식품중 보존료의 분석방법에 관한 연구

김명희·엄석원·박성배
서울특별시 보건환경연구원

Studies on Analytical Methods of Preservatives in Food

Myung-Hee Kim, Seog-Won Uhm and Sung-Bae Park
Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment, Seoul, 140-212 Korea

ABSTRACT—This study was performed to develop the simple and rapid determination method of preservatives in Yogurt and Soybean sauce.

1. **The analytical method by HPLC system was as follow: The sample was diluted, centrifuged, filtered, if necessary, and analyzed by HPLC system with UV detector.**
2. **The analytical method by GLC system was as follow: The sample was extracted directly with ether, added conc. sulfuric acid to destroy emulsion and analyzed by the GLC system with FID.**
3. **The recovery rates of preservatives by the above methods were higher than 99.0 %.**
4. **Total running time for the above methods was less than 50 minutes. Especially, the running time for dilution method by HPLC system was one-third of that for GLC method.**

Keywords□Preservatives, Yogurt, Soybean sauce, HPLC and GLC

최근 생활수준의 향상과 식생활의 다양화로 기호식품, 인스턴트식품 등 가공식품의 이용이 점차 증가되면서 이들 식품이 유통되는 동안 부패, 변질을 방지하기 위하여 식품첨가물인 보존료의 사용이 요구되어졌다.

이에 따라 본존료의 사용은 점차 증기되고 있어 오용 또는 과용 사용될 경우 식품위생상 국민보건에 위해를 끼칠 우려가 있으므로 이를 예방하고 규제하기 위한 많은 노력이 기울여지고 있으며 우리나라에서는 각 식품별로 보존료의 사용을 규제하고 있다[1].

식품에 사용된 보존료의 함량을 측정하는 공정시험법으로는 시료를 수증기 증류하여 얻은 유액을 유기용매로 추출, 농축하여 UV/Vis. Spectrophotometer나 GLC를 이용하도록 되어 있으며[1] 이외에도 GLC[2-10], HPLC[11-15] 등을 이용한 보존료의 분석방법이 많이 보고되고 있다. 그러나 공정시험법의 경우 시료의 전처리 과정에 비교적 많은 시간이 소요되며 회수율이 낮은 단점을 지니고 있다.

이에 저자 등은 분석시간을 단축하고 회수율의 증가를 도모코져 간장과 유산균음료를 대상시료로 하여 각각 GLC 및 HPLC에 의한 식품중의 보존료의 정량분석 방법을 검토하여 보고하고자 한다.

Received for publication 30 September; 1988
Reprint request; Dr. M.H. Kim at the above address

재료 및 방법

재료—시료는 보존료가 첨가되지 않은 간장과 유산균음료를 제조회사로부터 구득하여 사용하였다.

보존료 표준품은 함량 99.0% 이상의 순정화학 주식회사 제품을 사용하였고 증류수와 Methanol은 HPLC용을, 기타 시약은 특급을 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 HPLC System(Waters사 제품의 Model 440 Detector, U6K Injector, 6000A pump, 730 Integrator), GLC System

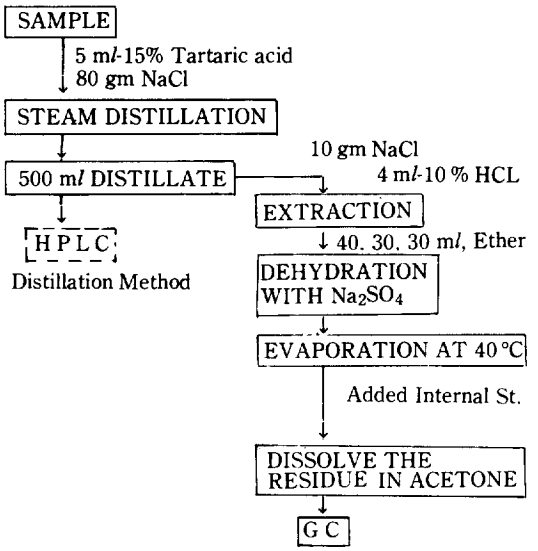

Fig. 1. Standard method for the determination of preservatives in foods.

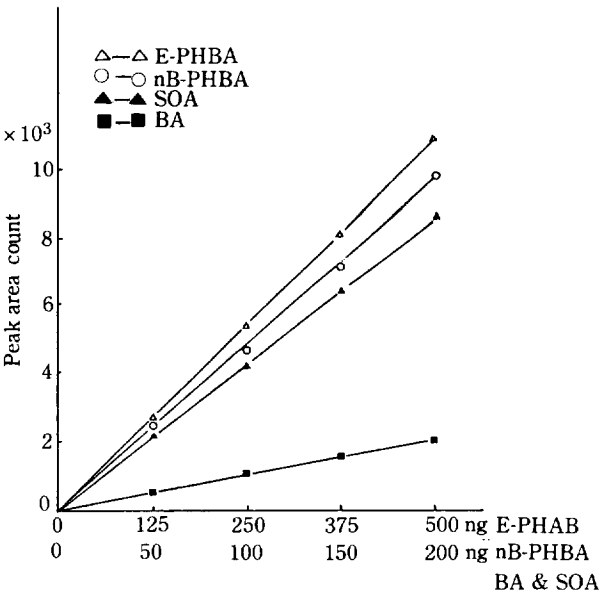

Fig. 3. Calibration curve of BA, E-PHBA, nB-PHBA, and SOA by HPLC chromatogram.

(Perkin Elmer 900 F1D), Vacuum evaporator (Büchi R 110), Centrifuge (제일 이화학 C-C_8) 및 pH meter (Fisher 805 MP) 등이었다.

실험방법-1) HPLC에 의한 정량법 : 시료를 기준시험법 (Fig. 1)에 따라 수증기 증류한 후 추출과정을 생략하고 직접 수증기증류액을 HPLC system에 주입하는 분석방법 (증류법)과, 시료를 보존료의 함량에 따라 적당히 희석하여 원심분리한 상등액이나 필요시 여과한 여액을 HPLC system에 직접 주입하는 분석방법 (희석법)을 시도하였다 (Fig. 2).

검량선의 작성은 E-PHBA (Ethyl-p-Hydroxybenzoate)와 nB-PHBA (n-Butyl-p-Hydroxybenzoate)의 표준품을 50% Methanol에 녹여 25, 50, 75, 100 $\mu g/ml$의 농도로 만들고 BA

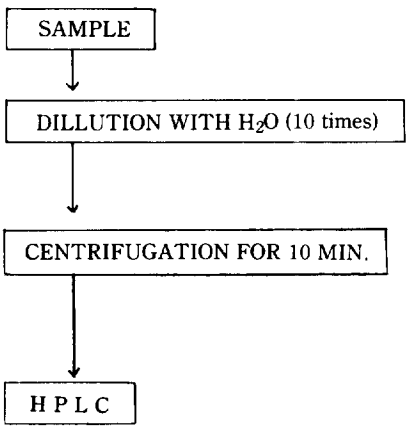

Fig. 2. Dillution methods for the determination of preservatives in food by HPLC.

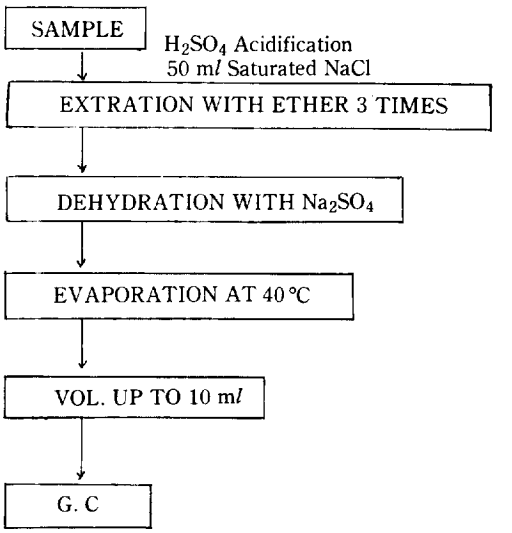

Fig. 4. Direct extraction method of preservatives in foods.

(Benzoic acid)와 SOA(Sorbic acid)는 10, 20, 30, 40 $\mu g/ml$가 되도록 만들어서 이 표준용액 5 μl를 HPLC system에 주입하여 얻은 peak area를 이용, 검량선을 작성하였다(Fig. 3).

2) GLC에 의한 정량법 : 시료를 수증기 증류과정 없이 직접 유기용매로 추출하여 GLC system에 주입하는 분석방법(직접추출법)을 시도하였다(Fig. 4).

검량선은 SOA, BA, E-PHBA, nB-PHBA의 표준품을 0.1% acetanilide(내부표준물질) acetone용액에 녹여 각각의 농도가 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/ml가 되도록 만들고 이 용액 3 μl를 GLC system에 주입하여 얻은 보존료와 내부표준물질의 peak height ratio로부터 작성하였다(Fig. 5).

결과 및 고찰

기준시험법의 검토—기준시험법에서 이용되고 있는 수증기 증류과정은 복잡한 식품성분 중에서 보존료를 분리하는 장점이 있으나 이를 완전히 회수하는데는 많은 시간이 소요된다.

수증기증류액의 양에 따른 보존료의 회수율을 알아보기 위하여 보존료가 첨가되지 않은 간장에

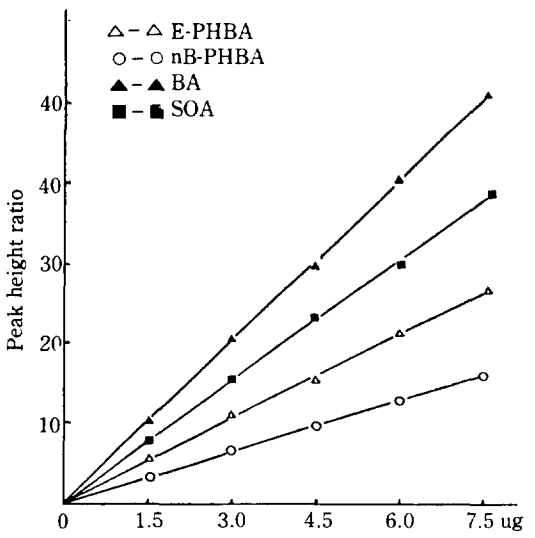

Fig. 5. Calibration curve of BA, E-PHBA, nB-PHBA and SOA by GLC chromatogram.

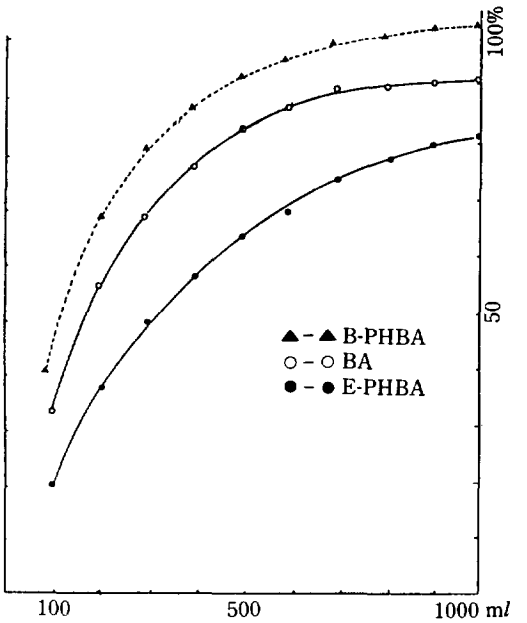

Fig. 6. Recovery rate of preservatives by distillative volume.

BA, E-PHBA, n-B-PHBA를 허용기준농도로 임의 첨가하여 실험한 결과가 Fig. 6에 제시되었다.

증류액을 기준시험법에 따라 500 ml 받은 경우 회수율은 BA가 87%, E-PHBA가 68%, n-B-PHBA가 95%이었으며 증류액을 1000 ml까지 받을 경우 n-B--PHBA는 전량 회수되었으나 BA와 E-PHBA는 각기 91%, 83%로 낮게 나타났다. 따라서 유출속도를 분당 10 ml로 할 때 100분의 증류시간이 소요되면서도 BA와 E-PHBA는 전량 회수되지 않았다.

HPLC system에 의한 정량—보존료가 첨가되지 않은 간장에 BA, E-PHBA, n-B-PHBA를 첨가하고 기준시험법에 의거 수증기 증류한 증류액과 보존료를 첨가한 후 이 간장을 증류수로 적당히 희석하여 각각을 HPLC system에 주입한 후 얻은 chromatogram이 Fig. 7에 제시되었다.

증류법으로 얻은 증류액을 주입한 경우에는 미지성분들이 증류과정에서 제거되어 나타나지 않았으나 희석액의 주입시는 BA는 미지성분 peak와 분리가 되지 않았다. 이는 앞으로 column과 mobile phase를 적당히 선택하면 이들의 분리가 가능하리라 생각된다.

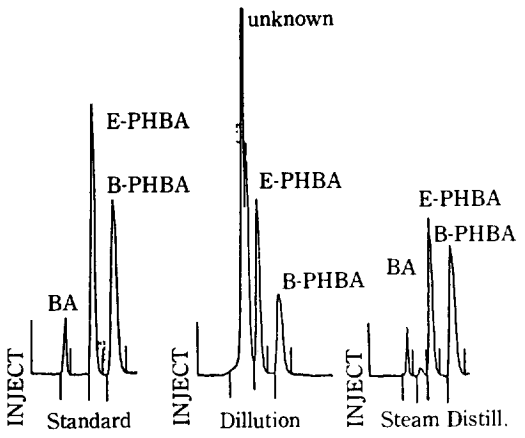

Fig. 7. HPLC chromatogram of benzioic acid and parabens in soybean sauce by dilluted sample and steam distilled one.
Column: μBondapak C_{18}.
Mobile Phase: 70% MtOH
Flow rate: 1.0 ml/min.
AUFS: 0.1
Detector: UV 254 nm.
Chart speed: 0.5 cm/min.

한편 유산균음료에 SOA를 허용기준 농도로 임의 첨가한 시료를 증류법과 희석법으로 처리하여 HPLC system에 주입한 후 얻은 chromatogram은 Fig. 8과 같다.

이는 두 가지 방법 모두 분리가 양호하였으며 특히 희석액을 HPLC system에 주입한 경우 미지

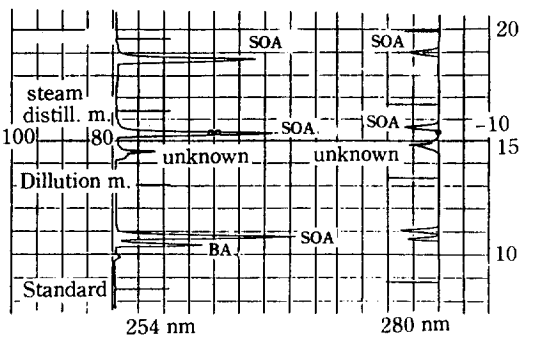

Fig. 8. HPLC chromatogram of sorbic acid in yoghurt.
Column: μBondapak C_{18}.
Flow rate: 1.0 ml/min.
Mobile Phase: 0.05M KH_2PO_4: MtOH (65:45).
Detector: 254 & 280 nm (UV).
AUFS: 0.1.
Chart speed: 0.5 cm/min

성분 peak가 나타났으나 SOA peak와는 완전하게 분리되므로써 정량분석이 가능하였다.

이와 같이 시료를 단순한 전처리과정을 거쳐 HPLC system에 의한 분석법은 시료의 복잡한 전처리 과정에서 발생되는 실험오차, 소요시간과 비용을 절감할 수 있다고 생각된다. 이때 peak 성분의 정성 확인은 UV검출기(254와 280 nm)를 이용하여 얻은 흡광도를 비교하므로써 필요한 추가 자료를 얻었다.

GLC system에 의한 정량—일반적으로 널리 이용되고 있는 직접 추출법은[2,3,6,7,8] 증류과정이 생략되어 분석시간을 단축시키는 장점이 있으나 시료에 대한 추출용매가 부적당할 경우 심한 emulsion 현상이 나타나 수층과 유기용매의 분리가 잘 되지않아 시료에 따라 추출용매의 선택을 달리해야 하는 어려움이 따른다.

박 등[7], 신 등[8] 및 김 등[9]은 추출용매로

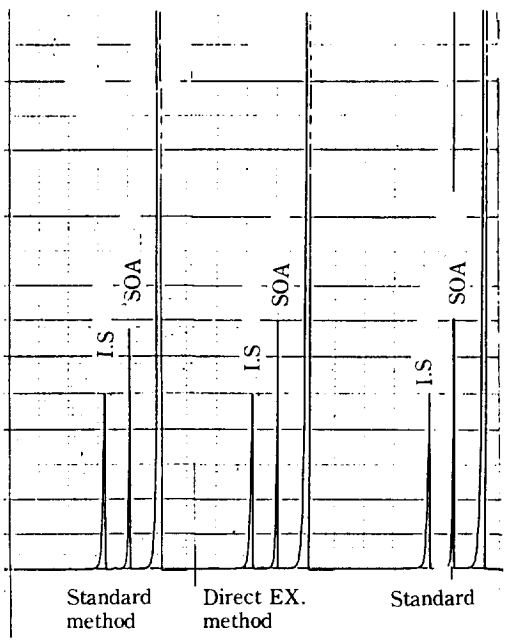

Fig. 9. Gas chromatogram of preservatives in yoghurt by standard method and direct extraction method
Detector: FID.
Carr. gas: N_2 60 ml/min.
Column: 2% DEGS-0.5% H_3PO_4 on chromosorb. W (AW-DMCS)
Oven temp.: 160 °C (2 min). 200 °C (6 min).
Program rate: 24 °C/min.
Inj. & Dect. temp.: 240 °C.

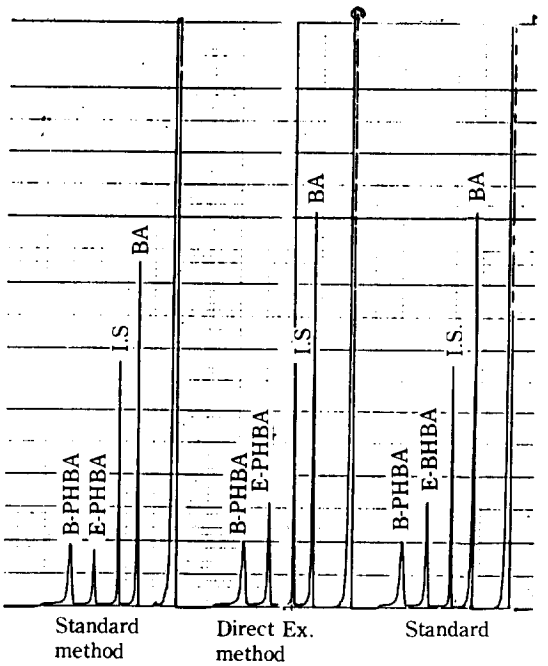

Fig. 10. Gas chromatogram of preservatives in soybean sauce by steam distillation method and direct extraction method

Ditector: FID. Carr. Gas: N_2 60 ml/min.
Column: 2% DEGS-0.5% H_3PO_4 on Chromosorb. W(AW-DMCS)
Oven Tem.: 160 °C (2 min.)~200 °C (6 min).
Program rate: 24 °C/min.
Inj. & Dect. Tem.: 240 °C.

Ether : Pet. Ether(1 : 1) 혼합용액을 이용하여 추출하였으며 NMKL-AOAC법[6]에서는 Dichloromethane을 이용, 추출하였다. 저자 등은 추출용매로 Ether를 이용하였으며 추출시 발생되는 emulsion은 진한 황산을 3~4적 적가하여 제거시키므로서 양호한 분리효과를 얻었다.

유산균음료와 간장에 대하여 저자 등이 실시한 직접추출법과, 기준시험법에 의거, 증류 추출한 후 GLC를 행하여 얻은 chromatogram은 Fig. 9 및 Fig. 10과 같다. 이에 따르면 두 방법 모두 전처리 과정에서 미지성분이 완전제거되고 보존료만이 양호하게 추출되었으며 직접추출법이 기준시험법보다 BA나 E-PHBA가 훨씬 양호하게 회수되었다.

분석시간—식품중 보존료의 정량분석에 소요되는 시간을 도표로 비교해 보면 Fig. 11과 같다. 즉 기

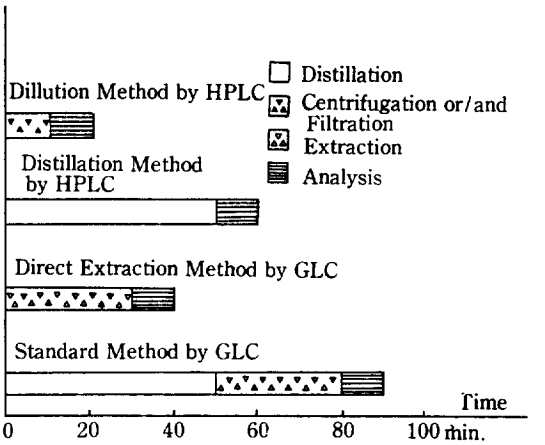

Fig. 11. Comparison of requiring time for analytical method.

준 시험법이 500 ml 증류액을 받을 경우 90분 이상으로 가장 많이 소요되고 직접추출법은 수증기 증류과정에서 소요되는 시간인 50분 정도를 단축할 수 있었고 HPLC에 의한 증류법의 경우는 유기용매에 의한 추출시간을 약 30분 정도 단축시킬 수 있었다.

소요시간이 가장 짧은 분석방법은 HPLC system에 의한 회석법으로 수증기증류와 유기용매 추출시간을 단축시켜 약 20분 이내에 실험을 완료할 수 있었다.

회수율—Table 1에 제시된 바와 같이 GLC system에 의한 직접추출법이 간장에 있어서 99.0 % 이상, 유산균음료는 100.8%로 나타났다. 이러한 결과는 NMKL-AOAC Method[6](BA 105.9%, SOA 106.6%) 및 박 등[7](BA 95.8%, nB-PHBA 97.2%)의 보고와 유사하였다. 그러나 노 등[10]은 직접추출법이 불순물의 혼입 때문에 기준시험법보다 회수율이 떨어진다고 주장하였다. 이는 대상 시료가 서로 다른데서 오는 차이라 생각되며 저자 등이 간장과 유산균음료를 대상시료로 실시한 직접추출법은 불순물의 혼입이 없이 보존료가 양호하게 분리 추출되어 기준시험법보다 높은 회수율을 보였다.

기준시험법에서 BA와 E-PHBA의 회수율이 낮은 이유는 추출과정에서 손실이 되는 것이 아니고 수증기 증류과정에서 미회수되는 양에 기인된다고 생각된다.

Table 1. Recovery rate of added preservatives in food by GLC & HPLC

(10 times Experiment)

Samle	Preservatives	HPLC (%)		GLC (%)	
		Dilution m.	Distillation m.	Standard m.	Direct Ex. m.
Soybean sauce	Benzoic acid	-	86.2±1.37	86.3±2.93	99.2±1.13
	E-PHBA	99.1±0.73	69.3±2.75	68.7±3.72	99.0±1.08
	nB-PHBA	99.9±0.62	94.5±2.01	94.3±3.03	99.1±1.22
Yoghurt	Sorbic acid	99.1±0.69	94.7±1.86	90.4±3.29	100.8±1.48

Mean±SE

HPLC system에 의한 증류법은 간장과 유산균음료 모두에서 모든 보존료가 기준시험법보다 높은 회수율을 나타냈다.

HPLC system에 의한 희석법은 간장중 E-PHBA가 99.1%, n-B-PHBA가 99.9%, 그리고 유산균음료중 SOA는 99.1%로 상기 어느 시험방법 보다도 가장 높은 회수율을 보였다. 그러나 간장중 BA는 미지성분 peak와 분리가 안되어 본 희석법으로는 정량분석이 불가능하였다.

국문요약

식품중 보존료의 분석방법을 신속 간단하면서도 정확기 정량할 수 있는 방법 개발을 시도한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HPLC system에 의한 희석법으로는 간장중 paraben류와, 유산균음료중 SOA를 99% 이상의 회수율로 20분 이내에 정량할 수 있었다.

2. GLC system에 의한 직접 추출법으로 간장중 BA와 Paraben류의 동시정량이 가능하였으며 유산균음료중 SOA를 99% 이상의 회수율로 신속히 정량할 수 있었다.

참고문헌

1. 保健社會部 : 食品 等의 規格 및 基準(1986).
2. 日本藥學會編 : 衛生試驗法·注解, 東京, 金原出版社(1983).
3. 小原哲二郎 外 2人 : 食品分析ハンドブック, 東京, 建帛社(1982).
4. 日本厚生省環境衛生局 食品化學課編 : 食品中の食品添加物分析法, 東京, 雙文社(1982).
5. Kenji, I.: Gas chromatographic determination of propionic acid in bread and cake. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 280 (1981).
6. Larsson, B.K.: Gas-liquid chromatographic determination of benzoic acid and sorbic acid in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **96**, 775 (1983).
7. 박성배, 송한호, 노홍식, 이봉자 : 식품중의 보존료에 관한 조사연구(II), 서울특별시립 위생연구소보, **7**, 103(1971).
8. 신정래, 이덕행, 전선락 : 식품중의 보존료에 관한 조사연구(III), 서울특별시립 위생연구소보, **8**, 35(1972).
9. 김효상, 김을상, 이인세, 박춘봉, 신재영 : Gas chromatography에 의한 식육제품 및 건어포류중의 보존료 사용실태에 관한 연구, 서울특별시립 위생연구소보, **9**, 99(1973).
10. 노정배 : 식품첨가물분석에 관한 연구, 국립보건연구원보, **16**, 425(1979).
11. Tyler, T.A.: Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffein, aspartame and sodium benzoate in cola beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 745 (1984).
12. Fröhlich, D.H.: Optimized separation of ben-

zoic and sorbic acid as preservatives in foodstuffs. by reversed-phase HPLC. *J. HRC & CC,* **5,** 158 (1982).
13. Park, G.L. and Nelson, D.B.: HPLC analysis of sorbic acid in citrus fruit. *J. Food. Sci.,* **46,** 1629 (1981).
14. Hatanaka, H. and Kaneda, Y.: Rapid simultaneous analysis of hippuric and benzoic acid in fermented milk and law milk by high performance liquid chromatography. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* **27,** 81 (1986).
15. Kiyoshi, T.: GLC and HPLC determination of therapeutic agents, Part 2, New York, Dekker Inc., 1980.