

## HPLC에 의한 멸치액젓의 Carbonyl 화합물 분석

장 백 경 · 이 혜 수

서울대학교 가정대학 식품영양학과

### Separation and Quantitative Determination of Carbonyl Compounds in the Filtrated Myulchichuts by HPLC

Pack Kyung Chang and Hei Soo Rhee

*Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University*

#### =ABSTRACT =

Qualitative and quantitative analysis for carbonyl compounds contained in the five kinds of filtrated myulchichuts have been made using HPLC. Carbonyl compounds were separated by converting them into 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives which, in turn extracting with hexane. The extract was dehydrated, filtered and examined on HPLC with  $C_{18}$  column. The quantitative determination of carbonyl species was achieved using standard calibration technique.

Highly reproduceable results were obtained by this methods and the amounts of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives were highly correlative to peak heights. As the results, we find that the seven kinds of carbonyl compounds are contained in each of myulchichuts examined in this study. Five of which are identified as pyruvic acid, formaldehyde, acetaldehyde, acetone and butanone. But the amounts of carbonyl compounds vary widely with the kinds of the filtrated myulchichuts.

#### 서 론

식품중에 들어있는 carbonyl 화합물은 극히 미량으로도 후각을 자극할 수 있어 식품의 향미에 큰 영향을 주므로 관심을 끌고 있다. Schultz 등<sup>1)</sup>에 의하면 지방의 자동산화에 의해 과산화물이 형성되고 그후 저분자

접수일자 : 1985년 1월 30일

량의 carbonyl 화합물로 분해하는데 이질때문에 off-flavor 와 맛의 변화가 일어난다고 하였다. Wick<sup>2)</sup>는 carbonyl 화합물의 후각 threshold는 아주 낮아 어떤 것은 G.C.(FID)의 detection limit 보다 적은 양으로도 감지할 수 있다고 하였다. 식품중의 carbonyl 화합물은 천연으로 함유된 것보다는 지방산의 산화로 형성되는 것이 더 관심의 대상이 되고 있고, 그 양을 측정하여 지방산의 산화정도를 확인하는 지표로 이용하고 있다.

Carbonyl 화합물의 분리는 vacuum distillation에 의하거나<sup>3-6)</sup> 2,4 - Dinitrophenylhydrazine(2,4 - DNP H)의 유도체로 만들어 침전을 형성시키는 방법<sup>7-12)</sup>을 사용한다. 또 vacuum distillation으로 얻은 carbonyl 화합물을 2,4-DNPH로 침전을 형성, 추출하기도 한다<sup>13)</sup>. vacuum distillation에 의한 방법은 carbonyl 화합물이 다른 유기물들과 함께 증류되어 나오기 때문에 보통 G.C.-M.S.system으로 분석하고 있다. 2,4-DNPH 유도체는 carbonyl 화합물의 분리를 위하여 가장 빈번히 이용되는데 화합물이 안정되고 여러 물질의 혼합물중에서 carbonyl 화합물만 선택적으로 분리해 낼 수 있는 장점이 있다. 또 chromatography, spectral analysis, m.p. 등을 이용하여 정성분석이 쉬운 이점이 있다<sup>6)</sup>.

식품중의 carbonyl 화합물에 대하여는 발효식품중 낙농제품의 향미 성분<sup>4)</sup>, blue cheese<sup>3)</sup>, 과일향<sup>5)</sup>, 생선<sup>6)</sup>에 대하여 vacuum distillation을 하여 G.C.-M.S.로 분리한 것이 있다. 우리나라 식품에 대하여는 김치를 vacuum distillation으로 처리하여 G.C.로 정성하였고<sup>13)</sup> 간장중의  $\alpha$ -keto acid를 2,4-DNPH 유도체로 만들어 paper chromatography로 분리하여 455 nm에서 비색, 정량한 것이 있다<sup>12)</sup>. HPLC를 사용한 carbonyl 화합물의 분석은 Selim<sup>10)</sup>이 propionaldehyde의 2,4-DNPH유도체로 미량 분석이 가능함을 보고하였고, G.C.에서 같은 탄소수를 가진 aldehyde와 ketone의 유도체들의 분리가 잘 안되는데 비해 HPLC로는 C<sub>18</sub> column을 사용하여 용이하게 분리됨을 보고하였다. Reindl과 Stan<sup>11)</sup>은 column의 온도를 높여 2,4-DNPH 유도체중 포화 carbonyl 화합물과 불포화 carbonyl 화합물을 분리할 수 있음을 보고하였다.

우리 고유의 식품에 대해 carbonyl 화합물의 조성을 분석한 실험은 드물고 그 실험방법들도 서로 다르다. 멸치젓은 지방의 함량이 많은 멸치를 가열하여 오랜 기간 발효시킨 것으로 지방의 산패와 가수분해로 인해 여러 종류의 carbonyl 화합물이 생성되고 그 carbonyl 화합물의 종류와 함량이 젓의 특이한 맛에 영향을 주리라고 생각된다.

본 실험에서는 멸치젓의 지방산 조성과 carbonyl 화합물 조성간의 관계를 살펴보는 첫 단계로 HPLC를 사용하여 멸치액젓에서 carbonyl 화합물을 분석하는 방법을 확립하고 시판하는 멸치액젓을 시료로 하여 carbonyl 화합물을 2,4-DNPH 유도체로 만들고 hexane으로 추출한 후 HPLC로 분리, 정량하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1) 재료

시판 멸치액젓 5종을 시료로 사용하였다. 그중 2종은 83년 11월 도매상에서 구입한 것이고 3종은 84년 7월 시장에서 소량 비닐 포장되어 판매되는 것을 구입한 것이다.

### 2) 시료 제조

멸치액젓 10 ml를 50 ml 원침관에 취하고 0.4% 2,4-DNPH/2N HCl 5 ml를 가한 후 magnetic stirrer로 20분간 저었다. 여기에 hexane을 가하고 다시 저어준 후 5000 rpm에서 4분간 원침하여 hexane층을 취하는 것을 5회 반복하여 hexane층을 수집하였다. sodium sulfate anhydrous로 수집한 hexane의 수분을 제거한 후 25 ml volumetric flask로 정용하였다. 이 hexane 추출액을 type FH, pore size 0.5  $\mu$ m인 HPLC시료용 filter를 통과시킨 다음 직접 HPLC 주입시료로 사용하였다.

### 3) Carbonyl 화합물의 분석

Waters의 M45 solvent delivery system, U6K injector, 440 absorbance detector를 사용하여 254nm에서 흡광도를 측정하였다. a.u.f.s.는 0.1로 하였고, 특별한 경우 - 시료 C의 pyruvic acid의 양을 측정할 때 - 1.0으로 하였다. Column은 Waters의  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>, 30 cm를 사용하고 전개 용매는 HPLC용 MeOH과 H<sub>2</sub>O를 각각 type FH, pore size 0.5  $\mu$ m와 type HA, 0.45  $\mu$ m filter를 사용하여 HPLC용 여과 장치로 걸른 후 80% MeOH로 만들었다. 이 용매를 30분간 sonicator로 sonification한 후 flow rate를 1 ml/min로 하였다.

정성분석은 표준물질들로 2,4-DNPH 유도체를 형성시켜 위의 조건의 HPLC에 의해 얻어진 chromatogram의 retention time과 비교한 후 다시 internal standard로 peak의 거름을 확인하였다.

Carbonyl 화합물의 정량분석은 표준물질로 얻어진 chromatogram에서 peak height로 calibration curve를 만든 후 그것에 의해 계산하였다.

## 결과 및 고찰

멸치액젓에 형성시킨 2,4-DNPH 유도체의 hexane 추출분으로 얻은 HPLC chromatogram은 Fig. 1과

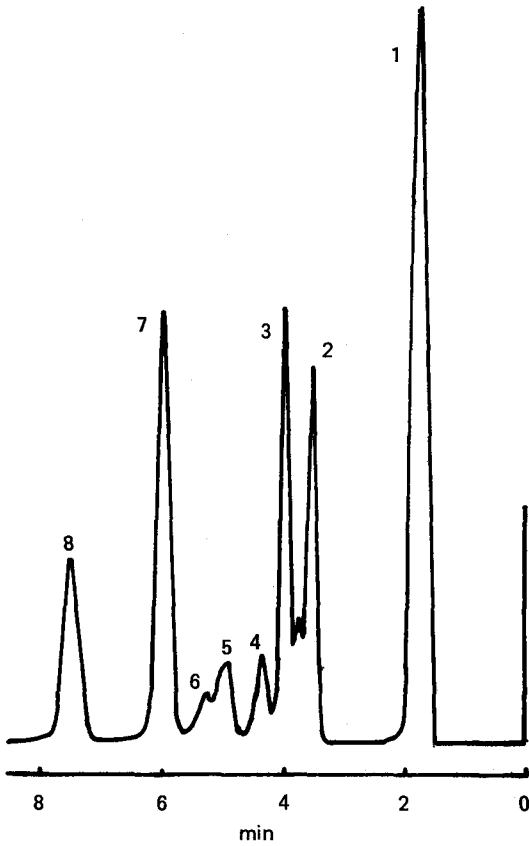


Fig. 1. The typical chromatogram of the extract of myulchichuts.

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| 1. pyruvic acid | 2. unidentified |
| 3. 2, 4 - DNPH  | 4. formaldehyde |
| 5. acetaldehyde | 6. unidentified |
| 7. acetone      | 8. butanone     |

같다.

표준물질로 2, 4-DNPH 유도체를 형성시켜 얻은 chromatogram 과 비교하여 동정해 본 결과 모든 시료에서 1 : pyruvic acid, 3 : 2, 4-DNPH, 4 : formaldehyde, 5 : acetaldehyde, 7 : acetone, 8 : butanone 이 확인되었고 2와 6은 표준물질을 구할 수 없어 확인하지 못하였다. Batanone 이후로는 peak 가 나타나지 않았고, 재래식 간장의 특유한 냄새물질로 알려진 butyraldehyde 는 시료중에는 없었다. 현재 시판되는 멸치액젓의 carbonyl 화합물 구성은 비교적 간단하며 저분자량의 화합물들로 구성되어 있음을 볼 수 있다.

Day<sup>3)</sup>는 낙농제품의 발효에서 미생물의 종류에 따라 carbonyl 화합물의 조성이 달라짐을 보고하였고, Sandine 등<sup>4)</sup>은 유제품에서 diacetyl 과 acetaldehyde 의 비율이 3 : 1보다 떨어지면 green flavor 가 난다고 하였

다. Schultz 등<sup>14)</sup>에 의하면 생선의 carbonyl 화합물로 malonaldehyde, formaldehyde, pyruvic acid 등이 존재한다고 하였고 haddock에서는 acetaldehyde, diacetyl, hydroxy carbonyl 화합물을, 냉장 haddock에서는 acetaldehyde, methyl ethyl ketone 을 확인할 수 있었으며, 조리한 herring에서는 주로 acetaldehyde, acetoin, isobutylaldehyde, 2-methylbutylaldehyde 를 발견하였다는 보고가 있다. Borgstrom<sup>15)</sup>은 인도지나에서 담그는 nuoc-mam 의 맛 성분으로 methyl ketones 가 상당량 함유되어 있고 diacetyl, acetoin 은 발견할 수 없었다고 하였다.

본 실험에서 멸치액젓에서는 pyruvic acid, formaldehyde, acetaldehyde, acetone, butanone 이 확인되었고 diacetyl 과 acetoin 이 있는지는 표준물질을 구하지 못하여 확인하지 못하였다.

Reindl 과 Stan<sup>11)</sup>은 pork liver 를 -28℃로 1주간 저장한 것에서 C<sub>6</sub>까지의 carbonyl 화합물을 확인할 수 있었고, -8℃에서 6개월 저장한 것에서는 C<sub>6</sub> 이상의 다불포화 carbonyl 화합물들의 peak 들이 복잡하게 형성된 것을 보고하면서 지방산의 산화에 기인하는 carbonyl 화합물을 분리, 동정하는데 좋은 방법으로 2, 4-DNPH 유도체의 HPLC 사용을 권하였다.

본 실험에서는 80% MeOH 을 전개용매로 사용했을 때 peak 2, 3과 4, 5와 6이 겹쳐지기는 하였으나 8분안에 분리 확인할 수 있었다.

Day<sup>8)</sup>는 2, 4-DNPH 유도체로는 정량적인 분석을 할 수 없지만 aqueous 상태의 carbonyl 화합물을 추출하는 데에는 이 방법외에 더 좋은 방법은 없다고 하였다. 그러나 Selim<sup>10)</sup>은 propionaldehyde 의 2,4-DNPH 유도체의 침전을 여과하여 씻어 사용하는 방법과 유기용매로 분배추출하는 방법을 비교하였는데, 시료가 미량인 경우 침전형성이 어렵고 2, 4-DNPH 유도체의 형성은 가역반응이어서 분배에 의한 추출은 형성된 2, 4-DNPH 유도체가 유기용매 층으로 옮겨지면서 반응의 완결이 빨라지고 완전한 추출이 20분으로 가능하다고 하였다. 종래의 방법인 침전물을 형성시켜 여과하는 방법은 15시간동안 침전시켜도 70%만이 회수되었다고 한다.

본 실험에서 침전을 형성시켜 여과하는 방법을 사용한 결과 기벽에 부착된 침전을 깨끗이 회수할 수 없었고, 여과하여 2N HCl 과 H<sub>2</sub>O 로 씻어주는 과정에서 pyruvic acid 가 씻겨짐을 관찰할 수 있었다. 여지를 건조시킨 후 여지채 용매에 담구어 용출시켜 HPLC 에 사용한 결과 base line 이 불안정하고 조그만 peak 들이

Table 1. 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives' values determined repetitively by the proposed method

Species	Experiment 1	Experiment 2
Pyruvic acid	6.59 ± 0.26 <sup>a</sup>	6.89 ± 0.24
Acetaldehyde	0.72 ± 0.01	0.70 ± 0.01
Acetone	3.81 ± 0.03	5.32 ± 0.04
Butanone	1.55 ± 0.02	1.49 ± 0.02

a: mean ± SE (peak height, cm)  
 experiment 1 : n = 14, experiment 2 : n = 13.

Table 2. Regression equations and the values of coefficient of determination for 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of carbonyl compounds

Species	Regression equation	Coefficient of determination r <sup>2</sup>
Pyruvic acid	y = 0.4744 ± 0.1156x	0.995
Formaldehyde	y = -0.0716 ± 0.1049x	0.997
Acetaldehyde	y = -0.0128 ± 0.0595x	0.999
Acetone	y = 0.0644 ± 0.0813x	0.999
Butanone	y = 0.0311 ± 0.0536x	0.997

y: Peak heights, cm  
 x: Amounts of their 2,4-DNPH derivatives, ng.

복잡하게 나타나서 용액에 직접 형성된 2,4-DNPH 유도체를 직접 hexane으로 추출하는 방법을 택하였다.

두 종류의 시료로 각각 14회, 13회 반복 실험하여 실험에 사용한 방법의 재현성을 살핀 결과가 Table 1에 제시되었다. Standard error의 수치값이 작으므로 이 방법의 재현성이 높은 것을 알 수 있다.

각 carbonyl 화합물의 표준물질로 2,4-DNPH 유도

체를 만들고, 주입양을 변화시켜 얻은 chromatogram의 peak height들로 구한 calibration curve는 Table 2와 같다. r<sup>2</sup>의 값들이 1보다 작으나 0.995보다 큰 peak height를 사용하여 정량분석이 가능함을 보여준다.

본 실험은 각 시료를 3회 실험하여 얻은 수치를 평균하여 사용하였다. 각 것의 carbonyl 화합물들의 함량은 Table 3과 같다. 여러 carbonyl 화합물의 함량을 비교해 보면 다섯 시료가 모두 pyruvic acid, formaldehyde, acetaldehyde, acetone, butanone을 함유하고 있으나 그 양은 크게 차이를 알 수 있었다. 시료 C는 pyruvic acid의 함량이 특히 많았다.

Schultz 등<sup>14)</sup>에 의하면 생선의 냉장 저장중 carbonyl 화합물의 함량 증가가 있었으며 생선의 종류에 따라 각각 다른 화합물이 비례 증가하였다는 실험과, 생선의 10일간 냉장중 acetaldehyde의 증가를 볼 수 없었던 실험이 있었다. 송등<sup>15)</sup>의 실험 결과로는 멸치 것갈의 숙성중 초기 15일간에 총 carbonyl 화합물의 양이 급격히 증가하는 경향이 있음을 보고하였다. 본 실험에서 시료로 사용한 멸치액젓이 얼마동안 숙성된 것인지 확인할 수 없지만 carbonyl 화합물들의 함량이 서로 다른 것은 재료인 멸치가 다르고 발효 환경이 서로 다르기 때문이라고 할 수 있을 것이다.

## 결 론

멸치액젓의 carbonyl 화합물을 HPLC를 사용하여 분석하는 방법을 확립하고, 멸치액젓의 carbonyl 화합물의 종류와 함량을 확인하기 위하여 5종의 시판 멸치액젓을 시료로 하여 실험하였다.

실험방법은 다음과 같이 하였다. 멸치액젓에 직접 0.4% 2,4-DNPH/2N HCl을 첨가하여 carbonyl 화

Table 3. The contents of carbonyl compounds in various filtrated myulchichuts

Sample	Pyruvic acid	Formaldehyde	Acetaldehyde	Acetone	Butanone
A	933.875 ± 35.840	15.955 ± 1.047	45.851 ± 2.263	273.540 ± 44.569	127.867 ± 8.980
B	54.117 ± 9.295	4.924 ± 0.297	30.655 ± 1.064	42.432 ± 6.577	63.368 ± 3.844
C	4.610 × 10 <sup>5</sup>	7.261 ± 0.521	60.011 ± 2.453	12.925 ± 2.896	22.260 ± 0.804
D	263.944 ± 22.171	60.356 ± 2.516	69.255 ± 8.218	152.009 ± 2.809	124.605 ± 2.883
E	192.525 ± 10.553	5.741 ± 0.146	65.329 ± 1.338	353.574 ± 8.969	101.748 ± 1.375

unit : µg/100 ml  
 a : mean ± SE.

합물의 2,4-DNPH 유도체를 만들어 hexane 으로 추출하고 정용하여 여과한 후 C<sub>18</sub> column 을 사용한 HPLC 로 정성과 정량을 하였다.

이 방법으로 얻어진 결과들은 재현성이 높았고 HPLC chromatogram 의 peak height 로 구한 calibration curve 는 peak height 와 함량과의 coefficient of determination 이 높았다.

멸치액젓의 carbonyl 화합물 구성은 7종이나 그중 5종을 확인할 수 있었다. 확인된 종류는 pyruvic acid, formaldehyde, acetaldehyde, acetone 및 butanone 이었으며 각 carbonyl 화합물의 함량은 멸치액젓 종류에 따라 크게 달랐다.

### REFERENCES

- 1) Schultz, H.W., Day, E.A. and Sinnhuber, R.D.: *Symposium on Foods - Lipids and Their Oxidation*. 173-189, The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Conn., 1962.
- 2) Wick, E.L.: *Chemical and sensory aspects of the identification of odor constituents in foods. - A review -*. Food Tech. 19(5): 827-886, 1965.
- 3) Day, E.A. and Anderson, D.F.: *G.C. and M.S. identification of natural components of the aroma fraction of blue cheese*. J. Agr. Food Chem. 13(1): 2-4, 1965
- 4) Sandine, W.E. and Elliker, P.R.: *Microbially induced flavor and fermented foods flavor in fermented dairy products*. J. Agr. Food Chem. 18(4): 557-562, 1970.
- 5) Rhoades, J.W. and Millar, J.D.: *G.C. method for comparative analysis of fruit flavors*. J. Agr. Food Chem. 13(1): 5-9, 1965.
- 6) Hiatt, M.H.: *Determination of volatile organic compounds in fish samples by vacuum distillation and fused silica capillary G.C./M.S.* Anal. Chem. 55(3): 505-516, 1983.
- 7) Soukup, R.J., Scarpellino, R.J. and Danielczik, E.: *G.C. separation of 2,4-DNPHydrazone derivatives of carbonyl compounds*. Anal. Chem. 36(12): 2255-2256, 1964.
- 8) Day, E.A.: *Some properties of carbonyl compounds encountered in the flavor isolates of dairy products - A review -*. Food Tech. 19: 1585-1590, 1965.
- 9) Hoshika, Y. and Takada, Y.: *G.C. separation of carbonyl compounds as their 2,4-DNPHydrazones using glass capillary columns*. J. Chromatogr. 120: 379-389, 1976.
- 10) Selim, S.: *Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2,4-DNPHydrazones by HPLC*. J. Chromatogr. 136: 271-277, 1977.
- 11) Reindl, B. and Stan, H.J.: *Separation of saturated, mono-unsaturated and di-unsaturated aldehydes as 2,4-DNPHydrazones using HPLC at increased temperature*. J. Chromatogr. 235: 481-488, 1982.
- 12) 장지현: 한국 간장증의 유기산에 대하여. 농화학회지 8: 1-9, 1967.
- 13) 윤진숙·이혜수: 김치의 휘발성 향미성분에 관한 연구. 한국식품과학회지 9(2): 116-122, 1977.
- 14) Schultz, H.W., Day, E.A. and Sinnhuber, R.D.: *Symposium on Foods - The chemistry and physiology of flavors*. 267-295, The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Conn., 1962.
- 15) Borgstrom, G.: *Fish as Foods III*. 233, Academic Press, New York, 1965.
- 16) 송영옥·변대석·변재형: 멸치 젓갈 숙성중 지질의 산화와 단백질의 분해. 한국영양식량학회지 11(1): 1-6, 1982.