

연구과제 연차실적·계획서

과 제 명	반려동물 사료 위해정보에 따른 유해물질 분석법 확립 및 검증					
총연구기간	2018년 1월 ~ 2019년 12월		당해연도 연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소/ 성분검정과 (공동)	연구 책임자	구분	직위(급)	성명	
			정	과장	안종성	
			부	주무관	김혜진	
		참여 연구원	직위(급)		성명	
			팀장		이승화	
			주무관		박혜진	
			주무관		반애련	
			주무관		홍미리	
참여부서						
사업구분	단년도 () 다년도 (√)		총 (2)개년 중 (1)차 연도			
연구결과 요약	<p>○ 본 연구는 반려동물 사료의 위해정보에 따른 유해물질로 파라벤 및 그 대사산물 8종을 선정하여 분석법을 확립하였다.</p> <p>○ 8종의 화합물에 대하여 표준물질의 머무름 시간과 질량분석기의 특성이온을 통해 구분하였고 8종의 파라벤 동시분석에 대한 선택성, 직선성, 정확성, 정밀성을 확인하였다. 그 결과로 LOD와 LOQ의 범위가 각각 0.05~15 ng/mL, 0.15~50 ng/mL으로 설정되었다.</p> <p>○ 본 연구결과로 개발된 분석법의 교차검증을 통해 사료의 파라벤 분석법을 사료표준분석법에 적용하여 유통사료의 유해물질에 대한 효율적인 관리가 가능할 것으로 판단된다.</p>					

반려동물 사료 위해정보에 따른 유해물질 분석법 확립 및 검증

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

반려동물 시장의 규모는 해마다 증가하는 추세이며, 농협경제연구소는 2020년에는 전체 반려동물 시장규모가 6조원에 달할 것으로 예상하고 있다. 이중 대부분은 반려동물의 사료로 소비되는 것이지만 현재 우리나라는 세계 2위의 사료 원료 수입국으로 배합사료의 경우 농림부의 주요통계 결과 연간 원료 수입 의존도가 77%에 달하고 있다. 또한 우리원에서 2017년 사료 검사·검정 업무를 수행한 결과, 전체 3,795건 중에 32건의 부적합이 있었으며 이러한 결과는 사료에 대한 적절한 관리 체계 구축이 필수적임을 보여주고 있다. 최근의 연구에서 항균 보존제로 쓰이는 파라벤이 반려동물 사료에서 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 파라벤은 p-hydroxy benzoic acid의 ester이며 개인 미용 및 위생용품, 의약품 및 식품에 사용되는 광범위 향균제이다. 파라벤은 내분비 교란 물질로서 암을 유발하는 등 동물의 건강에 악영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 파라벤의 모니터링 필요성이 대두되고 있지만 현재 식품공전에 등재되어 있는 분석법은 액체크로마토그래프에 의한 방법으로 정량한계가 1.0mg/kg으로 되어 있고 전처리시 증류를 해야하는 번거로움이 있다. 또한 사료는 지방과 단백질 함량이 높아 matrix가 복잡하므로 LC-MS/MS로 동시 분석하는 방법을 검증하고자 하며, 또한 이 분석법을 이용하여 다양한 사료에 적용하여 파라벤 및 그 대사산물 발생의 실태를 조사하고자 한다. 이는 국내 유통 사료의 안전한 관리를 위한 유용한 자료로 활용 될 수 있을 뿐만 아니라 신속하고 정확한 분석으로 분석업무의 효율성 또한 높일 수 있을 것이다.

나. 연구목표

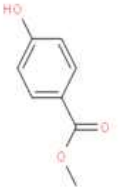
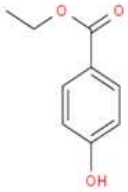
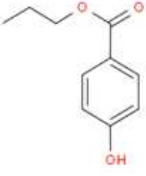
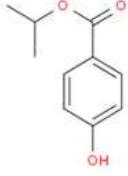

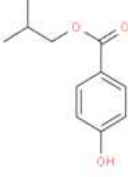
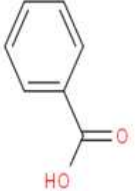
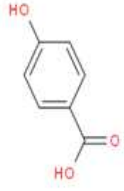
반려동물 시장이 확대되는 만큼 동물의 건강에 부정적 영향을 끼치는 신종 유해물질 정보를 수집하여 유해물질에 대한 분석법을 확립하고 잔류실태조사를

통한 사료의 안전관리를 강화하고 철저한 사후관리 토대 마련

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

1) 분석 대상 성분

<div></div> <div>Methylparaben Molecular Formula C₈H₈O₃ Average mass 152.147 Da Monoisotopic mass 152.047348 Da ChemSpider ID 7176</div>	<div></div> <div>Ethylparaben Molecular Formula C₁₀H₁₀O₃ Average mass 166.174 Da Monoisotopic mass 166.062988 Da ChemSpider ID 13846749</div>
<div></div> <div>Propylparaben Molecular Formula C₁₁H₁₂O₃ Average mass 180.201 Da Monoisotopic mass 180.078644 Da ChemSpider ID 6907</div>	<div></div> <div>Isopropylparaben Molecular Formula C₁₁H₁₂O₃ Average mass 180.201 Da Monoisotopic mass 180.078644 Da ChemSpider ID 16995</div>
<div></div> <div>Butylparaben Molecular Formula C₁₂H₁₄O₃ Average mass 194.227 Da Monoisotopic mass 194.094299 Da ChemSpider ID 6916</div>	<div></div> <div>Isobutylparaben Molecular Formula C₁₂H₁₄O₃ Average mass 194.227 Da Monoisotopic mass 194.094299 Da ChemSpider ID 19066</div>
<div></div> <div>Benzoic acid Molecular Formula C₇H₆O₂ Average mass 122.121 Da Monoisotopic mass 122.036781 Da ChemSpider ID 238</div>	<div></div> <div>4-Hydroxybenzoic acid Molecular Formula C₇H₆O₃ Average mass 138.121 Da Monoisotopic mass 138.031693 Da ChemSpider ID 132</div>

2) 시료 및 시약

시료는 반려동물 유통사료 중 건사료, 묘사료, 습식사료 각각 1점씩 사용하였고 건사료는 분말로 분쇄하여 사용하였다.(HMF-100; HANIL Electric

Co., Seoul, Korea). 분쇄기의 속도는 22,000 rpm으로 설정하고, 크기는 400~1000 μm로 분쇄하였고 모든 시료는 냉장 보관하였다. 본 연구에서 사용된 모든 용매는 HPLC 등급으로 사용하였다. Methanol과 파라벤 및 그 대사산물의 표준품은 Merck (Darmstadt, Germany), Sigma(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 전처리 방법

가) 표준품 전처리

8종의 보존료는 methanol로 용해시켜 stock standard solution을 조제하였다. stock standard solution은 0.01 ~ 1 mg/L의 농도로 조제하였으며, 이들을 matrix matching용 불검출 시료에 적절히 희석하여 혼합용액을 만들어 사용하였다. 모든 용액은 냉장보관하였다.

나) 시료 전처리

균질화된 시료 1g(습식사료는 3g)을 centrifuge tube에 칭량하여 methanol/water(80:20, v/v)로 30분간 추출하고, 원심분리한다(4,000 rpm, 4℃, 15 min). 상등액 1mL를 취하여 d-SPE 정제후 0.2μm syringe filter로 여과 후 기기분석 하였다.

다) 기기분석 조건

본 연구에서 사용된 분석장비는 Agilent 1260 Infinity II를 사용했으며 LC에서 분리된 각 물질들의 정확한 정성 및 정량분석을 위하여 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent 6460 Triple Quad)를 사용하였다. column은 C18 (2 x 150 mm, 3 μm)를 이용하였고, 이동상은 5mM ammonium acetate, 0.1 % acetic acid가 함유된 물과 Methanol을 사용하였다. 샘플의 injection volume은 2 μL로 설정하였고, 유속은 0.2 mL/min으로 설정하여 사용하였다. 자세한 사항은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석 조건

Instrument	LC : Agilent 1260 Infinity II		
	MS/MS : Agilent 6460 Triple Quad		
Column	Imtekt Cadenza CD-C18 (2 x 150 mm, 3 μm)		
Mobile phase	(A) 5mM ammonium acetate, 0.1% acetic acid in water (B) Methanol		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	2.0 μL		
Ionization	Electrospray ionization (ESI)		
Gradient	Time(min)	(%) A	(%) B
	0.0	60	40
	2.0	60	40
	4.0	45	55
	18.0	30	70
	19.0	30	70
	20.0	60	40
	25.0	60	40

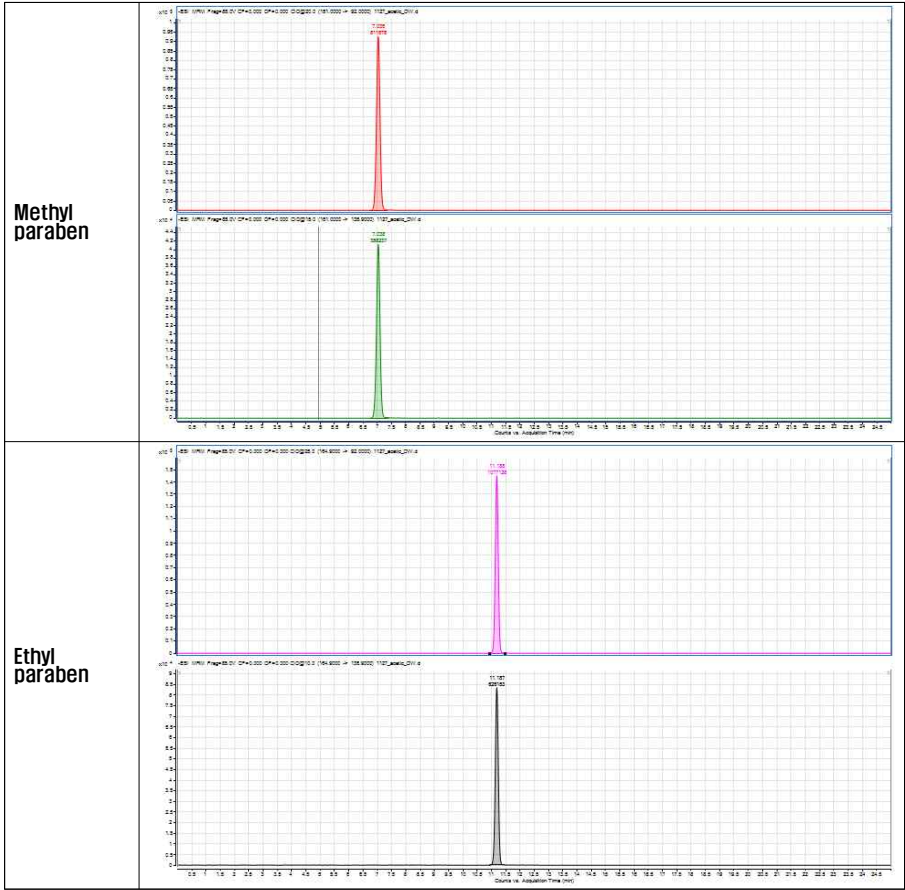
Table 2. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

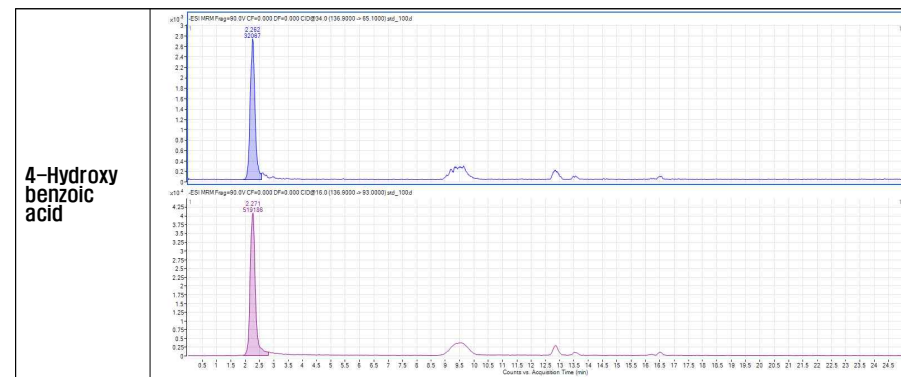
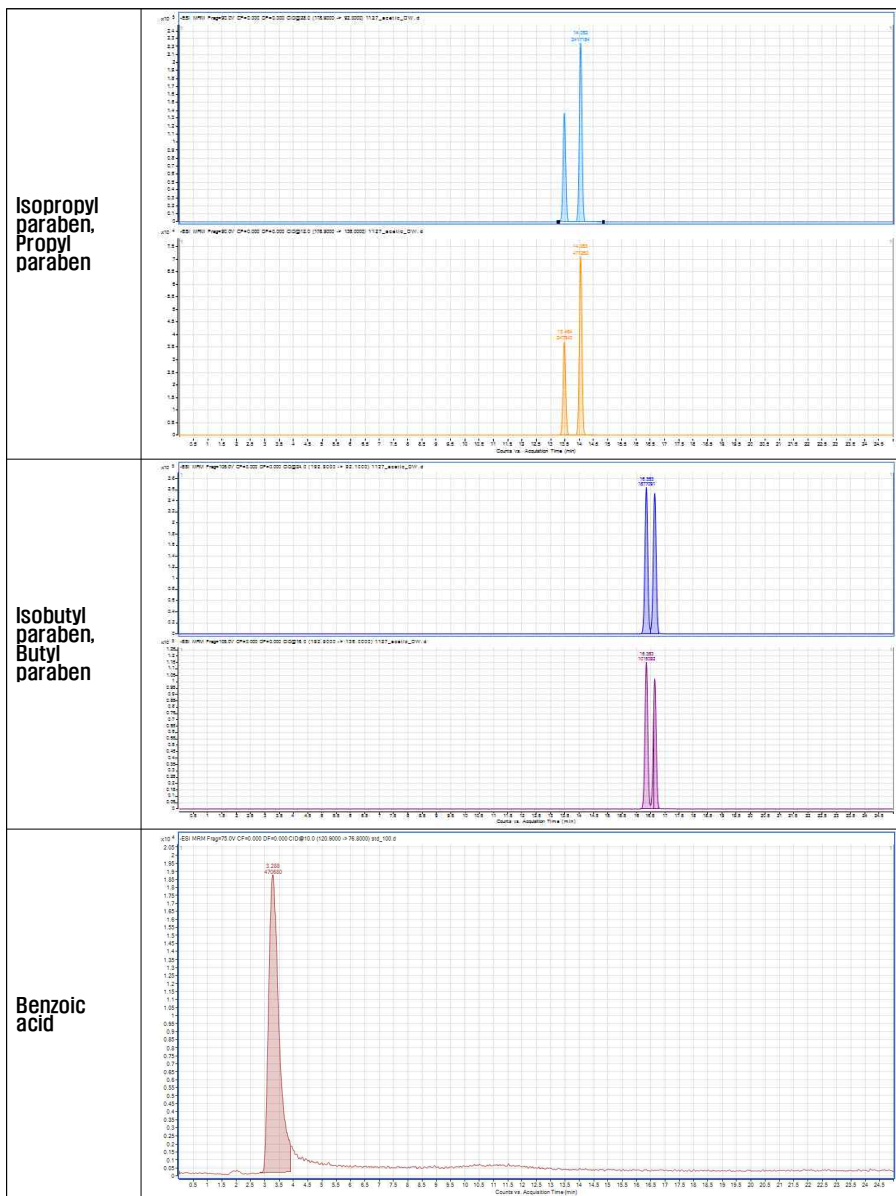
분석성분	RT (min)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, <i>m/z</i>)	생성이온 (Product ion, <i>m/z</i>)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
Benzoic acid	3.288	122.12	120.9	<u>76.8</u>	14
4-hydroxybenzoic acid	2.262	138.12	136.9	<u>65.1</u> 93	34 16
Ethyl paraben	9.510	166.18	164.9	<u>92</u> 136.9	28 10
Methyl paraben	4.148	152.15	151.0	<u>92</u> 135.9	25 15
Butyl paraben	15.937	194.23	193.0	<u>91.8</u> 136.9	26 14
Isobutyl paraben	16.353	194.23	192.9	<u>92.1</u> 136	24 16
Propylparaben	14.053	180.20	178.9	<u>92</u> 136	28 12
Isopropyl paraben	13.484	180.20	179.0	<u>92</u> 136.9	28 12

3. 결과 및 고찰

가. 분석법 유효성 검증

1) 선택성





2) 검량선 확인

- ① Methyl paraben : 1, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$
- ② Ethyl paraben : 10, 50, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/kg}$
- ③ Propyl paraben : 1, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$
- ④ Isopropyl paraben : 1, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$
- ⑤ Butyl paraben : 1, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$
- ⑥ Isobutyl paraben : 1, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$
- ⑦ Benzoic acid : 100, 500, 2000, 5000 $\mu\text{g/kg}$
- ⑧ 4-Hydroxybenzoic acid : 20, 100, 400, 1000, 2000 $\mu\text{g/kg}$

Compound	Linear range (ng/mL)	r2a*	LOD* (ng/mL)	LOQ* (ng/mL)
Benzoic acid	0.10 –500	0.9998	15	50
4-hydroxybenzoic acid	0.10 – 500	0.9991	0.6	2
Ethyl paraben	0.10 – 500	0.9996	0.12	0.5
Methyl paraben	0.10 – 500	0.9996	0.12	0.5
Butyl paraben	0.10 – 500	0.9998	0.05	0.15
Isobutyl paraben	0.10 – 500	0.9998	0.05	0.15
Propylparaben	0.10 – 500	0.9998	0.05	0.15
Isopropyl paraben	0.10 – 500	0.9998	0.05	0.15

4. 기대성과 및 활용방안

가. 기대성과

유통 중인 다양한 사료에 적용하여 효과적인 분석법 개발 및 반려동물 사료 유해물질에 대한 안전관리 기반 구축에 기여할 수 있을 것이다.

나. 활용방안

사료의 품질 평가로 적용하여 검정의 기초자료로 활용 가능하며, 학술지 게재를 통해 전문성 및 연구 성과를 강화할 수 있을 것으로 예상된다.

5. 참고문헌

- 1) Karthikraj R, Borkar S, Lee S, Kannan K. Parabens and Their Metabolites in Pet Food and Urine from New York State, United States. Environmental science & technology. 2018;52(6):3727-37.
- 2) Li XJ, Tang X, Zhou XH, Chen MS, Dai JL, Xiong WM, Zou ZX, Liu HJ, Lv SY, Lin H, Lian M. Determination of eight parabens in water-based food simulants migrated from antibacterial plastic packaging by LC/MS/MS. Appl Mech Mater 2013;333-335:1993-7.
- 3) 박교범, 이석근. LC/MS를 이용한 화장품 중의 parabens 동시 분석 방법 연구. 분석과학. 2010;23(1):54-9.
- 4) Lv J, Wang L, Hu X, Tai Z, Yang Y. Rapid Determination of 10 Parabens in Spices by High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry. Analytical Letters. 2012;45(14):1960-70.