

향기성분이 있는 식품의 보존료 분석

김진호 · 김현위 · 차익수 · 이윤경 · 박기문

오뚜기 중앙연구소

Analysis of Preservatives in Flavor-Containing Foods

Jin-Ho Kim, Hyewon-Kim, Ik-Soo Cha, Yoon-Kyoung Lee and Ki-Moon Park

Ottogi Research Center

Abstract

An attempt was made to analyze preservatives in flavor-containing curry and tomato ketchup without interference due to their of flavor components. Samples were steam-distilled and extracted with ether. Sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid and salicylic acid were analyzed by GC with capillary column. Benzoic acid and dehydroacetic acid in curry were interfered by flavor components, but there was no interference in case of tomato ketchup. Samples were pretreated with Sep-Pak C₁₈ cartridge and analyzed with HPLC to avoid any interference due to flavor components. The recoveries by HPLC were higher than those by GC. Recoveries of sorbic acid, benzoic acid and salicylic acid from curry were 79.9%, 71.2% and 64.4%, respectively. Recoveries of sorbic acid, benzoic acid and salicylic acid from tomato ketchup were 83.4%, 87.8% and 77.7%, respectively.

Key words: preservatives, sorbic acid, salicylic acid, benzoic acid, HPLC

서 론

식품공전에 의하면 보존료 분석법으로 자외선 흡수 스펙트럼 방법과 가스크로마토그래피(GC)가 사용되고 있다⁽¹⁾. 자외선 흡수 스펙트럼 방법은 각 보존료의 특징적인 최대 흡광 파장에 의해 정성 및 정량이 가능하지만 공존하고 있는 방해물질 예를 들면 향기성분 등의 영향을 받는 단점이 있다⁽²⁾. 또한 가스크로마토그래피는 추출시에 용매를 사용하므로 추출과정이 복잡하고⁽³⁾ 향기성분이 함께 용출되는 단점이 있다. 향기성이 많은 식품의 보존료 분석에는 자외선 흡수 스펙트럼 방법과 GC법이 적합하지 않기 때문에 보존료를 간편하고 정확하게 정성·정량할 수 있는 방법이 시도되어 왔다.

北田善三 등⁽⁴⁾은 간장에서 보존료인 안식향산과 파라옥시 안식향산 에스테르류를 분석하기 위하여 시료를 에테르로 추출한 후 1.0 μm 여과지로 여과하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)로 분석하였다. 松永明信 등⁽⁵⁾은 간장, 탄산음료, 유산균 음료의 소르빈산, 안

식향산, 파라옥시 안식향산 에스테르류를 분석하기 위하여 시료를 Sep-Pak C₁₈으로 처리하여 정제하였고 역상분배칼럼을 이용하여 HPLC로 분석하였다. Hisaya 등⁽⁶⁾은 HPLC를 이용하여 식품에서의 소르빈산, 안식향산 및 파라옥시 안식향산 에스테르류를 분석하였으며 전처리 방법 중 수증기 증류법과 Sep-Pak C₁₈ 이용법을 비교한 결과 Sep-Pak C₁₈ 이용법이 수증기 증류법에 비해 우수하다고 보고하였다. Schwedt 등⁽⁷⁾은 식품 보존료 분석에서 GC와 HPLC를 비교 실험한 결과 HPLC가 GC 분석기기보다 소르빈산, 안식향산, 파라옥시 안식향산 에스테르류를 분석할 때 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다. Serrano 등⁽⁸⁾은 HPLC가 식품의 보존료를 정량하는데 가장 적합한 것으로 보고하였으며, 그외에도 HPLC를 이용하여 보존료를 분석한 결과가 보고되어 있다^(9,11).

국내에서 식품에 사용이 허가된 보존료로는 데히드로 초산, 안식향산, 소르빈산, 파라옥시 안식향산 에스테르류, 프로피온산이 있으며 식품에 따라 사용가능한 보존료의 종류와 양이 정해져 있다⁽¹²⁾. 카레는 자체의 향신료 정유성분이 항균성을 가지고 있어서⁽¹³⁾ 보존료를 첨가할 필요가 없기 때문에 보존료의 사용이 허가되어 있지 않으며, 카레 제조회사에서도 보존료

를 첨가하지 않고 있다. 그럼에도 불구하고 충전칼럼을 이용한 가스크로마토그래피(GC)로 분석을 행하면 전처리에서 유래하는 휘발성 향기 성분때문에 소르빈산, 데히드로초산과 동일한 머무름시간(retention time)에 피크가 나타나서 보존료가 있는 것으로 오인될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 카레와 토마토케첩같이 향기성분이 많은 식품의 보존료를 분석하는데 있어서 향기성분에 의한 간섭을 받지 않는 분석방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

(주)오뚜기에서 제조한 카레 및 토마토케첩을 시중에서 구입하여 실험하였다. 사용한 보존료는 안식향산, 소르빈산, 데히드로초산, 살리실산이며, 안식향산, 소르빈산, 살리실산은 순정화학(Junsei Chemical, 일본), 데히드로초산은 화광순약(Wako Pure Chemical, 일본)으로부터 구입하였다.

GC 분석

시료 30 g을 비이커에 취하여 중류수 100 ml를 가한 다음 잘 섞고 10% 수산화나트륨 용액으로 중화하였다. 이를 1 l의 환저플라스틱에 옮겨서 15% 주석산용액 5 ml, 염화나트륨 80 g 및 실리콘 수지 3방울을 가하여 소량의 중류수로 셋은 다음 잘 섞고 수증기증류하였다. 이때 증류속도는 분당 10 ml로 하였으며 증류액이 500 ml가 될 때까지 증류하였다. 증류액을 분액깔대기에 넣고 염화나트륨 10 g, 10% 염산 5 ml를 가하여 에테르 40, 30 및 30 ml로 3회 추출한 후 에테르 추출액을 합하여 소량의 증류수로 셋고 에테르층을 분취하였다. 무수 황산나트륨층을 통과시켜 수분을 제거하고 회전식 감압농축기에서 에테르를 휘발시킨 후 잔류물을 아세톤에 녹여 5 ml가 되게 하였다. 분석에 사용된 GC는 GC-14A, FID (Shimadzu, Japan)이며 칼럼은 HP-FFAP (50 m × 0.2 mm × 0.3 μm, Hewlett Packard Co.)를 사용하였고, 오븐온도는 초기온도 80°C에서 분당 10°C씩 승온시켜 최종온도 230°C로 하였으며 이 온도에서 30분간 유지하였다. 검출기와 주입구의 온도는 230°C로 하였으며 캐리어 가스로는 질소(1 kg/cm²)를 사용하였다.

HPLC 분석

小林加代子 등⁽¹⁾의 방법을 변경하여 아래와 같이 실시하였다. 시료 10 g을 취하고 중류수 30 ml를 가하여

추출한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상징액을 취하고 침전물에 중류수 15 ml를 가하여 재추출한 다음 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상징액을 50 ml 메스플라스틱에 모아 중류수로 50 ml를 채운 다음 이를 여과하고 여액 5 ml를 취하여 1 N 염산 0.5 ml, 5 mM cetyltrimethylammonium chloride 용액 0.5 ml를 각각 첨가하여 잘 혼합하였다. Sep-Pak C₁₈ 카트리지에 메탄올 10 ml, 중류수 10 ml, 5 mM cetyltrimethylammonium chloride 용액 10 ml를 순서대로 세척하고 상기 여액을 분당 2 ml의 속도로 통과시킨 다음 중류수 10 ml로 카트리지를 세정하고 메탄올로 용출시켜 10 ml로 하였다. 분석에 사용된 HPLC 시스템은 M-510 pump, M-481 UV spectrophotometer (Waters, 미국)이며, 칼럼은 SPHERI-5 ODS (Brownlee, 5 μm, 200 mm × 4.6 mm)를 사용하였고 이동상으로는 메탄올과 0.05 M 인산완충액(pH 5.0)을 40:60 (v/v)의 비율로 혼합한 것으로 하였다. 유속은 분당 0.8 ml로 하였고, 시료 주입량은 10 μl이며 UV 검출기의 파장은 240 nm이었다.

검량선 작성

소르빈산, 안식향산, 살리실산을 각각 3~127, 6~128, 6~120 ppm 범위의 농도로 용액을 조제하여 HPLC로 분석한 후 x축을 농도, y축을 피크의 면적으로 하여 검량선을 작성하였다.

결과 및 고찰

GC 분석

우리나라 식품공전의 보존료 시험법 중 '가스크로마토그래피에 의한 정성 및 정량'⁽¹⁾에 의하면 충전칼럼(5% DEGS + 1% H₃PO₄, 3 m × 3 mm)을 이용하여 보존료를 분석하게 되어 있다. 이때 시험 용액의 조제에는 수증기 증류법을 사용하게 되어 있는데 수증기 증류법은 시료에 함유되어 있는 향기성분의 추출방법과 유사하여 보존료와 동시에 향기성분을 추출해 내는 문제점이 있다. 따라서 카레, 토마토케첩과 같이 향기성분이 많은 식품을 분석할 경우 함께 추출된 향기성분이 보존료의 정성 및 정량을 방해하게 되어 크로마토그램상에서 향기성분과 보존료의 피크가 동일한 머무름시간(retention time)을 갖기 때문에 정성 및 정량이 어려웠다. 또한 충전칼럼은 다수의 향기성분과 보존료를 크로마토그램상에서 완전하게 분리해낼수 없는 단점이 있기 때문에 최근 들어 충전칼럼보다 분리도가 우수한 capillary column을 많이 사용하고 있다.

본 연구에서도 향기성분과 보존료(소르빈산, 안식향산, 살리실산, 데히드로초산)를 크로마토그램상에서 분리하기 위해 capillary column을 사용하였다. Fig. 1은 카레, 토마토케첩에 보존료로 소르빈산, 안식향산, 살리실산, 데히드로초산을 가하여 혼합한 후 가스크로마토그래피로 보존료를 분석한 것이다. 카레에서 소르빈산과 살리실산은 향기성분에 영향을 받지 않았으나, 데히드로초산과 안식향산은 인접한 위치에 향기성분이 있어서 정성 및 정량에 영향을 받았다. 반면 토마토케첩에서는 상기의 보존료 4종을 인접한 피크 없이 정성 및 정량을 할 수 있었다.

이상의 결과로 capillary column에 의한 가스크로마토그래피가 향기성분이 많은 식품의 보존료 분석에 적합한 것으로 생각되나, 카레의 경우와 같이 특정성분이 가스크로마토그램상에서 안식향산, 데히드로초산과 인접한 피크로 나타나기 때문에 향기성분이 많이 있는 식품의 보존료 분석에는 적합하지 않은 것으로 밝혀졌다.

HPLC 분석

카레, 토마토케첩의 보존료를 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 2와 같이 향기성분의 영향을 받지 않았다. 보존료 표준품을 시료에 첨가하지 않고 분석한 크로마

토그램은 control (C)과 같이 카레, 토마토케첩에서 소르빈산, 안식향산, 살리실산을 검출할 수 없었다. A로 표시된 것은 카레, 토마토케첩에 소르빈산, 안식향산, 살리실산을 첨가한 (Added, A) 후 고속액체크로마토그래피로 분석한 크로마토그램으로 카레와 토마토케첩이 함유하고 있는 향기성분으로 인한 영향이 없어서 소르빈산, 안식향산, 살리실산을 정성·정량하는데 아무런 어려움이 없었다. 이 결과에 따라 Sep-Pak C₁₈ 카트리지로 전처리 후 HPLC 분석이 향기성분이 많은 식품에서 보존료를 분석할 때 적합함을 알 수 있었다.

Sep-Pak C₁₈ 카트리지에 의한 전처리

Sep-Pak C₁₈ 카트리지에 의한 전처리는 小林加代子 등⁽³⁾의 방법을 변경하여 사용하였다. 이 방법은 유기용매 추출이나 수증기 증류를 하지 않고도 보존료를 정제하기 위한 것으로 액상 시료에 적합한 방법이지만 본 실험에서는 Table 1에 나타난 바와 같이 분체 및 페이스트상에서도 70%이상 회수되어 모든 시료에 사용 가능한 것으로 생각되었다. Sep-Pak C₁₈ 카트리지에 의한 전처리를 하지 않으면 크로마토그램상에 불순물 피크가 크게 나타나지만 보존료 피크에 영향을 주지는 않는 것으로 나타났다. Sep-Pak C₁₈ 카트리지

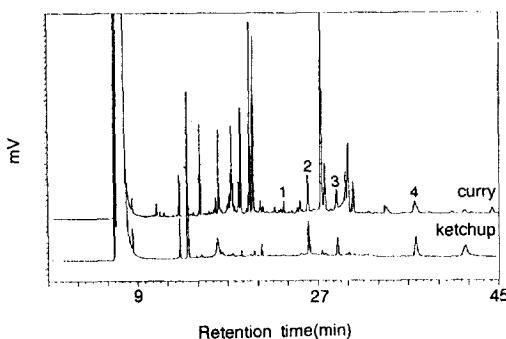


Fig. 1. Gas chromatogram of preservatives in curry and ketchup 1. salicylic acid, 2. sorbic acid, 3. dehydroacetic acid, 4. benzoic acid

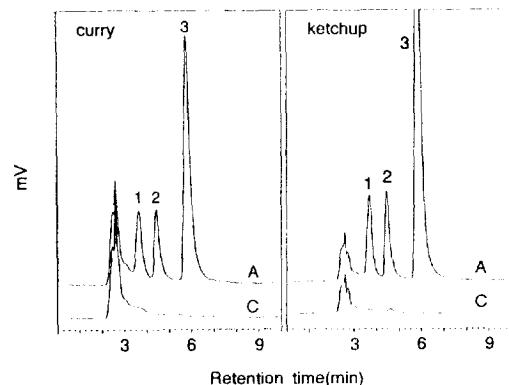


Fig. 2. HPLC chromatogram of preservatives in curry and ketchup 1. salicylic acid, 2. benzoic acid and 3. sorbic acid

Table 1. Difference of recoveries by Sep-Pak C₁₈ cleaning in curry and ketchup

	Curry				Tomato Ketchup			
	Non-cleaning		Sep-Pak C ₁₈ cleaning		Non-cleaning		Sep-Pak C ₁₈ cleaning	
	Recoveries	RSD	Recoveries (%)	RSD	Recoveries (%)	RSD	Recoveries (%)	RSD
Sorbic acid	82.1	1.2	79.9	1.1	80.7	1.0	83.4	1.0
Benzoic acid	71.9	0.8	71.2	0.8	92.9	0.8	87.8	0.6
Salicylic acid	68.4	0.8	64.4	0.9	82.5	1.1	77.7	0.9

Table 2. Recoveries of analysis method in curry and ketchup

	Curry				Tomato ketchup			
	GC		HPLC		GC		HPLC	
Recoveries (%)	RSD	Recoveries (%)	RSD	Recoveries (%)	RSD	Recoveries (%)	RSD	
Sorbic acid	63.2	6.4	79.9	1.1	83.4	6.2	83.4	1.0
Benzoic acid	29.1	1.0	71.2	0.8	59.6	3.2	87.8	0.6
Salicylic acid	-	-	64.4	0.9	-	-	77.7	0.9

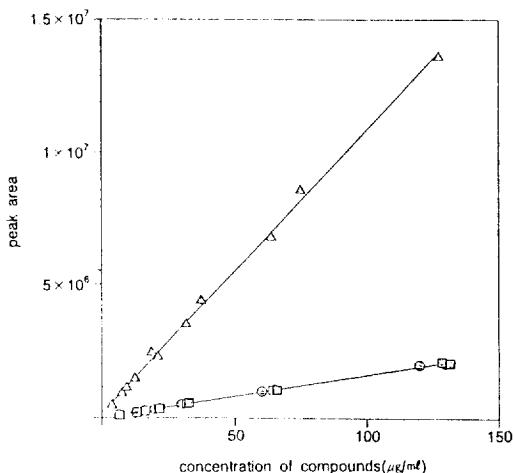


Fig. 3. Calibration curve of sorbic acid, benzoic acid and salicylic acid by HPLC △—△, sorbic acid; □—□, benzoic acid; ○—○, salicylic acid

에 의한 전처리는 칼럼과 검출기의 오염을 방지하고, 또한 Sep-Pak C₁₈ 카트리지에 의한 전처리를 하였을 때와 하지 않았을 때의 회수율의 차이가 거의 없었다 (Table 1)는 점에서 효과적인 전처리 방법이라고 판단된다.

검량선

소르빈산, 안식향산, 살리실산의 검량선은 Fig. 3과 같이 각 검량식의 결정계수(*r*²)는 0.9963, 0.9987, 0.9991로 양호한 직선성을 나타내었으며 UV 검출파장인 240 nm에서 안식향산과 살리실산의 감도(sensitivity)는 비슷하였으나 소르빈산의 감도는 안식향산과 살리실산에 비해 약 7배 우수하였다.

회수율

카레와 토마토케첩에 소르빈산, 안식향산, 살리실산을 첨가한 후 가스크로마토그래피와 액체크로마토그래피로 분석하여 회수된 양을 계산하였다. 수증기 증류에 의해 분석 시료를 조제한 후 가스크로마토그래피의 모세관 칼럼을 이용하여 분석한 결과 카레의 경

우 소르빈산 63.2%, 안식향산 29.1%가 회수되어 수증기 증류에 의한 보존료 분석법이 적절한 방법이 아닌 것으로 나타났으며 살리실산은 정량이 어려울 정도로 미량 검출되었다. 살리실산은 또한 토마토케첩의 경우에도 검출되지 않았다. 토마토케첩의 경우 소르빈산 83.4%, 안식향산 59.6%가 회수되어 가스크로마토그래피에 의한 보존료 분석은 보존료에 따라 회수율의 차이가 크게 있는 것으로 나타났으며 분석간의 표준편차도 크게 나타났다.

HPLC를 이용하여 분석하였을 때 카레의 경우 소르빈산, 안식향산, 살리실산의 회수율이 각각 79.9%, 71.2%, 64.4%로 나타나서 가스크로마토그래피로 분석했을 때 보다 높았다. 小林加代子 등⁽³⁾은 간장, 우스타소스, 청량음료 등에 보존료를 첨가하여 액체크로마토그래피로 분석하여 회수율을 실험한 결과 95.5% 이상의 회수율을 나타내었다. 이러한 회수율의 차이는 小林加代子 등⁽³⁾이 사용한 시료는 액상제품인 반면 본 실험에서 시료로 사용한 카레는 분말시료이었기 때문인 것으로 추측되며 회수율 제고를 위하여 계속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

토마토케첩의 경우 소르빈산 83.4%, 안식향산 87.8%, 살리실산 77.7%의 회수율을 나타냈으며 특히 상대표준편차가 1.0 이하로 우수한 결과를 보였다.

요약

향기성분이 있는 카레, 토마토케첩에 대해 시료에서 유래되는 향기성분의 방해를 받지 않고 보존료를 분석하는 방법을 시도하였다. 시료를 수증기 증류한 다음 에테르로 추출하고 capillary column을 이용하여 GC로 분석하였다. 카레에서는 안식향산과 데히드로초산이 향기성분의 방해를 받았으며 토마토케첩에서는 보존료 검출에 영향을 주는 향기성분이 없었다. 보존료를 분석할 때 향기성분을 크로마토그램에서 제거하기 위해 시료를 Sep-Pak C₁₈로 처리후 HPLC로 분석한 경우 향기성분의 방해를 받지 않는 크로마토그램을 얻을 수 있었으며 이 때 회수율은 GC로 분석한 경

우보다 높았다. 카레의 경우 소르빈산, 안식향산, 살리실산이 각각 79.9%, 71.2%, 64.4%였고, 토마토케첩의 경우 각각 83.4%, 87.8%, 77.7%였다. 따라서 시료에서 유래하는 향기성분의 방해를 받지 않고 회수율이 높으며 시간이 적게 소요되는 HPLC를 이용한 보존료 분석이 향기성분이 있는 카레와 토마토케첩의 보존료 분석에 적합한 것으로 판단된다.

문 헌

1. 한국식품공업협회 : 식품공전. 남형문화, 경기, p.673 (1995)
2. 일본약학회 : 위생시험법 · 주해. 금원출판, 일본, p.441 (1990)
3. Kobayashi, K., Tsuji, S., Tonogai Y. and Ito, Y.: A rapid and simultaneous determination of saccharin, benzoic acid, sorbic acid and six esters of *p*-hydroxybenzoic acid in liquid foods by HPLC. 日本食品工業學會誌, **33**, 514 (1986)
4. Kitada, Y., Tamase, K., Sasaki, M., Nishikawa, Y. and Tanigawa, T.: Determination of saccharin, benzoic acid and *p*-hydroxybenzoate esters in soy sauce by HPLC. 食衛誌, **21**, 480 (1980)
5. Matsunaga, A., Yamamoto, A. and Makino, M.: Simultaneous determination of saccharine, sorbic acid, benzoic acid and five esters of *p*-hydroxybenzoic acid in liquid foods by isocratic HPLC. 衛生化學, **31**, 269 (1985)

6. Terada, H. and Sakabe, Y.: Study on the analysis of food additives by HPLC. V. Simultaneous determination of preservatives and saccharin in foods by ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography*, **346**, 333 (1985)
7. Schwedt, G. and Schwadorf, K.: HPLC analysis of preservatives in foods and comparison of methods (photometry, gas chromatography, TLC). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **82**(7), 209 (1986)
8. Serrano, F.O., Lopez, I.S. and Revilla, G.N.: High performance liquid chromatography determination of chemical preservatives in yogurt. *Journal of Liquid Chromatography*, **14**, 709 (1991)
9. Hatanaka, H. and Kaneda, Y.: Rapid and simultaneous analysis of hippuric and benzoic acids in cultured milk or raw milk by HPLC. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **27**(1), 81 (1986)
10. Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, N. and Yamada, M.: Simultaneous determination of nine food additives using HPLC. *Journal of Chromatography*, **457**, 333 (1988)
11. Burini, G. and Damiani, P.: Determination of sorbic acid in margarine and butter by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, **543**, 69 (1991)
12. 한국식품공업협회 : 식품첨가물-공전. 남형문화, 경기 (1995)
13. 정창기, 박원규, 유익재, 박기문, 최춘언 : 카레 향신료 정유성분의 항균성. 한국식품과학회지, **22**, 716 (1990)

(1996년 5월 10일 접수)