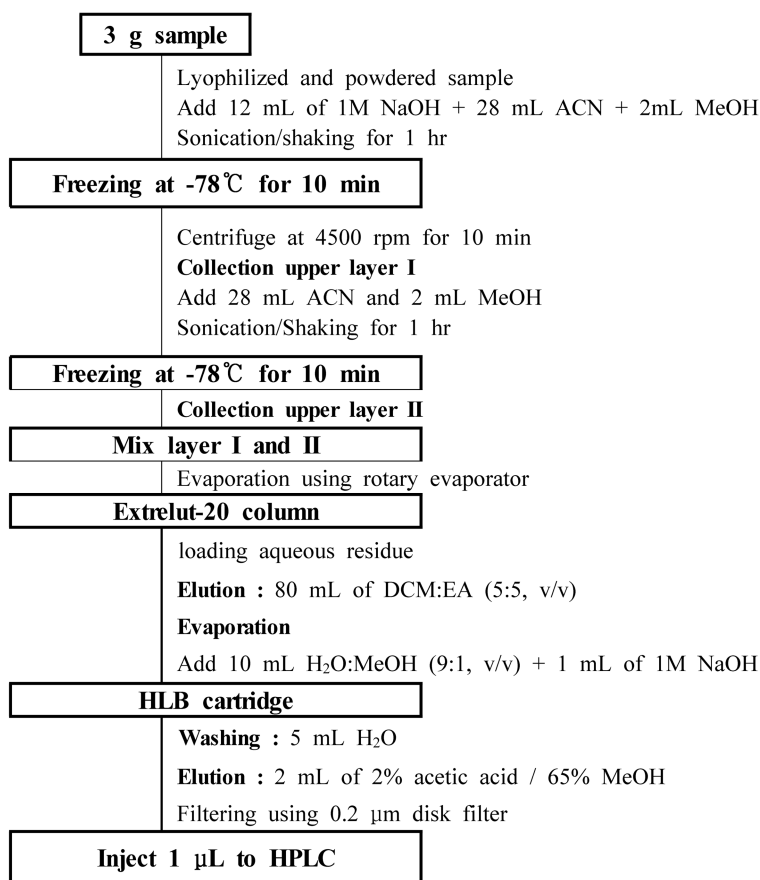


Fig. 3. Sample clean-up and extraction method 2.

과정은 Fig. 2에 나타내었다.

#### 2.4.2. 방법 2

굽지 않은 육류(삼겹살)를 가위로 잘게 잘라  $-70^{\circ}\text{C}$  deep-freezer ( $-78^{\circ}\text{C}$ )에 3시간 동안 넣어 얼린 다음 3일 동안 냉동 건조시킨다. 동결 건조된 고기를 꺼내 막자와 막자사발을 이용하여 잘게 부순 후 3 g을 취하여 1M NaOH 12 mL와 ACN 28 mL 그리고 MeOH 2 mL을 넣고 약 1시간 동안 초음파 파쇄 및 교반 과정을 거친다. 이 용액을 deep-freezer에 10 분을 방치한 후, 원심분리기에서 4500 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상층액은 따로 모아둔다. 다시 ACN 28 mL와 MeOH 2 mL를 넣고 약 1시간 동안 초음파 파쇄 및 교반 과정을 거친 후 deep-freezer에 10 분을 방치한 후 꺼내서 4500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 미리 준비한 상층액과 섞어 이 용액을 둥근바닥 플라스크에 옮긴 후 회전 증발기에서 아세트니트

릴과 메탄올이 완전히 휘발될 때까지 증발시킨다. 이 잔사를 Extrelut-20 컬럼에 넣고 10분 동안 흡착 시킨 뒤 용리액(DCM : ethylene acetate, 5:5 (v/v)) 80 mL로 용출시킨다. 용출액을 다시 회전 증발기에서 증발시킨 후 잔사에 10 mL water : MeOH (9:1, v/v)와 1M NaOH 1 mL를 넣고 미리 MeOH 5 mL와 water 5 mL로 컨디셔닝한 HLB 카트리지에 적재한다. 물 5 mL로 카트리지를 씻어 준 다음 2 mL의 2% acetic acid와 65% 메탄올 수용액을 가지고 용출시킨 다음 0.2 µm 디스크 필터로 걸러주고 분석 장비에 주입하였다 (Fig. 3).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. LC-ESI/MS 분석

15종의 구조가 유사하고 분자량이 작은 화합물들을 크로마토그래피에서 완전히 분리하는 것은 쉽지 않다.

Table 3. Retention times and characteristic ions for HAs studied

HAs	r. t. (min)	m.w.	Characteristic ions (m/z)
IQ	9.3	198	199 [M+H] <sup>+</sup> , 184 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 157 [M+H-CH <sub>3</sub> -HCN] <sup>+</sup>
Glu-P-2	9.3	184	185 [M+H] <sup>+</sup> , 158 [M+H-HCN] <sup>+</sup>
MelQ	9.8	212	213 [M+H] <sup>+</sup> , 198 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 197 [M+H-CH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , 172 [M+H-CH <sub>3</sub> -CN] <sup>+</sup>
Glu-P-1	10.9	198	199 [M+H] <sup>+</sup> , 184 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 182 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 172 [M+H-HCN] <sup>+</sup>
MelQx	11.7	213	214 [M+H] <sup>+</sup> , 199 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 173 [M+H-CH <sub>3</sub> -CN] <sup>+</sup> , 172 [M+H-CH <sub>3</sub> -HCN] <sup>+</sup>
4,8-DiMelQx	12.8	227	228 [M+H] <sup>+</sup> , 213 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 160 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
Norharman	13.0	168	169 [M+H] <sup>+</sup> , 115 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N] <sup>+</sup>
7,8-DiMelQx	13.1	227	228 [M+H] <sup>+</sup> , 213 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 187 [M+H-CH <sub>3</sub> -CN] <sup>+</sup> , 131 [M+H-C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
Harman	14.0	182	183 [M+H] <sup>+</sup> , 168 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 115 [M+H-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N] <sup>+</sup>
Tri-MelQx	14.1	241	264 [M+Na] <sup>+</sup> , 242 [M+H] <sup>+</sup> , 227 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 201 [M+H-CH <sub>3</sub> -CN] <sup>+</sup>
PhIP	15.3	224	225 [M+H] <sup>+</sup> , 210 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
Trp-P-2	15.4	197	198 [M+H] <sup>+</sup> , 181 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 154 [M+H-NH <sub>3</sub> -HCN] <sup>+</sup>
A $\alpha$ C	15.7	183	184 [M+H] <sup>+</sup> , 167 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 140 [M+H-NH <sub>3</sub> -HCN] <sup>+</sup>
Trp-P-1	16.4	211	212 [M+H] <sup>+</sup> , 195 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 168 [M+H-NH <sub>3</sub> -HCN] <sup>+</sup>
MeA $\alpha$ C	17.7	197	198 [M+H] <sup>+</sup> , 183 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 181 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 154 [M+H-NH <sub>3</sub> -HCN] <sup>+</sup>

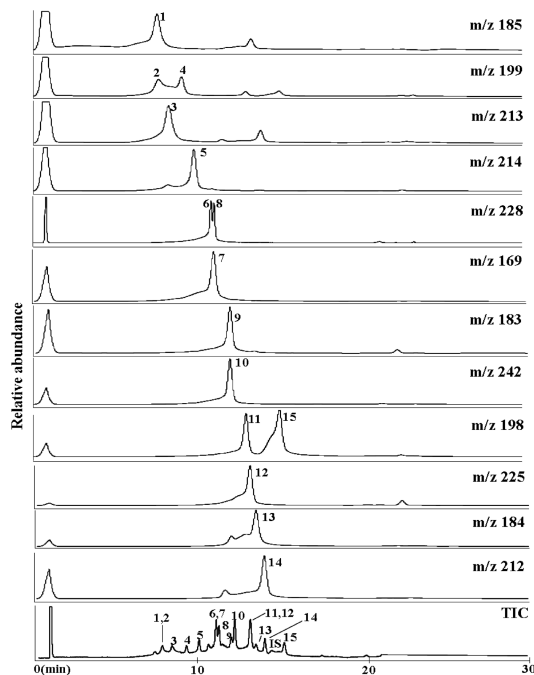


Fig. 4. TIC and EIC of  $\mu$ -LC/ESI-MS for HAs. Peak identification : 1. Glu-P-2, 2. IQ; 3. MelQ 4. Glu-P-1; 5. MelQx 6. 7,8-DiMelQx; 7. Norharman 8. 4,8-DiMelQx; 9. Harman; 10. Tri-MelQx 11. Trp-P-2; 12. PhIP 13. A $\alpha$ C

IQ와 Glu-p-2, norharman과 7,8-DiMelQx, harman과 Tri-MelQx, PhIP와 Trp-p-2는 크로마토그램에서는 거의 동시에 용출되었다. 하지만, 질량분석기에서 추출

이온 크로마토그램(extracted ion chromatogram, EI)에서 각 각의 특성이온들에 대한 크로마토그램을 얻어 선택적인 정량분석이 가능하였다.

HAs는 이동상의 조성에 비해 강한 염기성 물질이기 때문에 분자 구조에 양성자 1개가 붙은 [M+H]<sup>+</sup>와 메틸기가 떨어진 [M+H-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>가 기준이온(base ion)으로 검출되었으며 특성이온들을 Table 3에 나타내었다. 15종의 HAs의 extracted ion chromatogram, EIC와 total ion chromatogram, TIC는 Fig. 4에 나타내었다.

### 3.2. 방법 1<sup>21</sup>

#### 3.2.1. 검량곡선 및 상관계수

HAs 표준물질을 굵지 않은 고기(바탕시료)에 첨가하여 전처리 과정을 거쳐 얻어진 자료를 토대로 검량곡선을 작성하고 검량식을 구하였다. 검량곡선은 1.70 ~ 167 ng/g, 검출감도가 낮은 MelQ와 Trp-p-1은 3.30 ~ 167 ng/g 농도범위에서 정량한계를 포함한 4개 지점의 농도로부터 얻었으며, 대부분이 0.99 이상의 양호한 상관계수를 나타내었다.

#### 3.2.2. 유효성 실험

HAs 표준용액을 바탕시료(열을 가하지 않은 생고기)에 spike시켜 표준물질의 농도 10.0 ng/g으로부터 점차 농도를 낮춰가면서 기기로 분석한 후 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 구하였고 이때 LOQ는 상대 표준편차가 20%이하의 값이며 신호 대 잡음비(signal to noise ratio)가 10인 값으로 정하였다. 또 검출한계

Table 4. The absolute recovery, LOD and LOQ of spiked HAs in food

HAs	LOD*(ng/g)	LOQ**(ng/g)	Conc. (ng/g)	Recovery (%) $\pm$ SD (%RSD)
IQ	0.51	1.7	3.30	83.0 $\pm$ 0.010 (%11.2)
			25.0	83.0 $\pm$ 0.011 (%1.87)
			167	78.4 $\pm$ 0.290 (%6.80)
Glu-P-1	0.51	1.7	3.30	85.6 $\pm$ 0.005 (%3.72)
			25.0	88.6 $\pm$ 0.044 (%4.63)
			167	87.1 $\pm$ 0.180 (%3.41)
MeIQx	0.51	1.7	3.30	110 $\pm$ 0.016 (%7.58)
			25.0	93.0 $\pm$ 0.039 (%2.22)
			167	92.1 $\pm$ 1.93 (%16.0)
Glu-P-2	0.51	1.7	3.30	112 $\pm$ 0.005 (%4.41)
			25.0	62.8 $\pm$ 0.061 (%11.1)
			167	67.5 $\pm$ 0.197 (%6.13)
7,8-DiMeIQx	0.51	1.7	3.30	103 $\pm$ 0.025 (%5.76)
			25.0	80.5 $\pm$ 0.105 (%3.03)
			167	78.1 $\pm$ 1.085 (%5.92)
4,8-DiMeIQx	0.51	1.7	3.30	111 $\pm$ 0.025 (5.76)
			25.0	25.3 $\pm$ 0.105 (3.03)
			167	20.2 $\pm$ 1.085 (5.92)
MeIQ	0.99	3.3	3.30	25.1 $\pm$ 0.022 (5.43)
			25.0	88.8 $\pm$ 0.342 (11.0)
			167	89.0 $\pm$ 0.650 (3.64)
Tri-MeIQx	0.51	1.7	3.30	98.5 $\pm$ 0.005 (6.03)
			25.0	87.0 $\pm$ 0.054 (9.45)
			167	91.1 $\pm$ 0.469 (8.51)
Trp-P-2	0.51	1.7	3.30	59.1 $\pm$ 0.007 (2.40)
			25.0	49.0 $\pm$ 0.168 (6.20)
			167	50.6 $\pm$ 1.090 (7.09)
MeAaC	0.51	1.7	3.30	59.8 $\pm$ 0.005 (4.42)
			25.0	31.8 $\pm$ 0.017 (2.118)
			167	26.9 $\pm$ 0.721 (13.5)
Trp-P-1	0.99	3.3	3.30	108 $\pm$ 0.011 (9.37)
			25.0	54.7 $\pm$ 0.061 (7.09)
			167	52.4 $\pm$ 0.200 (3.98)
PhIP	0.51	1.7	3.30	71.5 $\pm$ 0.020 (8.43)
			25.0	77.3 $\pm$ 0.020 (1.45)
			167	79.0 $\pm$ 0.887 (12.0)
Harman	0.51	1.7	3.30	66.5 $\pm$ 0.017 (11.2)
			25.0	54.1 $\pm$ 0.026 (2.99)
			167	45.1 $\pm$ 0.071 (1.34)
Norharman	0.51	1.7	3.30	78.6 $\pm$ 0.029 (30.3)
			25.0	71.1 $\pm$ 0.066 (10.4)
			167	69.3 $\pm$ 0.438 (10.6)
AaC	0.51	1.7	3.30	61.0 $\pm$ 0.030 (30.5)
			25.0	45.8 $\pm$ 0.060 (8.41)
			167	51.1 $\pm$ 0.340 (8.52)

\*LOD : Limit of Detection (at S/N &gt; 3), \*\*LOQ : Limit of Quantification (at 20% &lt; RSD)

<sup>a</sup> : at 3.3 ng/g

Table 5. Precision and accuracy of inter-assay for of HAs spiked 25.0 ng/g concentration

Compounds	Bias* (%)	Precision (%)	Compounds	Bias (%)	Precision (%)
Glu-P-1	-13.2	7.12	MelQx	3.22	6.51
4,8-DiMelQx	-5.7	3.08	MelQ	18.3	10.4
Tri-MelQx	-14.6	1.96	Trp-P-2	10.2	0.991
MeA $\alpha$ C	-4.32	2.05	Trp-P-1	4.82	14.9
PhIP	-13.4	3.68	Harman	-0.219	1.35
Norharman	-18.2	15.3	A $\alpha$ C	-17	8
Glu-P-2	-0.558	2.91	7,8-DiMelQx	-13.9	1.46
IQ	4.73	3.49			

\*Bias = (Xc-Xm)\*100/Xc or (Xa-Xm)\*100/Xa

Xc : values from calibration curve,

Xm : measured values,

Xa : added values

(limit of detection, LOD)는 신호 대 잡음비가 3인 값으로 정하였다. 대부분의 HAs에 대해 LOD는 0.51 ng/g 이었으며, MelQ와 Trp-P-1는 0.99 ng/g이었다. 정량을 위한 LOQ는 1.7 ng/g 이었으며 MelQ와 Trp-P-1에 대해서는 3.3 ng/g을 나타내었다. 이는 다른 문헌에 나타난 LOD 및 LOQ값과 유사한 결과이며 식품 중에서 HAs를 분석하기에 효과적인 시료 전처리 및 기기분석법으로 생각되었다.

회수율은 표준물질을 바탕시료에 첨가하여 전처리를 거친 값과 표준물질 값의 절대치로써 검량선의 직선 범위 가운데 상(3.30 ng/g), 중(25.0 ng/g), 하(167 ng/g)의 세 농도에서 측정하였다. Table 4에 HAs의 LOD, LOQ, 회수율 및 정밀도를 나타내었다. 세 가지 농도에서 측정한 회수율은 대체적으로 70~100%의 값을 나타내었으며 MeA $\alpha$ C, Harman, Harman, A $\alpha$ C가 약간 낮은 회수율(45~66%)을 나타내었고, 정밀도를 나타내는 상대표준편차(RSD)는 1.34~16.0%의 양호한 결과를 나타내었다(Table 5).

### 3.3. 방법 2

Freezing filtration 방법을 사용하여 지질을 우선적으로 제거한 후 다시 Extrelut-20에서 지질을 제거한 후 PRS와 C<sub>18</sub> cartridge 대신에 HLB cartridge를 사용함으로써 방법 1 보다 시료 전처리 과정이 단축되면서, DMIP를 제외하고는 대체적으로 회수율이 86.5~96.6%를 나타내었고, RSD가 0.8~3.8%를 나타냄으로써 방법 1에 비해서 회수율과 재현성에서 향상된 결과를 보여주었다(Table 6). 1  $\mu$ g/g 농도에서의 결과로써 방법 1과 동일한 농도에서 비교하지 않아서 완전한 결과는 아니지만 MeA $\alpha$ C, A $\alpha$ C, Trp-P-2, 4,8-

Table 6. Recoveries and precisions in freezing filtration method

HAs	Recovery (%) $\pm$ RSD (%)
DMIP	52.7 $\pm$ 5.6 (10.6)*
IQ	93.8 $\pm$ 1.2 (1.3)
MelQx	90.9 $\pm$ 1.0 (1.1)
Glu-P-2	96.4 $\pm$ 1.4 (1.4)
7,8-DiMelQx	86.5 $\pm$ 0.7 (0.8)
MelQ	96.6 $\pm$ 1.5 (1.5)
4,8-DiMelQx	93.6 $\pm$ 1.4 (1.5)
Glu-P-1	93.6 $\pm$ 1.4 (1.5)
Tri-MelQx	93.0 $\pm$ 1.5 (1.6)
Trp-P-2	92.5 $\pm$ 1.4 (1.5)
Trp-P-1	91.2 $\pm$ 1.1 (1.2)
Harman	93.1 $\pm$ 1.6 (1.7)
PhIP	93.1 $\pm$ 1.6 (1.7)
Norharman	93.8 $\pm$ 2.0 (2.1)
A $\alpha$ C	91.4 $\pm$ 3.4 (3.8)
MeA $\alpha$ C	86.6 $\pm$ 1.2 (1.4)

DiMelQx 등은 월등한 회수율 증가를 나타내었다. 현재까지, 이 방법에 대한 유효성 검증에 대한 충분한 데이터는 확보되어 있지 않으나 대체적으로 방법 1에 비해서 좋은 결과를 기대하고 있다.

## 4. 결 론

본 논문에서는 SPE를 사용하여 정제추출하는 과정을 거쳐서  $\mu$ -LC/ESI-MS를 사용하여 식품(육류) 중에서 헤테로싸이클릴아민을 분석하는 방법을 제시하였다.

방법 1에서는 복잡한 바탕시료에서 1.7 ng/g의 낮은 농도까지 15종의 HAs를 동시에 검출할 수 있는 분석

조건을 확립하였고 1.70~167 ng/g의 농도 범위에서 0.99 이상의 비교적 양호한 직선성을 보였다. 검출한계는 MeIQ와 Trp-P-1에 대해 0.99 ng/g이었고 나머지 13종의 HAs는 0.51 ng/g 이었다. 정량한계는 MeIQ와 Trp-P-1의 경우 3.3 ng/g이었고, 나머지 13종의 HAs의 경우 1.7 ng/g 이었다. 회수율은 3.30, 25.0, 167 ng/g의 세 농도에서 20.2~112 %을 보였다. 25.0 ng/g 농도에서 각 물질에 대한 정확도(bias)는 -18.2 ~ 18.3 %를 나타내었고 정밀도(RSD)는 0.991 ~ 15.3 %를 나타냄으로써 식품 중 HAs를 분석하기에 적합한 범위를 나타내었다.

또한 다른 분석방법으로 제시된 freezing filtration 방법(방법 2)은 몇 가지 HAs에 대해서는 보다 향상된 추출효율과 재현성을 나타내 주었다. 확립된 분석방법은 식품(육류)중의 헤테로싸이클릭 아민을 효과적으로 분석하는데 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 2005년도 경기대학교 학술연구비(신진연구과제) 지원에 의하여 수행되었음.

### 참고문헌

1. K. I. Skog, M. A. E. Johansson, M. I. Jägerstad, R. H. Adamson, J. A. Gustaffsson, I. Noboyuki, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi and Y. Yamazoe, *Heterocyclic Amines in Cooked Foods, Possible Human Carcinogens*, Princeton Scientific Publishing Co. Inc., Princeton, New York, U.S.A., 1995.
2. K. I. Skog, *Food Chem. Toxicol.* **31**, 655-675 (1993).
3. K. I. Skog, M. A. E. Johansson and M. I. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* **36**, 879-896 (1998).
4. S. R. Barnat, M. Rabache, E. Rialland and J. Fradin, *Environ. Health Perspect.* **104**, 280-288 (1996).
5. K. Wakabayashi, M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura, *Cancer Res.* **52**, 2092-2098 (1992).
6. P. A. Guy, E. Gremaud, J. Richoz and R. J. Turesky, *J. Chromatogr. A*, **883**, 89-102 (2000).
7. S. Casal, E. Mendes, J.O. Fernandes, M. B. P. P. Oliveira and M. A. Ferreira, *J. Chromatogr. A*, **1040**, 105-114 (2004).
8. C. M. Lan, T. H. Kao and B. H. Chen, *J. Chromatogr. B*, **802**, 27-37 (2004).
9. C. Messner and M. Murkovic, *J. Chromatogr. B*, **802**, 19-26 (2004).
10. L. Warzecha, B. Janoszka, U. Błaszczuk, M. Stróżyk, D. Bodzek and C. Dobosz, *J. Chromatogr. B*, **802**, 95-106 (2004).
11. E. Barcel-Barrachina, F. J. Santos, L. Puignou and M. T. Galceran, *Anal. Chim. Acta*, **545**, 209-217 (2005).
12. F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou and M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, **869**, 307-317 (2000).
13. F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou and M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, **880**, 101-112 (2000).
14. H. P. Thibaud, M. G. Knize, P. A. Kuzmicky, D. P. Hsieh and J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.*, **33**, 821-828 (1995).
15. S. Sentellas, E. Moyano, L. Puignou and M. T. Galceran, *Electrophoresis*, **24**, 3075-3082 (2003).
16. P. Pais and M. G. Knize, *J. Chromatogr. B*, **747**, 139-169 (2000).
17. E. Barceló-Barrachina, E. Moyano and M. T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, **1054**, 409-418 (2004).
18. A. Martín-Calero, J. H. Ayala, V. González and A. M. Afonso, *Anal. Chim. Acta*, **582**, 259-266 (2007).
19. G. A. Gross and A. Grter, *J. Chromatogr. A*, **592**, 271-28 (1992).
20. J. Hong, *Anal. Chim. Acta*, **576**, 31-36 (2006).
21. 명승운외, 식품의약품안전청 보고서, “식품 및 인체 시료를 대상으로한 Heterocyclic amines 모니터링 연구”, 2006.