Kor. J. Food Hygiene 7(1), 49-52 (1992)

HPLC를 이용한 식품 보존료의 동시분석에 관한 연구

김우성 · 임복규 · 백종민 · 박인원 · 임연하 · 지영애 · 조경종
국립부산검역소 식품검사과

Studies on Simultaneous Analysis of Preservatives by High Pressure Liquid Chromatography in Foods

W.-S. Kim, B.-K. Lim, J.-M. Baek, I.-W. Park, Y.-H. Lim
Y.-A. Ji and K.-J. Jo
Pusan National Quarantine Station, Food Inspection Div.

ABSTRACT—**A Liquid Chromatogaphic Method was applied to analyze the following nine preservatives used for foods simultaneously; propionic acid, sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, ethyl *p*-hydroxy benzoate, propyl *p*-hydroxy benzoate, *i*-butyl *p*-hydroxy benzoate, butyl *p*-hydroxy benzoate, ethyl salycilate. A cosmosil $5C_{18}$ was used and 1% phosphoric acid-acetonitrile (60 : 40) was used as the mobile phase. Pretreatment of the food sample with steam distillation improved the resolution of peaks at 220 nm.**

Keywords□**Preservative, HPLC**

최근 산업의 발달과 수입 개방화에 따라 여러 종류의 수입식품이 급증하고 있다. 제조식품의 보존과정에서의 보존료 사용은 필수적이나 우리가 섭취하는 가공식품이나 수입식품들에 들어있는 이들 대부분의 보존료는 안전한 첨가 범위내에서는 효과가 적고 처리효과가 있는 농도 수준에서는 잔류독성이 문제시 되어오고 있다. 현재, 식품에 포함된 보존료의 검사방법이나 분석방법 등이 공전 등에 수록, 보고되어 있으나 검사방법이 복잡하고 일회의 전처리 과정을 거쳐 보존료를 동시에 분석할 수 있는 방법들이 제시되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 각종 식품중에 잔류하는 본존료를 동시에 분석할 수 있는 잔류분석법을 찾아내고 신속 정확하게 분석할 수 있는 실험 조건을 찾고자 시도하였다.

Received for publication 23 April, 1992
Reprint request: Dr. KJ. Jo at the above address

재료 및 방법

Propionic acid(PA), sorbic acid(SA), ethyl salycilate, tiglic acid 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. Benzoic acid(BA), ethyl *p*-hydroxy benzoate(EPHBA), propyl *p*-hydroxy benzoate (PPHBA), *i*-butyl *p*-hydroxy benzoate(IBPHBA), butyl *p-hydroxy benzoate(BPHBA), tartaric acid, NaCl, phosphoric acid* 등은 *Junsei Chemical Co.*에서 구입하였고 *dehydroacetic acid(DHA)*는 *Fluka Co.*에서 구입하였다. 이외에 *methanol, acetonitrile* 등은 *Fisher Scientific*에서 구입하였다.

기기분석에 사용한 기종인 *HPLC*는 *WATERS*사 제인 *510 HPLC pump, Automated Gradient Controller, 484 Tunable UV Absorbance detector, 746 Date Module, U6K injector*를 사용하였고, 보존료 분석을 위한 조건은 *column; cosmosil* $5C_{18}$ (4.6 mm×150 mm; Nacali Co.), mobile phase; 1% phosphoric acid : acetonitrile (60 : 40), flow rate; 0.8 ml/min,

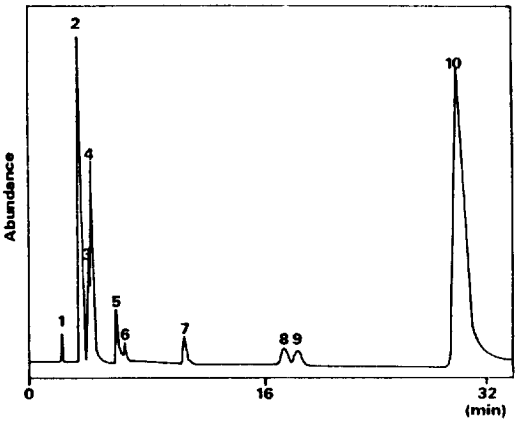

Fig. 1. HPLC chromatogram of orange juice spiked with standard preservatives at 220 nm.
1. PA, 2. Internal standard(ISTD; tiglic acid), 3. SA, 4. BA, 5. DHA, 6. EPHBA, 7. PPHBA, 8. IBPHBA, 9. BPHBA, 10. ES

detector; 220 nm, Injection volume: 5~10μl였다.

추출방법은 검체 50g을 취하여 구데루나다니쉬 농축기에 NaCl 50g, H_2O 150 ml, 15% tartaric acid 5 ml (pH=2~3)를 함께 가하여 수증기 증류법에 의해 전처리한 용액 500 ml를 취하여 그 여액중의 일부(5~10 μl)를 HPLC에 주입하여 정성 및 정량을 하였고, 보존료가 들어 있지 않은 검체에 각 성분의 표준물질을 spike한 후 수증기 증류법에 의해 각 보존료의 회수율을 구하였다.

결과 및 고찰

보존료의 검사식품을 적당량 취하여 증기증류에 의하여 추출하거나, 증류액으로부터 에테르를 다시 이용하여 추출하거나, 식품으로부터 에테르를 이용하여 직접 추출한 것을 HPLC를 이용하여 정성 및 정량분석을 할 수 있으며,[1] 증류액으로부터 에테르를 추출 용매로하여 보존료를 직접 추출한 후 유도체를 만들어 GC로 정량하는 경우[2]는 많은 시료를 동시에 검사할 수 있는 장점이 있으나 정량치의 정확도가 떨어지는 단점이 있다. 본 연구에서는 빠른 시간내에 식품에 잔존하는 보존료를 정성·정량하기 위해 수증기 증류에 의해 추출한 증류액을 직접 HPLC에 주입하여 식품에 포함되어 있는 보존료를 동시에 분석하고자 하였다. Fig. 1은 보존료 표준물질의 회수율을 구하기 위해 검체로 orange juice에 각 성분의 표준물질을 spike한 후 UV 최대 흡수파장 220 nm에서 측정한 chromatogram이다. 단, 검체로서는 수증기 증류법에 의해 보존료가 검출되지 않는 orange juice를 사용하였다. 각 보존료의 표준물질은 methanol에 녹여 사용하였고, 각 성분의 농도와 회수율은 Table 1에 나타내었다. Table 1에서와 같이 EPHBA와 PPHBA를 제외하고는 회수율이 높아 분석을 수행하는 데 좋은 결과를 나타내었다.

9종의 보존료를 HPLC로 동시분석시 각 보존료의 최대 UV흡수파장 값들이 가장 큰 요인이 된다. BA는 220 nm, 그 외의 보존료는 254 nm 근처에서

Table 1. The concentration of each preservatives and recovery of standard preservatives added to sample of orange juice

STD	concentration(mg/kg)	Recovery (%)
PA	451.8	122.8± 2.8
SA	20.4	110.4± 3.5
BA	30.2	72.6± 1.2
EPHBA	17.0	25.9± 0.3
DHA	23.8	72.4± 0.6
PPHBA	28.4	37.3± 0.2
IBPHBA	21.6	70.6± 0.3
BPHBA	19.4	58.0± 0.1
ES	37.6	71.0± 0.2

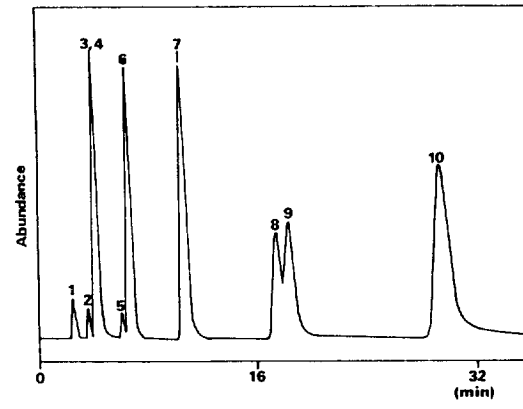

Fig. 2. HPLC chromatogram of standard preservatives at 254 nm.
1. PA, 2. Internal standard(ISTD; tiglic acid), 3. SA, 4. BA, 5. DHA, 6. EPHBA, 7. PPHBA, 8. IBPHBA, 9. BPHBA, 10. ES

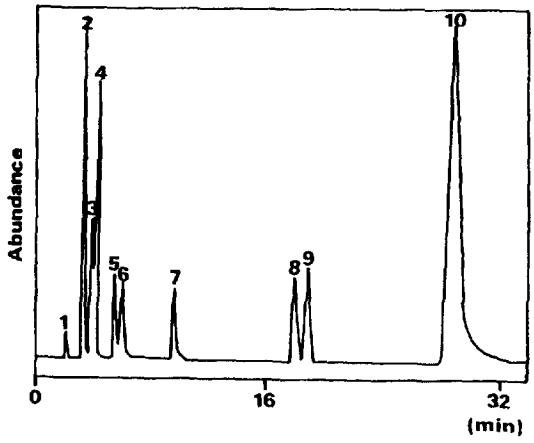

Fig. 3. HPLC chromatogram of standard preservatives at 220 nm.
1. PA, 2. Internal standard(ISTD; tiglic acid), 3. SA, 4. BA, 5. DHA, 6. EPHBA, 7. PPHBA, 8. IBPHBA, 9. BPHBA, 10. ES

최대흡수 파장값을 나타냈다.

μ-Bondapak C_{18}으로 254 nm에서 여러 전개용매 −acetonitrile : H_2O(60 : 40), methanol : 2% acetic acid, 0.2 M phosphate buffer(pH 5) : acetonitrile, 1% phosphoric acid : acetonitrile(60 : 40)− 에서는 peak의 재현성도 없었고 BA와 SA가 겹치는 현상이 나타났다. 전개용매로 1% phosphoric acid: acetonitrile(60 : 40)을 사용하여 cosmosil 5C_{18}으로 254 nm에서 검출해 본 결과 peak의 재현성은 좋았으나 BA와 SA를 분리할 수가 없었다(Fig. 2). μ-Bondapak C_{18}과 cosmosil 5C_{18}을 비교시 동일 조건하에서 검출되는 표준물질의 Retension time 값이 μ-Bondapak C_{18}의 경우 cosmosil 5C_{18}보다 길기 때문에 또한, 피이크의 재현성도 없어 cosmosil 5C_{18}을 사용하였다.

254 nm 조건에서는 BA와 SA를 분리할 수 없었기에 보존료 표준물질의 UV최대 흡수파장값들을 고려해 볼 때, 229 nm 관측 파장을 변환시켜 검출해 본 결과 Fig. 3과 같이 분리도가 좋은 chromatogram을 얻었다. 254 nm에서는 *i*-BPHBA와 BPHBA의 분리도가 좋지 않았고, DHA의 상대적 피이크가 감소할 뿐만아니라 SA와 BA의 피이크가 겹쳐(Fig. 2) 동시분석을 할 수가 없었기에 보존료의 검출파장 영역을 Fig. 3에서와 같이 220 nm로 고정시켜 검출하고자 하였다.

각 보존료의 최대 UV흡수 파장값들을 고려해 볼 때, 254 nm에서 SA와 BA가 겹치는 이유는 최대 흡수파장이 BA는 220 nm이고 SA는 254 nm로 UV spectrum상에서 SA의 흡수파장 영역이 200~300 nm로 broad하여 BA의 최대 흡수띄가 묻히게 되어 BA의 감도를 상대적으로 감소시키고 검출파장영역이 254 nm로 BA보다 SA가 더 선택성이 있으므로 SA에 BA가 겹쳐 검출되어지며, 검출 파장영역이 220 nm에서는 BA의 흡수파장 영역이 220~240 nm로 254 nm와는 달리 상대적인 흡광도가 SA와 BA가 비슷하기 때문에 분리되어지는 것으로 믿어진다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 PA만을 사용하여 chromatogram을 얻는 경우 흡광도가 큰 피이크를 얻을 수 있으나 동시분석의 경우 PA의 피이크의 높이가 상대적으로 낮아지는 현상을 보였다. 따라서 분석할 경우에는 수증기 증류에 의해 재 전처리한 후 GC와 상호보완하여 실험을 하여야 할 것이다. 따라서 수증기 증류에 의하여 전처리한 용액을 재 전처리하지 않고 직접 HPLC에 주입시 column의 효율이 떨어지는 단점은 있으나 식품내에 잔류하는 보존료를 한번의 전처리만으로 정성 및 정량이 가능한 실험방법을 고안하였다.

국문요약

식품에 잔류하는 보존료를 동시에 정성 및 정량분석하고자 수증기 증류법에 의한 전처리한 용액을 HPLC주입하여 chromatogram을 얻었다. cosmosil 5C_{18} HPLC column을 사용하였고, 이동상 용매로서는 1% phosphoric acid와 acetonitrile(60 : 40) 혼합용매를 사용하였고, 220 nm의 검출 파장 조건에서 실험해 본 결과 분리도가 좋은 chromatogram을 얻었다. 따라서 수증기 증류법에 의해 단 한번의 전처리 과정을 거쳐 HPLC를 이용하여 보존료를 동시에 분석, 정성 및 정량이 가능하였다.

참고문헌

1. Macrae, R.: Food Science and Technology A series of monographs 'HPLC in Food Analysis' 2nd edition 241-246.
2. 한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터: 식품중 인체 유해물질검정교육훈련과 분석방법개발에 관한 연구, Vol. 3 (1991).
3. Kitada, Y., Tamase, K., Sasaki, M., Nishikawa, Y. and Tanigawa, K.:Determination Saccharin, Benzoic acid and *p*-hydroxybenzoate esters in soy sauce high speed liquid chromatography, *J. Food Hyg. Soc., Japan,* **21**, 480-484 (1980).
4. Smyly, D., Woodward, B. and Conrad, E.: Determination of saccharin, Sodium benzoate, and caffeine in beverages by reverse phase high-pressure liquid chromatography, *J. AOAC,* **59**, 14~19 (1976).