

Solid phase microextraction-gas chromatograph/pulsed flame photometric detector(SPME-GC/PFPD)와 static headspace-gas chromatograph/pulsed flame photometric detector(SH-GC/PFPD)를 이용한 황 함유 화합물들의 분석 방법 비교

양지연 · 김영석*
이화여자대학교

Comparison of Solid Phase Microextraction-Gas Chromatograph/Pulsed Flame Photometric Detector (SPME-GC/PFPD) and Static Headspace-Gas Chromatograph/Pulsed Flame Photometric Detector (SH-GC/PFPD) for the Analysis of Sulfur-Containing Compounds

Ji-Yeon Yang and Young-Suk Kim*

Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University

Efficient method was established for analysis of sulfur-containing compounds, including dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophene, allyl mercaptan, 2-methyl-3-furanthiol, and methional. Sulfur-containing compounds were extracted through solid phase microextraction (SPME) or static headspace extraction (SH), and quantified using gas chromatograph equipped with pulsed flame photometric detector. All sulfur compounds, except ally mercaptan, showed higher detection response when dissolved in hexane than in dichloromethane. Linear range was 10^2 - 10^4 . Dimethyl trisulfide showed lowest limit of detection (LOD) value of 15.2 ppt, and methional highest of 70.5 ppb. Highest extraction efficiency for sulfur-containing compounds, particularly polar and small molecular weight compounds, was observed in 75 mm carboxen/polydimethylsiloxane fiber, followed by 65 mm polydimethylsiloxane/divinylbenzene and 100 mm polydimethylsiloxane. Compared to SPME, less sulfur-containing compounds could be analyzed by SH, mainly due to its low extraction efficiency, although lower amount of artifacts were formed during sample preparation.

Key words: sulfur-containing compounds, analysis, pulsed flame photometric detector, solid phase microextraction, static headspace

서 론

황 함유 화합물들은 식품의 다양한 향미 성분들 중에서 가장 중요한 화합물 중 하나이다. 이들은 여러가지 식품에서 다양한 형태로 발견되는데, 일반적으로 열이 가해진 식품에서 헤테로고리 화합물의 형태로 주로 발견된다(1). 특히 빵, 고기, 감자 등을 가열했을 때 disulfides, thiol esters, thiocyanides, hemidithioacetals, sulfur-substituted furans, thiophenes, thiazoles 형태의 황 함유 화합물들이 발견되었다(2). 이들 성분들은 가열시 비효소적 갈변반응인 Maillard 반응 등을 통해서 주로

형성되는 것으로 알려져 있다(3). 이 외에도 황 함유 화합물들은 마늘, 양파, 부추, 파, 양배추 등의 *Allium* 계통에서 그 식품의 특징적인 향기활성 성분으로 작용하는 것으로 보고 되었다(4). 이들 황 함유 화합물들은 일반적으로 높은 휘발성과 낮은 역치값(threshold value)을 가지기 때문에 소량만으로도 식품의 전체적인 향미 특성에 큰 영향을 준다(5). 그러나 황 함유 화합물은 일반적으로 식품에 극미량(ppb-ppt)으로 존재하기 때문에 그 분석이 쉽지 않다. 따라서, 혼합상태의 분석시료에서 이들을 선택적으로 분리해내는 과정이 중요하며, 분리를 통해 분석하고자 하는 특정 화합물들의 상대적인 농도를 높이는 과정이 필요하다. 또한, 황 함유 화합물은 다른 화합물들과 쉽게 반응하고, 열, 빛, 공기 등에 의해서 쉽게 산화되는 특징을 가지고 있다. 그러므로 황 함유 화합물을 분석하기 위해서는 실제로 분석이 행해지는 동안, 이들 황 함유 화합물들이 전혀 다른 물질로 변형되거나 분해되는 일이 일어나 주의를 해야한다(6). 휘발성 황 함유 화합물들을 분석하는 데는 몇 가지 방법이

*Corresponding author: Young-Suk Kim, Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-dong, Sudaemoon-gu, Seoul 120-750, Korea
Tel: 82-2-3277-3091
Fax: 82-2-3277-2862
E-mail: yskim10@ewha.ac.kr

있지만, 가장 많이 사용되는 방법은 기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC)를 이용하는 것이다. GC에 사용되는 검출기는 그 종류에 따라 다양한 특성을 가지고 있는데, Atomic emission detector(AED), sulfur chemiluminescence detector(SCD), flame photometric detector(FPD), pulsed flame photometric detector(PFPD) 등은 황 함유 화합물들에 대해 민감하고 특이적으로 고안된 검출기들이다(7). AED의 원리는 안정된 상태의 원자들이 microwave generator에서 방출되는 에너지에 의해서 들뜬 상태로 바뀌면서 방출되는 에너지를 검출하는 원리에 기초한 것이다(6). SCD는 다양한 황 함유 화합물 분석에 광범위하게 사용되며, 황에 대해 가장 민감하고 특이적으로 반응하는 검출기 중의 하나이다. 유기 황 화합물들의 연소에 의해 생성되는 SO와 오존과의 반응에 의해 들뜬 상태의 SO₂를 형성하며, 형성된 SO₂에서 방출되는 강한 푸른색 chemiluminescence 신호를 SCD가 감지하여 검출한다(8). FPD의 경우에는, 화합물들에 포함된 황(S)이나 인(P)이 불꽃에서 연소되면서 chemiluminescence를 형성하고 FPD가 이를 분광학적으로 감지한다(6). 이에 비해 pulsed flame photometric detector(PFPD)는 다른 검출기에서 연속적인 불꽃을 이용하는 것과 달리, 주기적으로 점화를 하는 불꽃으로 검출하여, 황 화합물 분석에 있어 기존의 FPD보다 더 효과적으로 황 화합물을 검출하도록 고안되었다(9). 이 검출기는 flame source와 주기적으로 점화를 시킬 수 있는 가연성 가스의 유속을 이용하며 시료는 propagated ignited flame에 의해 연소된 후 불꽃이 꺼지면서 자체적으로 연소가 종식된다. 이 주기가 초당 2.4번 반복 분석되며, 목적에 따라 필터와 검출 시간을 조절함으로써 분석기의 선택성을 높일 수 있다(10). 최적화된 PFPD는 기존의 FPD의 검출한계(limits of detection)와 비교시 25-50배까지 검출한계를 낮출 수 있다. 또한 PFPD는 황 화합물의 검출에 있어서 다른 검출기보다 선택성이 높고, 민감하며, 재현성이 뛰어나다(11). 실제로 PFPD를 식품에 적용한 예로는 맥주, 칠면조에서의 황 함유 화합물의 측정과 오이에서의 농약 검출 방법으로써 사용한 연구가 있었다(12-14).

본 연구에서는 gas chromatograph-pulsed flame photometric detector(GC-PFPD)를 이용하여 휘발성 황 함유 화합물들의 효율적인 분석 방법을 확립하고자 재현성, 검출한계, linear range 등을 고찰하였으며, static headspace(SH) 추출법과 고체상 미세 추출법(solid phase microextraction, SPME)을 이용하여 추출된 황 함유 화합물들을 확립된 GC-PFPD를 사용하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

황 함유 화합물

본 실험에 사용된 황 함유 화합물은 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophene, allyl mercaptan(2-propen-1-thiol), 2-methyl-3-furanthiol, methional[3-(methylthio)propionaldehyde]이었다. 이중 allyl mercaptan은 Fluka(Madrid, Spain)로부터 구입하였고, 나머지 시약들은 Aldrich(Beerse, Belgium)에서 구입하였다. 각각의 황 함유 화합물들의 물리화학적 특성과 분자구조는 Table 1에 제시 하였다.

표준 시료와 시료의 준비

각 표준 화합물들의 stock 용액은 HPLC용의 용매 dichloromethane, hexane, ethanol(Fisher Scientific, Korea Ltd., Seoul,

Korea)로 희석하여 10,000 ppm(w/w)의 농도로 만들어져 사용되었다. 각 황 화합물의 희석은 실온에서 이루어졌으며, 표준 물질들은 빛이 없는 영하 18°C의 온도에서 보관되었다.

각 시료들은 크게 두 가지 형태로 준비되었다. 먼저 기체 크로마토그래피에 액체 형태로 주입하고자 했던 시료들은 준비된 표준 시료와 같은 용매로 적절한 농도가 될 때까지 희석하였다. 이 때 사용된 용매는 dichloromethane과 hexane이며, 최종 농도가 1 ppm(w/w)이 될 때까지 희석하였다. 기체 상태의 시료는 먼저 각각의 황 함유 화합물들을 물에 녹는 유기 용매인 ethanol에 각각 10,000 ppm(w/w)까지 희석한 후, 그것을 다시 증류수로 10 ppm(w/w) 까지 녹인 후 사용하였다. 시료에 사용된 ethanol의 최종 농도는 0.1% 였다.

고체상 미세 추출법(SPME)과 Static headspace 추출법(SH)의 추출 조건

휘발성 황 함유 화합물들의 추출을 위해서는 SPME와 SH의 두 가지 방법이 사용되었다. 시료는 여섯 개의 황 함유 화합물들을 혼합하여 사용하였다. SPME에 사용된 장치는 Supelco(Bellefonte, PA, USA)에서 구입하였고, 각각 75 µm Carboxen/polydimethylsiloxane(CAR/PDMS), 100 µm polydimethylsiloxane(PDMS), 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene(PDMS/DVB)으로 코팅된 세 개의 fiber가 사용되었다. 시료 5 g을 22 mL headspace glass vial에 넣어 silicon/teflon 재질의 뚜껑으로 밀폐한 후, 40°C에서 30분간 평형상태를 유지하였다. 이후 상공으로 이동한 황 함유 화합물들을 40°C에서 10분간 SPME fiber에 흡착 시키고, varian 3800CT 기체크로마토그래프(Walnut, CA, USA) 주입기(200°C)에서 3분간 탈착시켰다. SH 추출을 위해서는 static headspace autosampler headspace 7000(Tekmar Dohrmann, Cincinnati, OH, USA)가 사용되었다. Static headspace autosampler의 작동조건은 plate 온도 40°C, plate 평형시간 0.5 분, 시료 평형 시간 30분, 주입시간 3분, 주입 온도 200°C, 그리고 transfer line 압력은 9 psi였다.

기체크로마토그래프(GC)와 기체크로마토그래프/질량분석기(GC/MS)의 분석 조건

Sulfur mode의 flame photometric detector(PFPD)와 Varian 1079 split/splitless 주입기가 구비되어 있는 Varian 3800CT 기체크로마토그래프가 사용되었다. 주입기와 검출기의 온도는 200°C였고, 검출기의 수소기체 유속은 13 mL/min, air 1의 유속은 17 mL/min, air 2의 유속은 10 mL/min 이었으며, 이 기체유속은 황 함유 화합물의 검출에 최적인 것으로 예비실험을 통해 판명되었다. DB-1 capillary column(30 m length×0.25 mm i.d.×0.25 µm film thickness)(J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 이용하여 각 화합물을 분리하였다. 이동상인 헬륨 가스의 유속은 1 mL/min이었다. 희석된 시료는 25 : 1의 split 비율로 GC-PFPD에 1 µL가 주입되었다. 기체크로마토그래프 오븐의 온도는 30°C에서 1분 동안 유지시킨 후, 5°C/min의 속도로 200°C까지 승온하였고, 다시 200°C에서 1분간 유지시켰다.

각 황 함유 화합물들의 동정은 HP 5890A series II gas chromatograph/5972 mass selective detector(Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 수행되었다. 주입기의 온도는 200°C, 검출기의 온도는 280°C로 유지하였고, oven 온도 조건은 gas chromatograph-pulsed flame photometric detector(GC-PFPD)와 동일하게 조절하였다. 각 황 함유 화합물들의 분리를 위해서는 GC-PFPD와 동일한 칼럼이 사용되었으며, 이동상인

헬륨 가스의 유속은 0.8 mL/min이었다. Mass spectra ionization energy는 70 eV에서 electron ionization(EI)에 의해서 얻어졌으며, mass scan range는 50에서 550이고, scanning rate는 1.4 scan/sec였다. 추출된 휘발성 황 함유 화합물들의 동정은 각 화합물의 스펙트럼을 on-computer library(Wiley 275, 1995) (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)상의 스펙트럼 및 authentic 화합물들의 spectral 결과와 비교하는 과정을 거쳐 수행되었다. 그리고 각 화합물들의 정량은 GC-PFPD 및 GC/MS 크로마토그램 상의 피크 면적으로 구하였다.

결과 및 고찰

GC-PFPD를 이용한 황 함유 화합물의 분석

극성이 서로 다른 두 가지 용매로 희석한 황 함유 화합물들의 정량적인 분석결과는 Table 2에서 확인할 수 있다. 전반적으로 비극성인 hexane으로 희석한 시료 군에서 더 많은 양이 정량되었다. 그러나 allyl mercaptan의 경우에는 dichloromethane으로 희석했을 때, 더 많은 양이 정량되었다. Dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophene은 두 가지 용매에서 모두 낮은 상대표준편차 값을 가졌다. 이를 통해서 앞의 세 화합물들은 용매에는 크게 영향을 받지 않으며, 분석 과정을 거치면서도 비교적 안정된 상태를 유지한다는 점을 짐작할 수 있었다. 그러나, 그 외의 화합물인 allyl mercaptan, methional, 2-methyl-3-furanthiol은 평균값과 상대 표준편차 모두에서 큰 차이를 보였다. Dichloromethane을 용매로 사용하였을 때, allyl mercaptan이 hexane에 비해 더 많은 양이 정량 되는

것은 이것이 용매의 극성도에 민감하게 반응하기 때문으로 볼 수 있다. 본 실험을 통하여, 황 함유 화합물의 분석 시에 용매의 선택이 분석 결과에 영향을 미침을 알 수 있었다. 따라서 분석 시 사용되는 용매의 선택에 있어서는 용매의 극성도와 detector와의 반응성 등이 고려되어야 할 것으로 여겨진다. 이와 같은 연구 결과를 토대로 액체 형태의 시료 준비 시 allyl mercaptan은 dichloromethane, 나머지 분석 대상 황 함유 화합물인 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophene, 2-methyl-3-furanthiol, methional[3-(methylthio)propionaldehyde] 등은 hexane을 사용하여 희석시킨 후 사용하였다.

GC를 통해서 분석한 모든 황 함유 화합물은 각각 3회 반복 실험하였다. 각 시료들의 GC 주입량은 1 µL이었고, 검출 가능한 최소값(limit of detection, LOD)을 구하기 위해서 splitless 조건에서 분석하였다. LOD값을 구하기 위해서는 GC에 적은 양의 시료를 주입하는 것이 더 효율적이다(15). 이는 분석하고자 하는 시료의 양이 적으면, column에서 일어날 수 있는 분석물질의 감소(quenching effect)를 줄일 수 있기 때문이다. 각각의 황 함유 화합물들은 LOD 수준의 농도에서부터 선형의 직선(linear range)을 그릴 때 오차범위가 5%미만인 범위까지 농도를 10배수씩 희석하여 측정하였다. Table 3은 이들 각각의 황 함유 화합물들의 선형식(linear equation)과 회귀계수(regression coefficients), LOD값을 보여준다. LOD값은 공시료와 낮은 농도의 분석물질을 분석하여 signal을 비교함으로써 결정하였으며, 이때의 신뢰도는 99%에 상응하는 수준이어야 한다(16). Table 3을 보면, 각각의 황 함유 화합물들의 linear range, LOD값,

Table 1. Formulas, structures, molecular weights, and boiling points of sulfur-containing compounds

Compound	Formula	Structure	Mol wt.	bp (°C)
dimethyl disulfide	C ₂ H ₆ S ₂		94.2	109
dimethyl trisulfide	C ₂ H ₆ S ₃		126.27	58
3-methyl thiophene	C ₅ H ₆ S		98.17	114
allyl mercaptan	C ₃ H ₆ S		74.15	66-68
methional	C ₄ H ₈ OS		104.17	165-166
2-methyl-3-furanthiol	C ₅ H ₆ OS		114.17	57-60

Table 2. Comparison of peak areas of sulfur-containing compounds dissolved in different solvents

Sulfur	Hexane		Dichloromethane	
	PA ¹⁾	RSD ²⁾	PA	RSD
dimethyl disulfide	1071.16	0.87	907.62	4.15
dimethyl trisulfide	1257.04	0.44	505.53	5.41
3-methyl thiophene	829.12	5.00	253.04	3.74
allyl mercaptan	79.28	49.60	354.50	14.20
methional	174.33	5.05	69.53	73.10
2-methyl-3-furanthiol	1043.32	7.46	149.52	14.80

¹⁾Average of peak (square root) area in GC-PFPD chromatogram (n=3)

²⁾Relative standard deviation (%)

Table 3. Linear regression and detection limits of sulfur-containing compounds analyzed by gas chromatograph-pulsed photometric detector(GC-PFPD)

Compound	Linear equation	Regression coefficients	Linear range (ppb) ¹⁾	Limit of detection (ppt) ²⁾
dimethyl disulfide	y = 0.7523x + 192	0.9990	10-1000	61.7
dimethyl trisulfide	y = 0.9387x + 115.51	0.9967	0.1-1000	15.2
3-methyl thiophene	y = 0.5614x + 61.252	0.9977	1-1000	229.4
allyl mercaptan	y = 0.0841x + 43.568	0.9905	10-10000	4.6
methional	y = 0.1393x + 24.467	0.9991	100-10000	70.5
2-methyl-3-furanthiol	y = 0.1248x + 45.597	0.9907	10-10000	9.5

¹⁾Linear range is from the limit of detection to the concentration level which produces a deviation from linearity of about 5%.

²⁾Limit of detection is based on signal/noise = 3.

Table 4. Comparison of sulfur-containing compounds isolated by solid phase microextraction (SPME) with different fibers

No.	Compounds	SPME ¹⁾						ID ⁷⁾
		DVB ²⁾		CAR ³⁾		PDMS ⁴⁾		
		P.A. ⁵⁾	RSD ⁶⁾	P.A.	RSD	P.A.	RSD	
1	allyl mercaptan	- ⁸⁾	-	156.6	11.7	102.8	4.8	MS ⁹⁾ /RT ¹⁰⁾
2	dimethyl disulfide	1808.8	38.5	2696.1	0.7	2443.6	4.1	MS/RT
3	3-methyl thiophene	1773.4	26.5	2792.5	1.8	2444.3	1.1	MS/RT
4	Methional	439.9	20.4	1548.1	17.5	321.8	20.8	MS/RT
5	methyl 2-propenyl disulfide	2050.6	3.3	2422.8	12.8	1909.0	4.1	MS
6	dimethyl trisulfide	2072.6	4.0	2575.1	5.7	2273.0	2.2	MS/RT
7	di-2-propenyl disulfide	1540.0	1.4	1470.3	7.7	1932.5	4.4	MS
8	methyl 2-propenyl disulfide	2011.1	3.5	1947.0	1.2	2043.1	5.2	MS
9	methyl 2-methyl-3-furyl disulfide	2002.0	2.1	1805.6	12.0	2006.8	0.5	MS
10	1,4-dimethyltetrasulfide	1751.1	23.9	2042.7	2.3	2087.1	2.7	MS
11	di-2-propenyl trisulfide	1686.1	4.8	1585.4	15.4	1270.2	23.6	MS
12	bis(3-methylbutyl) disulfide	935.0	2.5	1532.2	2.3	750.2	4.0	MS
13	cyclic ethylene mercaptal fucose	1107.2	18.1	1021.2	9.5	1611.4	8.6	MS
14	bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	1954.3	4.6	1998.9	2.5	1881.0	6.1	MS

¹⁾Solid phase microextraction (SPME)

²⁾65 μ m polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber

³⁾75 μ m carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fiber

⁴⁾100 μ m polydimethylsiloxane (PDMS) fiber

⁵⁾Average of peak area (square root) in GC-PFPD chromatogram (n=3)

⁶⁾Relative standard deviation (%)

⁷⁾Identification and tentative identification were performed as follows:

⁸⁾- not detected

⁹⁾Mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA)

¹⁰⁾Retention time and mass spectrum were compared with those of each authentic compound.

linear equation 등의 결과를 비교해 볼 수 있다. 전체적으로 보았을 때, linear range의 범위는 10^2 부터 10^4 까지로 나타났다. Dimethyl trisulfide가 가장 작은 LOD값과 가장 넓은 linear range를 가지는 것에 비해, methional은 가장 큰 LOD 값과 가장 좁은 linear range를 가졌다. 황 함유 화합물간의 LOD값의 차이는 각 화합물들의 분자구조와 pulsed flame photometric detection(FPFD)의 원리에 따라 차이가 났다. PFPD는 들뜬 상태의 황 분자(S_2^*) 형태를 감지해 내는 원리로 작동된다. 따라서, S_2^* 가 생성되기 위해서는 그에 필요한 황 원자(S)가 있어야 한다. 상대적으로 많은 양의 S가 있으면, 더 많은 양의 S_2^* 를 생성할 수 있다. Table 1에서 확인 할 수 있듯이 dimethyl trisulfide는 분석한 황 함유화합물 중에 가장 많은 S를 가지고 있고, 이것이 LOD값에 영향을 주었다고 여겨진다. 반면에 methional의 경우에는 알데하이드기에 일산화 탄소(CO) 분자를 가지고 있는데, 이 CO는 S와 반응하여 COS 분자를 형성한다.

이렇게 S가 COS 형태로 바뀌게 되면, S_2^* 를 형성하는데 쓰이지 못한다. 따라서, CO 분자가 있으면, 황 함유 화합물의 분석을 저해하는 작용을 한다(15). PFPD는 flame photometric detector (FPD)와 유사한 원리로 작동되며, 비슷한 수준의 linear range를 가진다. 하지만, LOD값은 FPD보다 더 작은 단위까지 측정가능 하다(7). 그러나 실제 실험을 진행하면서, PFPD의 안정성에 다소 문제점이 있다는 것을 알 수 있었다. PFPD의 경우 매번 분석을 시작하기 전에, PFPD쪽으로 가는 기체의 유량을 조절해 주어야만 했는데, PFPD가 기체의 흐름에 매우 민감하여 작은 차이에도 결과 값의 차이가 커지는 어려움을 겪었으며, 이는 다른 연구 결과에서도 보고된 바 있다(17).

고체상 미세 추출법(SPME)으로 추출된 황 함유 화합물 분석
각기 다른 SPME fiber에 따른 결과를 보면, PDMS/DVB에서는 총 13개, CAR/PDMS와 PDMS fiber에서는 14개의 황 함유

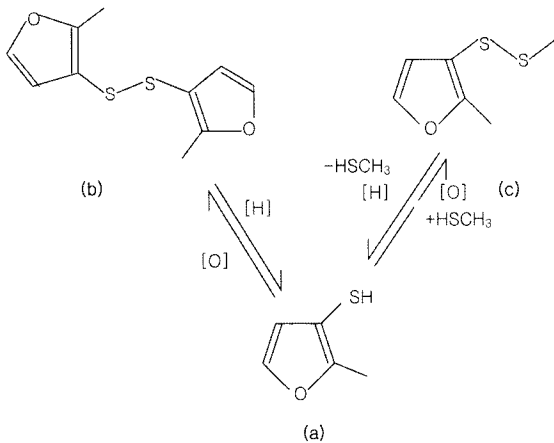


Fig. 1. Structures of sulfur-containing compounds.
 (a) 2-Methyl-3-furanthiol, (b) Bis (2-methyl-3-furyl) disulfide, (c) Methyl oxycyclosulfide.

화합물 등이 동정 되었다(Table 4). 시료에 포함된 총 6개의 황 함유 화합물 중에서 동정 및 정량이 가능한 황 함유 화합물은 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophen, allyl mercaptan이었다. 세가지 서로 다른 fiber에서 모두 2-methyl 3-furanthiol은 발견되지 않았다. 한편, 시료에 넣지 않은 methyl 2-propenyl disulfide, di-2-propenyl disulfide, methyl 2-propenyl disulfide, methyl 2-propenyl trisulfide, bis(2-methyl-3-furyl) disulfide 등과 같은 새로운 황 함유 화합물들이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 2-Methyl-3-furanthiol은 빛에 매우 민감하고 공기 중에서 쉽게 산화될 가능성이 있기 때문에, 추출과 분석 과정을 거치면서 다른 화합물로 변했을 것으로 사료된다. 2-Methyl-3-furanthiol이 변형되어 만들어진 것으로 생각되는 황 함유 화합물은 bis(2-methyl-3-furyl)disulfide이다. 이 두 황 함유 화합물의 분자구조는 Fig. 1에 나와있다(18). Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide는 2개의 2-methyl-3-furanthiol이 합쳐진 구조를 가지고 있다. 본 실험시 대기 중에 있는 산소에 의해 2-methyl-3-furanthiol이 산화되면서 bis(2-methyl-3-furyl)disulfide로 바뀐 것으로 보여진다. bis(2-methyl-3-furyl)disulfide는 세 종류의 fiber 모두에서 다량으로 추출되었다. 이 실험을 통해서 살펴보고자 한 것은 어떤 fiber가 실험에 사용한 황 함유 화합물들을 가장 효율적으로 추출하는가 하는 점이었다. CAR/PDMS fiber를 사용하여 추출했을 때, 시료로 사용한 5개의 황 함유 화합물들이 가장 많이 분석되었다. 따라서 황 함유 화합물들의 추출 효율만을 비교했을 때는 CAR/PDMS가 가장 좋은 fiber가 될 수 있을 것이다. 그러나 단편적으로 추출 효율이 높고, 많은 황 함유 화합물들이 동정 된다고 해서 가장 좋은 fiber라고 결론 내릴 수는 없다. 미지의 시료를 분석 시 추출이 이루어지는 동안 추출 이전에는 존재하지 않았던 새로운 황 함유 화합물들이 생성된다면, 원래 동정 하고자 한 시료와는 다른 결과를 얻게 되는 것이기 때문이다. 즉, 추출이 이루어지는 동안의 새로운 분석 오차가 생길 수 있다고 여겨진다. 그러나, 추출 효율이 지나치게 낮으면, 시료에 포함되어 있는 황 함유 화합물조차도 동정해 내지 못할 가능성이 있다. 그 예로 PDMS/DVB fiber를 사용한 경우 다른 fiber를 사용했을 때는 동정되었던, allyl mercaptan과 methional이 동정되지 않았다. 이처럼, fiber에 따라서 다른 결과가 나온 이유는 각 fiber들마다 서로 다른 흡착, 탈착 기전을 갖기 때문이다. 이것은 분석하고자 하는 물질의 휘발성과 극성

도에 따라서 달라진다고 알려져 있다. 극성이 큰 물질은 극성이 큰 fiber에서 더 쉽게 흡착되나 잘 탈착 되지는 않는다. 따라서 일반적으로 분석하고자 하는 화합물의 극성과 같은 극성을 가진 fiber에서 더 좋은 결과를 기대할 수 있다(19,20). 결국, fiber를 선택할 때는 분석하고자 하는 물질의 특성을 고려하여 선택하는 것이 중요하다. PDMS fiber는 비교적 넓은 조건에서 안정성을 보이고, 비극성 물질에 대해서 높은 민감성을 가지고 있다. 그래서 보편적으로 미지의 물질을 동정할 때 가장 많이 쓰이는 fiber이다. 극성이 큰 물질을 분석 하고자 할 때는 PDMS/DVB, CAR/PDMS fibers 등이 더 적절하다. 이 fiber들은 극성인 부분과 비극성인 부분을 동시에 가지고 있어서 더 효율적이다. CAR/PDMS fiber는 특히 작은 분자량을 가지고 극성이 큰 acetic, propanoic acid와 같은 물질에 민감에 민감하다고 보고 되었다(18,19). 본 연구에서도 분자량이 비교적 작은 편이고, 휘발성이 높은 ally mercaptan과 상대적으로 극성이 큰 methional과 같은 황 함유 화합물들이 CAR/PDMS fiber에서 가장 좋은 효율을 보였고, PDMS/DVB fiber에서는 동정되지 않았다. 이들 황 함유 화합물들의 특성은 Table 1에서 확인할 수 있다.

Static headspace(SH) 추출법에 의해 추출된 황 함유 화합물 분석

Static headspace(SH) 추출법과 SPME 추출법을 비교하기 위해, 두 추출법에서 사용한 분석 조건은 모두 동일하게 유지하였다. Fig. 2에 CAR/PDMS fiber를 사용한 SPME 추출법과 SH를 사용한 추출법의 GC-PPPD chromatogram을 나타내었다. SPME fiber들 중에서 CAR/PDMS fiber가 비교의 대상이 된 것은, 추출효율이 가장 높았기 때문이다. SH 추출법 사용시 SPME 추출법과 비교했을 때, 상대적으로 더 적은 수의 황 함유 화합물을 감지했다. 이 같은 추출 효율의 차이는 올리브 오일을 분석한 다른 논문에서도 확인할 수 있었다(20). SH 추출법을 사용했을 때, 대부분의 황 함유 화합물들은 상대적으로 GC chromatogram 상의 앞쪽 시간대에 분석되었다. 반면에 SPME 추출법의 경우에는 분석시간 전체에 걸쳐서 나타났다. 본 실험에 사용된 황 함유 화합물들은 비교적 낮은 분자량과 높은 휘발성을 가지기 때문에 GC chromatogram의 앞부분에서 주로 나타난다. 따라서 SPME에서 GC chromatogram 뒤쪽에서 나타나는 황 함유 화합물들은 기존의 시료에 포함된 물질이 아닌, 추출 및 분석 과정 중 새롭게 artifacts임을 추측할 수 있다. 본 연구의 목적이 황 함유 화합물에 맞는 적절한 추출법을 밝혀내는 것임을 감안하면, 우리가 목표로 한 것 이외의 물질들이 감지되지 않는 것이 바람직한 결과가 될 것이다. 그런 측면에서 SH 추출법은 SPME 추출법과 비교 시 더 바람직한 결과를 보여주었다. 이처럼 SPME 추출법에서 새로운 화합물들이 더 많이 생성된 것은 SH 추출법에는 없는 fiber의 흡착·탈착 과정이 포함되어 있기 때문이라고 여겨진다. Table 5는 SH 추출법을 통해서 동정된 황 함유 화합물의 평균면적과 SD, RSD 등의 결과를 보여준다. 총 9개의 황 함유 화합물들 중 5개는 본 실험에서 사용된 황 함유 화합물들이었다. 이것들은 SPME 추출법에서 동정된 5개의 황 함유 화합물들과도 일치하였다. 그러나 3-(methylthio) 1-propene, methyl 2-propenyl disulfide, methyl oxycyclosulfide와 같이 새롭게 생성된 화합물들도 있었다. 이와 같이 황 함유 화합물들 사이의 상호 반응을 통해서 생성된 것들 중 methyl oxycyclosulfide는 SPME를 사용한 추출법에서는 동정되지 않았던 화합물로 시료에 원래 포함되었던

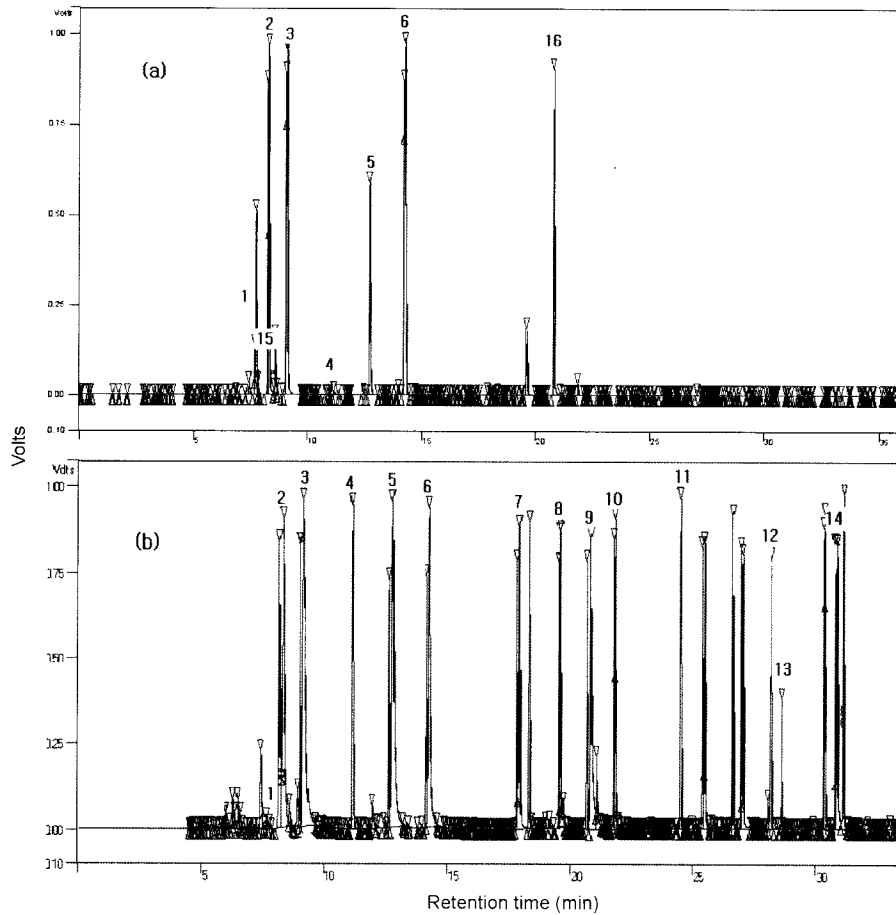


Fig. 2. Gas chromatograms of sulfur containing compounds isolated by two different extraction methods.

(a) Static headspace extraction (SH); (b) Solid phase microextraction (SPME) with CAR/PDMS fiber. 1: allyl mercaptan, 2: dimethyl disulfide, 3: 3-methyl thiophene, 4: methional, 5: methyl 2-propenyl disulfide, 6: dimetyl trisulfide, 7: di-2-propenyl disulfide, 8: methyl 2-propenyl disulfide, 9: methyl 2-methyl-3-furyl disulfide, 10: 1,4-dethyltetrasulfide, 11: di-2-propenyl trisulfide, 12: bis(3-methylbutyl) disulfide, 13: cyclic ethylene mercaptal fucose, 14: bis(2-methyl-3-furyl)disulfide, 15: 3-(methylthio) 1-propene, 16: methyl oxycyclosulfide.

Table 5. Comparison of sulfur-containing compounds isolated by static headspace extraction (SH)

No.	Compounds	P.A ¹⁾	RSD ²⁾	ID ³⁾
1	allyl mercaptan	1080.2	8.5	MS ⁴⁾ /RT ⁵⁾
2	3-(methylthio) 1-propene	232.3	12.1	MS/RT
3	dimethyl disulfide	2531.4	3.1	MS/RT
4	3-methyl thiophene	2271.1	5.1	MS/RT
5	Methional	378.1	7.6	MS/RT
6	methyl 2-propenyl disulfide	1274.4	2.2	MS/RT
7	dimetyl trisulfide	2384.3	4.6	MS/RT
8	methyl oxycyclosulfide	1655.3	13.1	MS/RT

¹⁾Average of peak (square root) area in GC-PFPD chromatogram (n=3)

²⁾Relative standard deviation (%)

³⁾Identification and tentative identification were performed as follows:

⁴⁾Mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database(Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA)

⁵⁾Retention time and mass spectrum were compared with those of each authentic compound.

6개의 황 함유 화합물들을 제외하고는, 가장 많은 양이 정량되었다. 반면, methional은 본 실험에서 사용한 6개의 황 함유 화합물들 중 가장 적은 양이 정량되었다. SH 추출법을 통해서도 2-methyl 3-furanthiol은 분석되지 않았다. 이를 통해 비교적 mild한 SH 추출 조건에서도 일부 황 함유 화합물들의 변화가 일어남을 알 수 있었다. Fig. 1에 2-methyl-3-furanthiol과 methyl oxycyclosulfide의 분자 구조가 나와있다. Methyl oxycyclosulfide

는 2-methyl-3-furanthiol에서 수소(H) 원자가, methylthio(-SCH₃)기로 치환된 분자 구조를 가지고 있다. 이를 통해 다른 황 함유 화합물에서 떨어져 나온 -SCH₃기와 2-methyl-3-furanthiol이 추출과정 중에 산화되며 결합한 것으로 추정할 수 있었다. 2-methyl-3-furanthiol이 meaty하고 roasted한 향미 특성을 가지고 있으며, 많은 육류 식품에서 특징적인 황 함유 화합물 중에 하나라는 사실을 감안하면, 이 황 함유 화합물의 정확한 추출

방법의 확립이 필요하다고 여겨진다(21). SH 추출과 같이, 추출이 일어나는 동안 시료의 변화가 가장 적다고 알려져 있는 분석법에서도 일부 황 함유 화합물의 변형이 일어 난다는 것은 황 함유 화합물 분석의 난점을 다시 한번 확인시켜주는 일이었다. 황 함유 화합물들의 정확한 분석을 위해서는 분석 과정 중 일어날 수 있는 변성을 최소한으로 줄여야 할 것이다. 그런 측면에서 SH법은 SPME법보다 더 적절한 추출법이라고 볼 수 있다. 그러나 본 연구의 경우에는, 10 ppm이라는 비교적 높은 농도의 시료를 분석하였다. 따라서, 상대적으로 추출 효율이 낮은 SH 추출법으로도 충분히 정량이 가능하였다. 그러나, 실제 식품에서 존재하는 황 함유 화합물의 농도는 일반적으로 ppb이하 수준이다. 따라서 낮은 농도에서 추출 효율성을 높이는 것도 중요한 변수가 될 것이다. 그러므로, 분석하고자 하는 황 함유 화합물들에 따라 가능한 시료의 변성을 줄이고, 동시에 충분한 추출 효율과 재현성을 가지는 분석 방법을 확립하는 것이 필요하다.

요 약

각각의 황 함유 화합물의 표준곡선을 그렸을 때, linear range의 범위는 10²부터 10⁴까지의 범위를 보였다. Dimethyl trisulfide가 가장 작은 limit of detection(LOD) 값과 가장 넓은 linear range(10⁴)를 보이는 반면, methional은 가장 큰 LOD 값과 가장 좁은 linear range(10²)를 가졌다. 각 황 함유 화합물의 분자구조와 PFPD의 황 함유 화합물 분석 원칙에 영향을 받는 것으로 사료된다. 서로 다른 세 종류의 fiber를 사용시, 미세 고체상 추출법(SPME)을 사용했을 때, CAR/PDMS fiber는 가장 좋은 추출 효율을 보였고, 반대로 PDMS/DVB fiber는 가장 낮은 효율을 나타내었다. SPME 방법을 사용하면, 시료에 포함되어 있는 6개의 황 함유 화합물들 중, 최대 5개까지 분석이 가능하였다. 그러나 본 실험에서 사용하지 않은 황 함유 화합물들도 다수 동정 되었는데, 이렇게 추출 과정 중 artifacts로 생성된 황 함유 화합물들은 분석 시 오차로 작용할 수 있다. 고정상 기체추출법(SH)은 SPME와 비교했을 때 더 적은 수의 황 함유 화합물을 감지해 냈다. SPME와 비교 시 SH의 추출 효율은 낮지만, artifacts로 생성되는 화합물의 수는 적었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발 사업의 지원에 의해 이루어진 연구의 일부분으로서 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Shahidi F, Rubin LJ, D'Souza LA. Meat flavor volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24: 141-243 (1986)
2. Mussinan CJ, Keelan ME. Sulfur compounds in foods. pp.1-6. In: *Sulfur Compounds in Foods ACS Sym. Ser. 564.* Mussinan CJ, Keelan ME (eds). American Chemical Society, Washington DC, MD, USA (1994)
3. Eriksson C. Maillard reactions in food: chemical, physiological and technological aspects. pp. 1-6. In: *Progress in Food and Nutrition Science Vol. 5.* Erisson C (ed). Pergamon Press, Oxford, NY, USA (1981)
4. Chin HW, Robert GL. A modulation of volatile sulfur compounds in cruciferous vegetable. pp. 90-104. In: *Sulfur Compounds in Foods ACS Sym. Ser. 564.* Mussinan CJ, Keelan ME (eds).

- American Chemical Society, Washington DC, MD, USA (1994)
5. Mestres M, Busto O, Guasch J. Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace technique with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A.* 773: 261-269 (1997)
6. Russell LR. Analytical methods to determine volatile sulfur compounds in food and beverage. pp. 2-24. In: *Heteroatomic Aroma Compounds.* Reineccius GA (ed). American Chemical Society, Washington DC, USA (2002)
7. Mistry BS, Reineccius GA, Jasper BL. Comparison of gas chromatographic detectors for analysis of volatile sulfur compounds in foods. pp. 8-12. In: *Sulfur Compounds in Foods ACS Sym. Ser. 564.* Mussinan CJ, Keelan ME (eds). American Chemical Society, Washington DC, MD, USA (1994)
8. Eckert SE, Hawthorn SB, Miler DJ. Comparison of commercially available atomic emission and chemiluminescence detectors for sulfur-selective gas chromatographic detection. *J. Chromatogr.* 591: 313-323 (1992)
9. Jacobsen JA, Stuer-Lauridsen F, Pritzl G. Organotin speciation in environmental samples by capillary gas chromatography and pulsed photometric detection(PFPD). *Appl. Organomet. Chem.* 11: 737-741 (1997)
10. Cheskis S, Atar E, Amirav A. Pulsed-flame photometer: a novel gas chromatography detector. *J. Anal. Chem.* 65: 593-555 (1993)
11. Amirav A, Jign H. Pulsed flame photometer detector for gas chromatography. *J. Anal. Chem.* 67: 3305-3318 (1995)
12. Hill PG, Smith RM. Determination of sulfur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *J. Chromatogr.* 872: 203-213 (2000)
13. Fan X, Sommers CH, Thyer DW, Lehotay SJ. Volatile sulfur compounds in irradiated precooked turkey breast analyzed with pulsed flame photometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4257-4261 (2002)
14. Munoz JA, Gonzalez EF, Ayuso LE, Casado AG, Rodriguez I.C. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC-mass spectrometry. *Talanta* 60: 433-447 (2003)
15. Kalontarov L, Jing H, Amirav A, Cheskis S. Mechanism of sulfur emission quenching in flame photometric detectors. *J. Chromatogr. A.* 696: 245-256 (1995)
16. Keith LH, Crummett W, Deegan J, Libby RA, Taylor JK, Wentler G. Principles of environmental analysis. *Anal. Chem.* 55: 2210-2218 (1983)
17. Sergey C, Eitan A, Aviv A. Pulsed-flame photometer: A novel gas chromatography detector. *Anal. Chem.* 65: 539-555 (1993)
18. Rowe D. More fizz for your buck: high-impact aroma chemicals. *J. Perf. Flav.* 25: 1-19 (2000)
19. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* 880: 35-62 (2000)
20. Nielsen AT, Jonsson S. Quantification of volatile sulfur compounds in complex gaseous matrices by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A.* 963: 57-64 (2002)
21. Shirey RE. SPME fibers and selection for specific applications. pp. 59-110. In: *Solid Phase Microextraction.* Wercinski, SAS. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA (1999)
22. Roberts DD, Pollien P, Milo C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2430-2437 (2000)
23. Cavalli JF, Louisette LC, Loiseau AM. Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of french olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7709-7714 (2003)
24. Vermin GG. Heterocyclic aroma compounds in foods: Occurrence and organoleptic properties. pp. 72-150. In: *Chemistry of Heterocyclic Compounds in Flavours and Aromas.* Vermin, G (ed). Ellis Horwood Limited, New York, NY, USA (1982)