

산증류-HPLC법과 모니어윌리엄스변법을 이용한 절임류종의 이산화황 함량 분석

정소영* · 김일영 · 김성단 · 장미라 · 장민수 · 한기영
서울특별시보건환경연구원 첨가물검사팀

Determination of Sulfur Dioxide in Pickles by Acid Distillation-HPLC Method and Monnier Williams Modified Method

So-Young Jung*, Il-Young Kim, Sung-Dan Kim, Mi-Ra Jang,
Min-Su Chang and Ki-Young Han

Food Additives Team, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

To assess accurate methods for measuring sulfur dioxide residue in pickles, the acid distillation HPLC-UV method and Monnier Williams modified method were examined. By the acid distillation HPLC-UV method, sulfites released from pickles by acid distillation were absorbed in 1% triethanolamine solution and detected as sulfite ion by HPLC with UV monitoring at 240 nm. An anion exchange column was employed with 1.8 mM Na₂CO₃-1.7 mM NaHCO₃ solution as a mobile phase. 84.0~91.7% of sulfite added to pickled radish were recovered. Total sulfite levels from 48 kinds of pickles analyzed by acid distillation HPLC-UV was compared with those analyzed by the Monnier Williams modified method. The Monnier Williams modified method showed higher levels of sulfur dioxide than the acid distillation HPLC-UV method due to the presence of volatile acids in pickles. The concentration of sulfur dioxide was in the range of N.D~173.05 ppm in pickled radish and over 30ppm of sulfur dioxide from 3 samples by the acid distillation-HPLC-UV method.

Key words: sulfur dioxide, pickles, triethanolamine, HPLC-UV detector, anion exchange column

서 론

아황산염류는 환원력이 강한 아황산을 발생하며, 황산으로 산화되는 과정에서 착색물질을 환원하는 강한 표백작용을 나타낸다. 또 아황산은 식품의 갈변에 관여하는 폴리페놀 옥시다아제의 작용을 강하게 저지하고 미생물의 번식을 억제하여 갈변방지, 방부와 발효억제의 목적으로도 사용되고 있으며^(1,2), 시중에 유통되고 있는 단무지, 절임류에 표백이나 산화방지를 위하여 첨가되고 있다. 아황산염류 같은 환원표백제는 표백제가 잔류하는 동안에는 효과가 있으나 표백제가 없어지면 산소에 의해 다시 산화되어 착색되므로 과잉의 표백제를 사용하는 경우가 있다. 아황산염은 천식과 알레르기, 위장장애등을 일으키는 물질로 알려져 있어서⁽³⁾ 우리나라에서도 식품첨가물로 사용함에 있어 그 잔류량을 규제하고 있

다. 아황산염류 정량시험방법은 Monnier-Williams변법, 개량랭킹법, 산증류-이온크로마토그래피 등이 많이 사용되고 있으며⁽⁴⁻¹⁰⁾, 최근에는 HPLC-UV system으로 분석한 방법도 보고되고 있다⁽¹¹⁾.

현재 식품공전의 아황산염류 분석방법인 Monnier-Williams 변법은 산증류과정을 거쳐 발생하는 이산화황을 과산화수소 수용액에 H₂SO₄ 형태로 포집하여 NaOH로 적정하는 방법으로, 별도의 기기가 필요없는 장점이 있으나 검출한계가 높고 아세트산이나 휘발성지방산등을 함유한 식품에 적용하는 데는 오차가 큰 것으로 알려져 있다^(12,13). Matsumoto 등⁽¹¹⁾이 보고한 HPLC-UV system을 이용한 분석법은 Sulfite이온이 UV를 흡수하는 성질을 이용한 것으로 산증류 후 발생한 이산화황을 1% triethanolamine 용액으로 포집한 후 1.8 mmol Na₂CO₃와 1.7 mmol NaHCO₃ 수용액을 이동상으로 하여 음이온 칼럼으로 분리하고 UV-240 nm에서 정량하는 방법이다. 이 방법은 이온크로마토그래프를 보유하고 있지 않은 경우 아황산염의 기기분석법으로 기존의 HPLC를 이용할 수 있다는 장점이 있고 아세트산의 영향을 받지 않으므로 식초를 함유하고 있는 절임류의 아황산염 분석방법으로 적당할 것으로 생각한다.

시중에 유통되고 있는 절임류 중 특히 단무지에서는 첨가

*Corresponding author : So-Young Jung, Food Additives Team, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment 202-3, Yangjae-dong, Seocho-Gu, Seoul 137-734, Korea
Tel: 82-2-570-3232
Fax: 82-2-570-3234
E-mail: syjung@hanmail.net

물로 아황산염이 표시되어 있는 제품도 많고, 또 실제로는 표백이나 산화방지의 목적으로 사용했으나 표기를 하지 않은 경우도 있다. 따라서 본 실험에서는 Monnier-Williams변법과 산 중류 후 HPLC-UV system을 이용한 분석법으로 절임류중 단무지를 중심으로 아황산염의 함유량을 조사하였다. 이로써 두 방법의 적용가능여부와 그 오차를 알아보고자 하며, 시중에 유통되고 있는 절임류에서 아황산염의 잔류량 실태를 파악하여 안전한 사용의 기초를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

재료

2002년 1월부터 2002년 11월까지 서울시내 재래시장과 대형마트에서 유통되는 단무지 43종, 절임류 5종을 대상으로 실험하였다.

표준용액조제

아황산수소나트륨(NaHSO_3) (Katayama Chemical, Japan) 약 0.5 g을 정확히 취해(wg) 물 100 mL에 녹이고 그 중 10 mL를 취해서 0.05 M Iodine 용액(Wako Pure Chemical Industries, Japan) 15 mL와 염산 2 mL를 가해서 0.1 M sodium thiosulfate(Wako Pure Chemical Industries, Japan)(Factor = f)로 적정하였다. 이때 소비된 sodium thiosulfate양을 a mL, 공시험에서 소비된 양을 b mL로 하여 아래식으로 계산하여 아황산수소나트륨중 SO_2 양을 F로 구했다.

$$F = 3.2 \times f \times (b - a) \times 10 / w / 1000$$

다음, 아황산수소나트륨 100/F mL을 100 mL volumetric flask에 넣고 1% triethanolamine(TEA)(Aldrich Chemical Company Inc., Germany)용액으로 녹여서 1000 ppm 표준용액으로 사용하였다. 이 용액을 1% TEA용액으로 희석하여 5, 50, 100 ppm 표준용액으로 만들어서 검량선을 작성하였다.

Monnier-Williams변법에 의한 아황산염 분석

절임류 시료를 포장단위 전체를 믹서기로 균질화하여 50 g을 취해서 식품공전 제 7. 일반시험법 20. 아황산, 차아황산 및 그 염류시험법 중 2. 정량시험 (1) Monnier-Williams변법⁽⁴⁾에 따라 실험하였다.

산중류-HPLC-UV에 의한 아황산염 분석

산중류하는 과정은 Monnier-Williams변법과 동일하게 하였다. 단, 가스유도관(bubbler)으로 발생하는 이산화황가스를 포집하는 수기에 1% triethanolamine 용액 10 mL를 넣어서 포집한 후 50 μL 를 바로 주입하였고 농도가 검량선의 범위를

벗어나는 시료의 경우는 시료의 농도가 검량선의 범위에 포함되도록 1% triethanolamine으로 다시 희석하여 HPLC로 분석하였다. HPLC의 이동상은 sodium carbonate(TEDIA Company Inc., USA)와 sodium hydrogen carbonate(Wako Pure Chemical Industries, Japan)로 조제하였다. Acetic acid는 Yakuri Pure Chemicals(Japan)의 특급시약을 사용하였다.

HPLC는 M930 solvent delivery pump와 M720 UV-Absorbance detector, Rheodyne injector를 부착한 영린의 HPLC system을 사용하였다. Column은 Dionex의 AS9-SC(4×250 mm)를 사용하였고, 이동상으로는 1.8 mM Na_2CO_3 와 1.7 mM NaHCO_3 용액을 증류수로 조제하여 1.5 mL/min의 유속으로 측정하였다. Detector는 UV 240 nm에서 분석하였다.

회수율측정

회수율검사를 위해서는 시료 50 g에 각각 2 ppm, 20 ppm, 100 ppm이 되도록 표준용액을 첨가하여 각 방법으로 실험하였고, Monnier-Williams변법의 경우는 검출한계가 10 ppm인 점을 감안하여 20 ppm과 100 ppm 농도에서만 회수율실험을 하였다. 표준용액을 첨가한 시료는 각 방법으로 실험하여 이산화황이 검출되지 않는 것을 사용하였고, Monnier-Williams변법의 경우는 표준용액을 첨가하지 않았을때의 실험값을 공시험값으로 하여 보정하였다. 산중류-HPLC-UV법에서는 이산화황이 포집된 1% triethanolamine 용액 50 μL 를 바로 주입하였고 농도가 높은 100 ppm의 경우는 50 mL volumetric flask에 1% triethanolamine 용액으로 희석하여 주입하였다.

결과 및 고찰

실험방법에 따른 회수율

두 가지 방법에 따라 이산화황이 검출되지 않은 단무지에 표준용액을 첨가하여 회수율을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 이 결과를 보면 산중류-HPLC법에서의 회수율은 2 ppm을 첨가했을 때 84.0%, 20 ppm을 첨가했을 때 87.0%, 100 ppm을 첨가했을때는 91.7%로서 저농도일 때 보다 고농도일 때의 회수율이 더 좋았고, 표준편차는 0.5~5.6%로서 역시 크지 않았다. Monnier-Williams변법에서의 회수율은 20 ppm을 첨가했을 때 84.5%, 100 ppm을 첨가했을 때 94.0%로 양호한 결과를 얻었다. 그러나 두 농도에서 모두 표준편차가 매우 큰 것을 알 수 있었고 이 회수율은 표준용액을 첨가하기 이전의 공시험값을 보정해 준 값으로 HPLC-UV법에서 아황산염이 검출되지 않은 단무지를 선택하여 실험하였으나 공시험값 자체가 편차가 심해 정확한 회수율을 구하기가 어려웠다. 이런 큰 편차는 이전의 다른 연구들^(2,13)에서는 나타나지 않았던 것으로, 표준용액을 첨가한 시료인 단무

Table 1. Recoveries¹⁾ of sulfur dioxide added to pickled radish

| Added SO_2 (ppm) | HPLC-UV method | | Monnier-Williams modified method | |
|---------------------------|---------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|
| | Found SO_2 (ppm) | Recovery (%) | Found SO_2 (ppm) | Recovery (%) |
| 2 | 1.7±0.1 | 84.0±3.0 | -- | -- |
| 20 | 17.4±1.1 | 87.0±5.6 | 16.9±4.4 | 84.5±22.0 |
| 100 | 91.7±0.5 | 91.7±0.5 | 94.0±14.2 | 94.0±14.2 |

¹⁾Data are expressed as mean±S.D. (n=5).

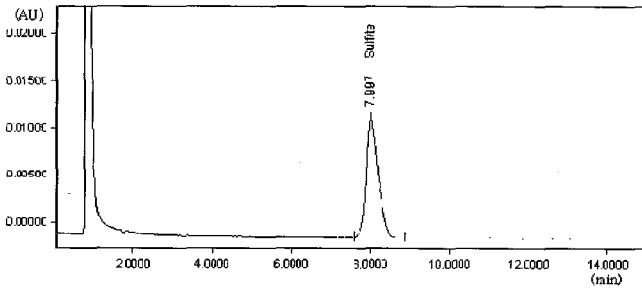


Fig. 1. Chromatogram of 50 ppm sulfite standard (As SO₂).

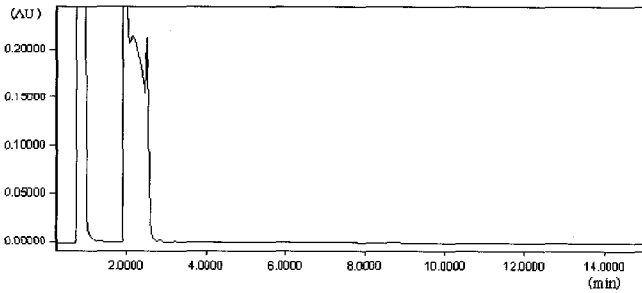


Fig. 2. Chromatogram of pickled radish (Blank).

지가 휘발성 산인 아세트산을 함유하고 있고 무자체에도 휘발성 황성분을 함유하고 있는 데서 기인된 것으로 생각되며 이들의 휘발이 재현성을 떨어뜨리는 것으로 생각된다.

HPLC-UV법에서 분석한 표준용액과 blank로 사용한 단무지의 chromatogram을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 절임류에서의 sulfite peak는 8분대에 다른 성분의 방해없이 완전히 분리할 수 있었다.

시중 유통 절임류에서의 이산화황 함량조사

시중에 유통되고 있는 단무지 43건과 그 외 절임류 5건에 대해서 두가지 방법으로 이산화황 함량을 조사해 보았다. 그 결과는 Table 2과 같다. HPLC법에서는 표준시료와 blank를 반복주입하여 검출한계를 계산한 결과 0.3 ppm 이하는 불검출로 표시하였다. 단무지와 기타 절임류에서의 이산화황 평균농도는 산증류-HPLC-UV법과 Monnier-Williams변법으로 분석했을 때 각각 11.65 ppm과 25.12 ppm으로 Monnier-Williams변법의 경우가 더 높게 나타났다. 이는 김⁽⁵⁾ 등의 연구 결과에서 보면 마늘에서 자연유래되는 이산화황 함량이 ion chromatography에서는 13.08~17.08 ppm 검출되는 반면 Monnier-Williams변법에서는 다른 휘발성 황성분의 영향으로 24.42~53.33 ppm 수준으로 검출되었고, Kim⁽⁶⁾의 연구에서는 ion exclusion chromatography에서 이산화황이 검출되지 않은 시료가 Monnier-Williams변법에서는 과일이나 채소에 들어있는 erythorbic acid가 영향을 미쳐 32 ppm 검출되는 결과와 같은 false positive response가 나타나는 것으로 보인다. 이 false positive response는 회수율실험에서 재현성이 떨어지는 원인이기도 하고 이중 아세트산의 영향에 대해서는 뒤에서 다시 언급하였다.

HPLC-UV법에서 이산화황이 검출되지 않은 단무지를 Monnier-Williams변법으로 실험해 보았을때는 3.20 ppm에서 최대

Table 2. Comparison of sulfur dioxide determined by HPLC-UV method and Monnier-Williams modified method

| No | HPLC-UV method (ppm) | Monnier-Williams modified method (ppm) |
|------------------|----------------------|----------------------------------------|
| 1 | ND ¹⁾ | 3.20 |
| 2 | ND | 3.20 |
| 3 | ND | 3.20 |
| 4 | ND | 3.84 |
| 5* ²⁾ | ND | 5.12 |
| 6 | ND | 5.12 |
| 7* | ND | 6.40 |
| 8 | ND | 6.40 |
| 9 | ND | 6.40 |
| 10 | ND | 6.72 |
| 11 | ND | 6.72 |
| 12 | ND | 8.32 |
| 13 | ND | 9.60 |
| 14 | ND | 9.60 |
| 15 | ND | 10.24 |
| 16* | ND | 11.52 |
| 17 | ND | 14.08 |
| 18 | ND | 22.40 |
| 19* | 0.48 | 7.68 |
| 20* | 0.65 | 12.80 |
| 21* | 0.83 | 5.76 |
| Pickled radish | | |
| 22 | 0.98 | 4.48 |
| 23* | 1.62 | 7.68 |
| 24* | 1.65 | 11.52 |
| 25 | 2.96 | 24.96 |
| 26* | 3.94 | 5.76 |
| 27* | 4.02 | 11.52 |
| 28* | 4.84 | 18.56 |
| 29* | 6.67 | 28.80 |
| 30* | 6.97 | 20.48 |
| 31* | 7.69 | 13.44 |
| 32 | 9.87 | 15.36 |
| 33 | 10.13 | 14.72 |
| 34 | 12.05 | 13.44 |
| 35 | 12.91 | 52.48 |
| 36* | 13.29 | 49.28 |
| 37 | 14.68 | 44.80 |
| 38 | 14.94 | 37.76 |
| 39 | 15.63 | 46.72 |
| 40* | 18.78 | 48.64 |
| 41 | 73.15 | 75.52 |
| 42 | 77.55 | 80.00 |
| 43 | 173.05 | 186.24 |
| 1 | ND | 3.20 |
| 2 | ND | 4.48 |
| Other pickles | | |
| 3 | ND | 5.76 |
| 4 | ND | 11.52 |
| 5 | ND | 16.64 |
| Mean | 11.65 | 25.12 |

¹⁾ND: Not detected.

²⁾*: The product with a label indicating sulfite addition.

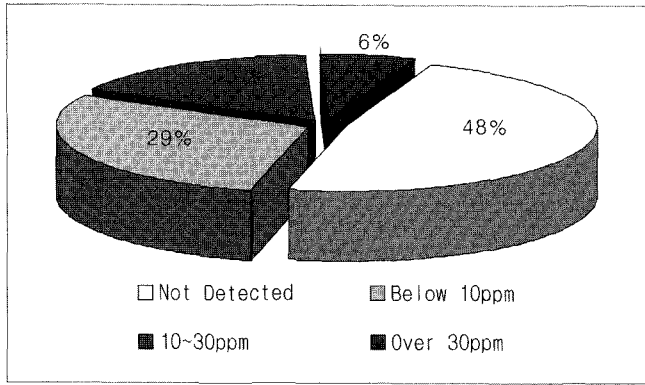


Fig. 3. Distribution of sulfur dioxide concentration in pickles by HPLC-UV method.

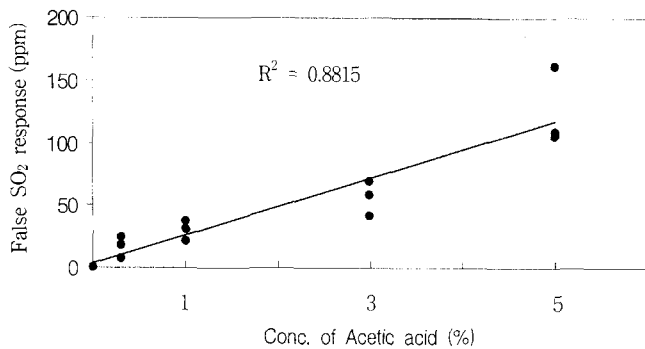


Fig. 4. False positive response of sulfur dioxide by acetic acid.

22.40 ppm으로 이 방법에서 검출한계로 인정하는 10 ppm을 초과하는 제품은 8건이었고, 10~30 ppm의 제품에서는 실험 방법에 따른 농도가 크게 4배까지 차이가 나는 것을 볼 수 있었다. 아황산염류의 잔류량 기준은 이산화황으로서 박고지, 당밀 및 물엿, 과실주, 건조과실류, 설탕등에 0.02~5.0 g/kg, 참깨, 두류, 서류, 과실류, 채소류 및 그 단순가공품을 제외한 기타식품에는 0.03 g/kg, 양조식초에는 0.17 g/kg으로 설정되어 있다⁽¹⁵⁾. 이 두 실험방법 결과에 대한 상관성을 알아보면 전체 결과를 대상으로 한 $R^2=0.9031$ 이었는데, Monnier-Williams변법으로 실험한 결과를 바탕으로 검출한계인 10 ppm 이상이면서 50 ppm 이하의 시료 22건에 대한 상관성은 $R^2=0.5995$ 로 매우 낮았고 50 ppm 이상 검출되는 시료 4건에 대한 상관계수는 $R^2=0.9340$ 이었다. 따라서 절임류를 포함한 기타식품에서 이산화황의 기준이 30 ppm인 점을 감안하면 Monnier-Williams변법만으로는 부적합제품을 판정하는데 한계가 있다고 생각한다.

HPLC-UV법으로 검사한 절임류의 아황산염 농도분포를 Fig. 3에 나타내었다. 단무지에서는 불검출이 23건, 10 ppm 이하가 14건, 그리고 기타가공품의 기준인 30 ppm을 초과하는 제품은 3건이었다. 부적합제품인 3건의 잔류되어 있는 이산화황의 농도는 73.15, 77.55, 173.05 ppm으로 기준의 5.8배 수준까지 검출되어 단무지에 사용되는 농도가 매우 높음을 알 수 있었고, 안전한 사용을 위한 규제가 필요하리라 본다. 한편 기타 절임류에서는 5건 모두 이산화황이 검출되지 않

았다. 아황산염 사용여부의 표시사항을 살펴보면 단무지에 첨가물로 사용했음을 표시한 제품은 모두 16건이었는데 이들의 잔류농도는 불검출~18.86 ppm으로 다른 제품보다 그다지 높다고 할 수 없었고, 부적합 제품으로 볼 수 있는 3건은 모두 아황산염의 사용여부가 포장지에 표시되어 있지 않았다. 이로 보아 시중에 유통되고 있는 단무지의 아황산염의 사용여부는 제대로 표기되어 있지 않아 소비자의 혼란을 초래할 수 있다고 보며, 의무적으로 표시하도록 하는 것이 바람직하다고 생각된다.

아세트산이 Monnier-Williams변법에서 미치는 영향

실험대상 시료의 아세트산 농도를 3종류의 단무지에서 실험해본 결과 0.34~0.42%였다. 위에서도 언급한대로 절임류에 함유된 아세트산은 Monnier-Williams변법에 의한 이산화황의 분석시 낮은 재현성과 false positive response의 원인이 되는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 아세트산 용액을 0, 0.3, 1, 3, 5%가 되게 증류수로 희석하여 만든후 50 mL를 취해 절임류와 동일한 방법으로 실험하였다. Fig. 4에 그 결과를 나타내었다. 이를 살펴보면 0.3% 아세트산용액을 Monnier-Williams변법으로 실험했을때 적정에 소비된 0.01 N NaOH용액의 소비량을 이산화황으로 환산하면 7.68~24.96 ppm, 1% 용액은 21.12~31.36 ppm이었고, 3% 용액은 41.6~69.12 ppm, 5% 용액에서는 106.24~161.92 ppm이었다. 이는 상관계수 0.8815의 직선성을 가지고 있는 것으로 나타나 아세트산의 농도가 이산화황의 분석에 큰 오차를 가져오는 것을 알 수 있었고, Fig. 4에서 보는바와 같이 반복실험에서 재현성이 많이 떨어져 실험의 편차가 심했다. 이로써 식초가 함유되어 있는 절임류의 이산화황을 Monnier-Williams변법으로 정량할 때 나타나는 오차나 편차는 아세트산이 중요한 원인임을 알 수 있었다. 따라서 식초가 함유된 절임류에서의 아황산염 함량분석은 Monnier-Williams변법만으로는 정량에 오차가 있을 수 있으므로 휘발성산의 영향을 받지 않는 HPLC-UV법이나 ion chromatography를 적용하는 것이 더 적절하리라 본다.

요 약

절임류에 함유된 이산화황함량의 정확한 분석을 위해 산증류후 HPLC-UV detector를 이용한 방법과 Monnier-Williams변법으로 실험해보았다. 산증류-HPLC-UV법은 절임류중의 아황산염을 산증류 시킨 후 발생하는 이산화황을 1% triethanolamine용액에 흡수시켜 이를 UV 240 nm에서 정량하는 것으로서, 고정상은 음이온 교환컬럼을, 이동상으로는 1.8 mM Na₂CO₃와 1.7 mM NaHCO₃용액을 사용하였다. 이 방법으로 단무지에 아황산염을 첨가하여 실험 한 결과 84.0~91.7%의 회수율을 얻었다. 시중에 유통되는 48종의 절임류에 대해 모니어윌리엄스변법과 산증류-HPLC-UV법을 이용하여 이산화황 함량을 조사해본 결과, 산증류-HPLC-UV법에 비해 모니어윌리엄스변법에서 휘발성 산으로 인해 높은 농도를 나타내었다. 산증류-HPLC-UV법으로 분석한 절임류의 이산화황 농도는 불검출~173.05 ppm이었고, 기준인 30 ppm을 초과하는 제품은 3건이었다.

문 헌

1. Gi, S.G. Food Preservatives, pp. 664-669. Food Journal, Seoul, Korea (2000)
2. Roberts, A.G. and Mcweeny, D.J. The uses of sulphur dioxide in the food industry. J. Food Technol. 7: 221-238 (1972)
3. FAO/WHO. Guide to the Safe Use of Food Additives. 2nd series (1997)
4. James, F., Lawrence, R., Chadha, K. and Menard, C. Comparison of three liquid chromatographic methods with FDA optimized Monier Williams method for determination of total sulfite in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 77-79 (1990)
5. Kim, H.Y., Lee, Y.J., Hong, K.H., Kwon, Y.K., Ko, H.S., Lee, Y.K. and Lee, C.W. Studies on the contents of naturally occurring of sulfite in foods. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 544-549 (2000)
6. Kim, H.J. Comparison of the ion exclusion chromatographic method with the Monier-Williams method for determination of total sulfite in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72: 266-272 (1989)
7. Kim, M.S., Hwang, K.H. and Kim, M.H., Sulfites monitoring in yu-kwa sampled from market. Report S.I.H.E. 37: 205-208 (2001)
8. Kang, K.J., Oh, G.S., Kim, H.I., Choi, Y.H., Kim, Y.J. and Chung, Y.C. Naturally occurring of sulfur dioxide in medicinal herbs (crude drug materials) and its origin. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 514-520 (2001)
9. Bevery, F. and Donald, C. Sulfite analysis. J. Anal. Purification 2: 62-63 (1987)
10. Kim, H.J. Determination of sulfite in food and beverages by ion exclusion chromatography with electrochemical detection: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 216-222 (1990)
11. Matsumoto, H., Ogawa, H., Suzuki, K., Suzuki, J. and Saito, K. Determination of sulfite residues in foods by using the modified rankine apparatus and HPLC. J. Food Hyg. Soc. Japan. 42: 329-334 (2001)
12. Su, Y.C. Sulphite analysis of food ingredients: false positive responses with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method, Food Addit. Contamin. 12: 153-160 (1995)
13. Shibata, T., Tsuji, S., Ito, Y., Miura, K., Obara, K., Adachi, T., Giga, T., Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Aoki, N., Yamamoto, S., Mizuno, T., Iwaida, M. and Tezuka, Y. Improvement of colorimetric microdetermination of sulfites in various foods by using the modified rankine apparatus. J. Food Hyg. Soc. Japan. 31: 57-66 (1990)
14. KFDA. Food Code. Korean Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2002)
15. KFDA. Food Additives Code. Korean Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2002)

(2003년 7월 11일 접수; 2003년 11월 10일 채택)