식품첨가물의 분석에 관한 연구(II)
고속액체크로마토그라피에 의한 아질산의 정량

천석조·임영희·송인상·노정배

한국식품공업협회식품연구소

Studies on Analysis of Food Additives (II). Determination of Nitrite by High Performance Liquid Chromatography

Seok-Jo Cheon, Young-Hee Lim, In-Sang Song and Jung-Bae Ro

Food Research Institute, Korea Foods Industry Ass., Seoul, 137-070, Korea

ABSTRACT—For the purpose of discussing two colorimetric methods modified from the Standard Methods of Sanitary Inspection Guide issued by the Ministry of Health and Social Affaires of Korea (1985), the Standard Methods of Analysis of Hygienic Chemists authorized by the Pharmaceutical Society of Japan (1980) and HPLC (high performance liquid chromatography) method were studied.

Two kinds of ham, sausage samples and four kinds of roe samples were analyzed by the HPLC method and the results agreed well with those obtained by the diazotization-coupling colorimetric method prescribed in the Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists authorized by the Pharmaceutical Society of Japan (1980) and two modified methods.

Keywords □ Nitrite, HPLC, Ham, Sausage, Roe

아질산 이온은 azo색소를 생성하는 선택적인 diazo-coupling 반응에 의해서 비색측정할 수 있다. Kamm 등[1]은 카드뮴 환원칼럼을 이용하여 질산염 및 아질산염을 동시에 정량할 수 있는 방법을 보고하였으며, Nagata 등[2]은 종래의 방법들을 검토하고 환원형 ascorbate가 공존할 때 저해작용이 크므로 분석방법 상호간에 큰 차이를 나타내므로 이들 결점을 보완한 Follett 및 Ratcliff 변법을 제안하였다. Kanno 등[3]은 日本食品衛生指針[4]에 기재되어 있는 방법을 검토하고 종래의 시험방법에 많은 개선점이 있음을 지적하였다.

한편, 기체-액체크로마토그라피(GLC)에 의한 분석방법으로는 Chikamoto 등[5]에 의한 Sandermeyer 반응을 이용한 것, Tanaka 등[6]의 hydralazine과 아질산의 반응으로 정량적으로 tetrazole[5, 1-α]phthalazine을 생성하는 것을 이용한 방법 등이 있다. 또한 Tanaka 등[6]은 GLC에 의해 식품중의 아질산 및 질산이온을 동시에 정량할 수 있는 방법을 보고하였으며 mouse 체내의 질산염 및 아질산염의 분포를 GC-MS 및 GLC에 의하여 확인하고 있다.[7]

Kunugi 등[8]은 HPLC에 의한 정량방법으로 식육, 햄, 소시지, 야채류 및 하천수를 분석하였다. 이들 방법의 원리는 종래 비색법에 이용되어 온 2, 6-xylenol과 질산 및 아질산염을 선택적으로 반응시켜 4-nitroso-2, 6-xylenol 및 4-nitro-2, 6-xylenol로 하여 이들을 HPLC에 의하여 분리 정량하는 것으로 실용상으로 간편 신속하고 높은 精度로 식품, 하천수 및 타액중의 아질산 및 질산염을 동시에 측정 가능하였다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 前報[9]에서 검토된 항목들

Received for publication 13 May, 1988
Reprint request; Dr. S.J. Cheon at the above address

을 종합하여 새로운 정량방법을 확립하고 이 방법과 日本衛生試驗法註解[10]에 기재된 방법, HPLC에 의한 분석 방법으로 정량하여 방법간의 분석치를 비교·검토하여 결과를 얻었으므로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료—前報[9]에서 구득한 시료를 실험에 사용하였다.

방법—① 비색법 : 실험에 사용한 비색법으로는 前報[9]에서 검토하여 확립한 방법으로서, 식육제품에 대한 분석방법(Fig. 1), 지질함량이 높은 생선알류에 대한 분석방법(Fig. 2) 및 日本藥學會編 衛生試驗法註解에 기재된 방법이었다.

② HPLC에 의한 분석 : HPLC에 의한 아질산의 분석은 Kunugi 등[8]의 방법에 따라 행하였으며 이들의 분석조건은 Table 1과 같다.

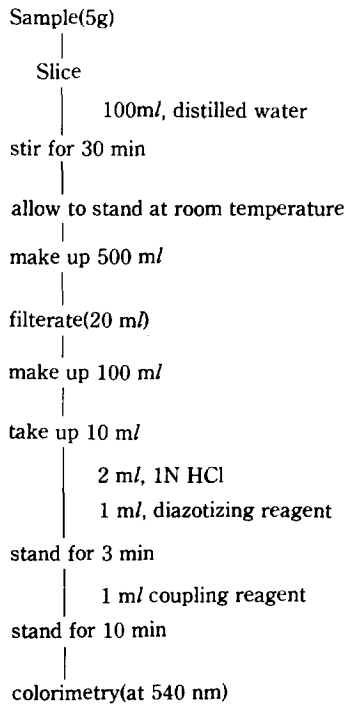

Fig. 1. Schematic procedure for the modified and improved colorimetric method of nitrite in meat-products.

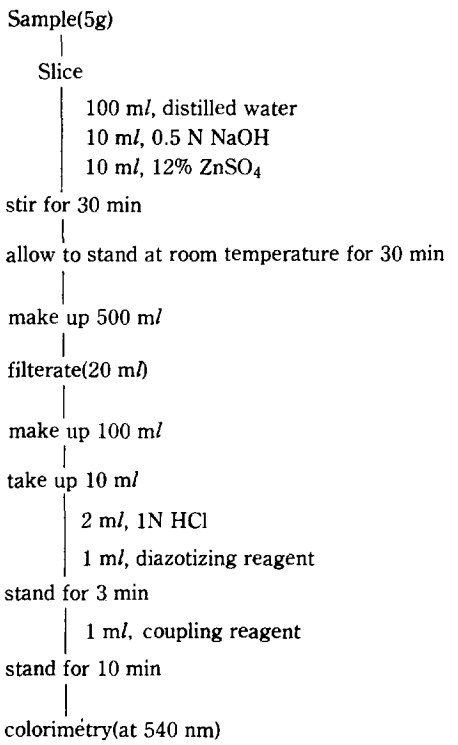

Fig. 2. Schematic procedure for the modified and improved colorimetric method of nitrite in roes.

a. 시험용액의 조제

시료용액의 조제는 衛生試驗法 註解[10]에 기재된 방법에 준하여 행하였다.

b. 정량

공전(共栓) 시험관에 황산(1+3) 4 ml 및 시험용액 5 ml를 취하여 황산은 0.1g을 가하여 잘 흔들어 혼합하고 물로 냉각한 다음 2, 6-xylenol용액 1 ml를 가하여 40℃의 수욕상에서 30분간 반응시켰다. 냉각한 후 내부표준용액인 4, 6-dinitro-o-cresol용액 1 ml 및 클로로호름 4 ml를 정확히 가하고 흔들어 추출한다. 정치한 후 2층으로 분리된

Table 1. Conditions for HPLC analysis of nitrite

Instrument	Shimadzu LC-3A, JASCO FLC-A700
Column	μ-Porasil, 30cm × 3.9mm i.d.
Eluent	Chloroform-Methanol-Acetic acid = 98:1:1
Flow rate	1.0 ml/min
Temperature	Room temperature
Detector	UV, 310 nm
Chart speed	5 mm/min

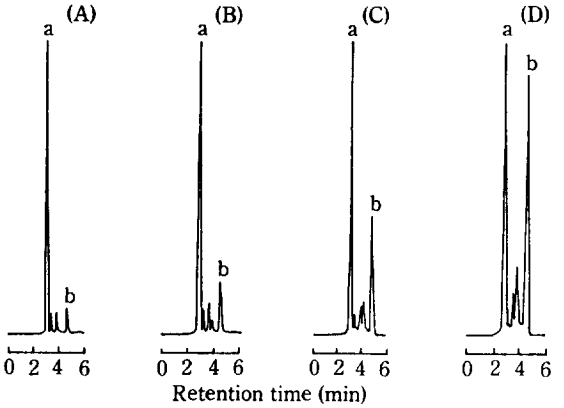

Fig. 3. HPLC chromatograms of the chloroform layer after reaction with nitrite and 2,6-xylenol.
(A) NO_2-N 0.5 $\mu g/ml$
(B) NO_2-N 1.0 $\mu g/ml$
(C) NO_2-N 2.0 $\mu g/ml$
(D) NO_2-N 5.0 $\mu g/ml$ Peak a, 4, 6-dinitro-o-cresol; b, 4-nitroso-2.6-xylenol.

액에서 클로로호름 추출액 10 μl를 HPLC에 주입하고 얻어진 chromatogram에서 내부표준물질에 대한 peak높이의 비를 구하였다.

한편 아질산성 질소 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 $\mu g/ml$를 함유하는 표준용액에 대하여 시험용액과 동일하게 조작하고 각 농도에 대한 4-nitroso체의 내부표준물질에 대한 HPLC chromatogram을 작성하여 Fig. 3에 나타내었다. 별도로 아질산성 질소 0.05, 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0 $\mu g/ml$를 함유하는 표준용액에 대하여 상기의 정량조건에 따라 작성한 아질산염의 검량곡선은 Fig. 4와 같으며 0.05~3.0 $\mu g/ml$의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

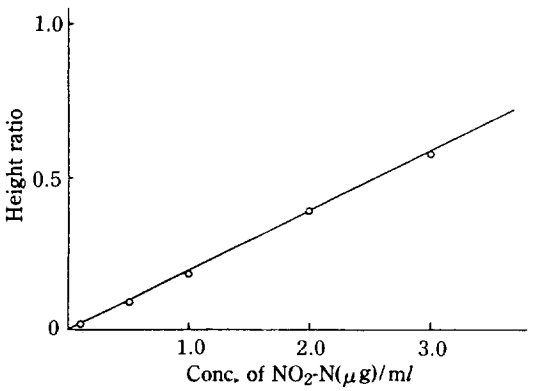

Fig. 4. Calibration curves for nitrite obtained from HPLC.

각 함량의 산정은 시험용액에서 얻은 값과 검량곡선으로부터 아질산염의 농도를 산출하였다.

결과 및 고찰

종래의 비색방법과 개선된 방법에 의한 분석결과—개선한 방법(Fig. 1, 2)과 종래의 방법으로서는 日本衛生試驗法註解에 기재된 방법과 보건사회부 고시 제86-5호 식품 등의 규격 및 기준[11]에 근거한 방법에 의하여 분석한 결과는 Table 2와 같다.

참치햄의 경우에서는 아질산염의 함량이 30.7~32.4 ppm의 범위로 분석방법들 상호간에는 큰 함량차이를 나타내지 않았다. 소시지에서는 7.0 ppm~9.9 ppm이었는데 식품 등의 규격 및 기준에 근거한 방법으로 분석한 결과가 9.9 ppm으로 다른 분석방법보다 높은 함량을 나타내었다. 또한 로스구이 햄의 아질산염은 33.7~34.9 ppm으로 나타났다.

이상의 결과에서 3가지 분석방법중 식품 등의 규격 및 기준에 근거한 방법으로 분석한 것이 가장 높은 경향을 나타내었다.

그러나 3종류의 생선알류 제품을 분석한 결과 분석시에 지질 및 단백질이 다른 시료보다 많아서

Table 2. Concentration of NO_2 in hams and roes obtained from present method and improved methods

Unit: ppm

Sample	Method 1*	Method 2*	Method 3*
Fish ham	30.7	32.4	32.2
sausage A	7.2	9.9	7.0
Ross ham	34.4	34.9	33.7
roe (1)	1.0		(0.9)**
roe (2)	2.6	2.3	(2.3)**
roe (3)	2.5	2.3	(2.2)**

Method 1*: Standard methods of Analysis for Hygienic Chemists authorized by the Pharmaceutical Society of Japan(1980).
2*: Standard methods of sanitary inspection guide issued by the Ministry of Health and Social Affaires (Korea, 1985).
3*: Modified and improved method (Fig. 1).
( )**: Modified and improved method (Fig. 2).

처리하기 곤란하였다. 그리하여 생선알류 제품과 같이 지질 및 단백질이 많은 시료에서는 제단백을 시킬 필요가 있음을 판단하고 Fig. 2와 같은 방법으로 행하였다. 제단백제로는 여러가지 측면에서 검토되어 사용하고 있는 $ZnSO_4$를 사용하고 여기에 0.5 N-NaOH를 사용하였다. 이것은 시험용액을 pH 8.3으로 하여 $Zn(OH)_2$로 하여 液中의 입자를 잘 흡착하도록 한 다음 청징액을 얻는 데 있다. 이러한 방법으로 조제한 시험용액을 분석한 결과, 여타의 방법에서 얻은 분석치와 거의 유사한 값을 얻을 수 있었다.

따라서 생선알류 제품과 같이 지질함량이 높고 단백질이 많은 시료에서는 Fig. 2와 같은 분석방법에 의하여 분석하고, 그외의 시료는 Fig. 1과 같은 분석방법으로 정량하면 종래의 분석방법으로 정량하는 것보다 간단하고 신속하게 精度있는 분석결과를 얻을 수 있다.

HPLC에 의한 분석방법과의 비교－HPLC에 의하여 분석한 결과와 비색법으로서 日本衛生試驗法註解(dizo화 법) 및 개선한 방법에 의해서 얻은 결과를 Table 3에 나타내었다.

분석한 시료는 생선알젓류 제품 및 소시지의 2종류 이었으며 비색법에 의한 방법과 비교하여 볼 때 거의 같은 분석치를 나타내었다. 즉, 알젓류의 경우에서는 2.0~2.4 ppm으로 앞서 비색법에서 얻은 결과와 거의 일치되는 것이었다. 소시지 B는

Table 3. Results of Nitrite determination in roe and sausage by different methods

Sample	HPLC method	Method 1	Method 2
roe(4)	2.0 ppm	2.4 ppm	2.2 ppm
sausage B	20.0 ppm	24.0 ppm	21.2 ppm

Method 1 : Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists authorized by the Pharmaceutical Society of Japan(1980).
Method 2 : Modified and improved method.

HPLC 방법에서 20.0 ppm, 衛生試驗法註解에 기재된 방법에서는 24.0 ppm으로 가장 높았으며 개선된 방법의 경우에는 21.2 ppm으로 방법 상호간에는 약간의 차이를 나타내었다. 또한 앞서 비색법으로 측정한 소시지 A와 소시지 B의 아질산염 함량은 10 ppm 전후로 차이가 있었는데 이는 제품의 특성상의 문제에 기인되는 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 종래의 비색법에 의해서 얻어진 값과 HPLC에 의해서 얻어진 값을 비교하여 볼 때 거의 동일한 분석치를 나타낸 점으로 미루어 보아 그 가능성이 큰 것으로 생각되지만 시료의 전처리 즉 시험용액을 조제하기 위한 제반조건들이 비색법에 의한 것으로 분석상의 번잡한 문제는 그대로 남게 된다. 또한, 이들 시험용액의 유도체화 과정 등이 check되기 쉽지않는 점 등의 제반문제에 대해 더욱 더 많은 검토가 필요할 것으로 생각된다.

국문요약

현행 보건사회부 고시 제86-5호 식품 등의 규격 및 기준에 근거한 아질산근의 정량법에 대한 검토사항 등을 종합하여 새로운 정량법을 확립하고 이 방법 및 기기분석 방법의 도입 가능성에 대하여 검토한 결과는 다음과 같다.

1) 종래의 비색방법과 개선된 방법에 의하여 분석한 결과, 참치햄의 경우 아질산염의 함량이 30.7~32.4 ppm으로 분석방법들 간에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 소시지 A에서는 7.0~9.9 ppm의 범위이었으며 로스구이 햄에서는 33.7~34.9 ppm이었다.

2) 참치햄, 소시지 A 및 로스구이 햄의 아질산염 함량은 식품 등의 규격 및 기준에 근거한 방법에서 높게 나타났다.

3) 생선알젓제품에서는 알젓(1)의 경우에서는 0.9~1.0 ppm이었지만 식품 등의 규격 및 기준에 근거한 방법에서는 검출되지 않았다.

4) 생선알젓 (2), (3)에서는 3가지 방법 모두 2.2~2.6 ppm의 범위로 아질산염 함량에는 큰 차이가 없었다.

5) HPLC 정량조건에 의한 아질산염의 검량곡선은 검토된 아질산성 질소 0.5~3 $\mu g/ml$의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

6) HPLC에 의한 분석 방법으로 아질산염을 정량한 결과 생선알젓류에서는 종래의 비색법과 거의 동일한 함량인 2.0 ppm으로 정량되었다.

7) 소시지 B에서는 20.0~24.0 ppm으로 검토된 3가지 방법들 간에는 큰 차이가 없었다.

참고문헌

1. Kamm, L., Mckeown, G.G. and Smith, D.M.: New colorimetric method for the determination of the nitrite and nitrate content of baby foods, J. of A.O.A.C., **48**(5), 892-897 (1965).
2. Nagata, Y. and Ando, N.: A colorimetric method for the determination of nitrite coexisting with various food additives, 食衛誌, 8(6), 532-539 (1967).
3. Kanno *et al.*: Some experiments on the determination of nitrite ion in fish sausage, 食衛誌, **7**(1), 72-75 (1966).
4. 厚生省編：食品衛生 檢查指針(II)，保存料試驗法, pp. 39(1963).
5. Chikamoto, T., Nagata, S. and Mitani, T.: Gas chromatographic determination of the nitrite ion in foods by means of the Sandmeyer reaction, 食衛誌, **22**(2), 114-117 (1981).
6. Tanaka, A. *et al.*: Simultaneous determination of nitrite and nitrate in foods by GLC, 食衛誌, **23**(2), 154-161 (1982).
7. Tanaka, A. *et al.*: Fate of nitrite and nitrate in mouse. 1, 食衛誌, **25**(2), 168-176 (1984).
8. Kunugi, A., Komoda, Y. and Kurechi, T.: Determination of nitrite and nitrate by HPLC, 食衛誌, **24**(3), 324-328 (1983).
9. Cheon, S.J. *et al.*: in press.
10. 日本藥學會編： 衛生試驗法註解, pp. 69, 331 (1980).
11. 한국식품공업협회편 : 식품 등의 규격 및 기준, 보·건사회부 고시 86-5호, pp. 63-64(1985).