



향신료에서 유래되는 안식향산, 소브산, 프로피온산의 함유량 조사

윤상순 · 이상진 · 임도연 · 임호수 · 이근영 · 김미경*

식품의약품안전평가원 첨가물포장과

Monitoring of Benzoic Acid, Sorbic Acid, and Propionic Acid in Spices

Sang Soon Yun, Sang Jin Lee, Do Yeon Lim, Ho Soo Lim, Gunyoung Lee, and MeeKyung Kim*

Food Additives and Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju, Korea

(Received July 20, 2017/Revised August 8, 2017/Accepted September 25, 2017)

ABSTRACT - In this study, we investigated the levels of natural preservatives of benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid in spices. The quantitative analysis was performed using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for benzoic acid and sorbic acid and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for propionic acid. The sample was extracted with ethanol using sonication, then centrifuged and evaporated to dryness and redissolved to 1 mL with ethanol to use for the instrumental analysis. The analytical method was validated based on linearity, recovery, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). This method was suitable to determine low amounts of naturally occurring preservatives (benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid) in various spices. Benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid were found in 165 samples, 88 samples, and 398 samples, respectively from the total of 493 samples. The concentration of benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid were ranged at ND-391.99 mg/L, ND-57.70 mg/L, and ND-188.21 mg/L in spices, respectively. The highest mean levels of benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid were found in cinnamon (167.15 mg/L), basil leaves (22.79 mg/L), and white pepper (51.48 mg/L), respectively. The results in this study provide ranges of concentration regarding naturally occurring benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid in spices. Moreover, the results may use to the case of consumer complaint or trade friction due to the inspection services of standard criteria for the preservatives of spices.

Key words : Spices, Preservatives, Benzoic Acid, Sorbic Acid, Propionic Acid

현재 우리나라에서는 식품의 제조·가공에 사용할 수 있는 보존료로 데히드로초산나트륨, 소브산, 소브산칼륨, 소브산칼슘, 안식향산, 안식향산나트륨, 안식향산칼륨, 안식향산칼슘, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산에틸, 프로피온산, 프로피온산나트륨, 프로피온산칼슘 등 13종이 지정되어있다¹⁾. 식품의 제조·가공에 사용할 수 있는 보존료는 식품첨가물공전의 품목별 사용기준에 따라 관리되고 있으나 안식향산, 소브산, 프로피온산 같은 일부 보존료의 경우 식품 제조·가공 공정에서 사용되는 식품원료에 천연적으로 함유되어있거나, 발효과정 중 생성되는 경우가 있다²⁻⁷⁾. 이러한 이유로 식품공전에서는 ‘원료가 해당 기준 및 규격에 적합하거나 품질이 양호한 원료에서 불가피하게 유래되었음이 공인된 자료, 문헌으로 입증할 경우

인정할 수 있다.’라는 규정에 따라 필요한 자료를 제출하여 천연유래로 인한 식품의 사용기준 위반에 따른 거부처분의신청을 할 수 있게 되어 있다¹⁾.

천연유래 보존료에 대한 연구는 1914년에 Radin⁸⁾이 프룬과 크랜베리에서 안식향산이 검출되었다고 보고하면서 시작되었다. 천연유래 보존료의 생성과 관련하여 세계보건기구(WHO)에서는 안식향산이 다른 화합물의 형성에 있어 중간 생성물로서 많은 식물들에 의해 생성되며, 베리류에서는 높은 농도로 검출되고 동물 내에서도 검출된다고 하였다⁹⁾. 또한, 안식향산은 유가공품을 포함한 많은 식품 내에 천연유래 된다고 하였다^{10,11)}. 프로피온산의 경우 미연방규정집(CFR)에서는 프로피온산이 화학적 합성 또는 박테리아 발효에 의해 생성된다고 명시하였다⁵⁾. WHO에서는 프로피온산이 식용 지방이나 기름의 구성물은 아니지만, 지방산의 산화에 의해서 중간 대사산물로 발생한다고 하였고¹²⁾, 미국 환경청(EPA)에서는 프로피온산이 생체 내에서 일반적인 중간 대사산물이며, 여러 아미노산이 분해되면서 생성되는 대사산물 중 하나로 보고하였다¹³⁾.

*Correspondence to: MeeKyung Kim, Food Additives & Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4351, Fax: 82-43-719-4350
E-mail: mkim@korea.kr

식품원료에 대한 천연유래 보존료 연구는 일본에서 비교적 광범위하게 연구되었는데, 1983년에 과일류 및 과일류 가공품 63종 237품목에 대하여 안식향산의 함유량을 조사하였고¹⁴⁾ 1986년에는 농산물과 농산물 가공품 233종 683품목에 대해 안식향산의 함유량을 조사하였다²⁵⁾. 2010년 Hiroki 등¹⁶⁾은 과일류, 견과류, 향신료 및 그 가공식품 28종 39품목에 대하여 안식향산과 소브산의 함량에 대한 연구를 보고하였다. 우리나라의 경우 Kim 등¹⁷⁾은 다류의 원료로 사용되는 감잎, 녹차 등 식물류 39종과 향신료로 이용되는 겨자분말, 통후추 등 식물원료 9종을 대상으로 안식향산과 소브산의 함량을 조사하였다. Choung¹⁸⁾은 작약 식물체 부위별 성분 함량 변이 연구를 한 결과, 안식향산이 잎, 근경, 뿌리, 줄기 순으로 검출되어 천연유래 안식향산의 함유량이 식물체의 부위별로 차이를 나타내는 것을 보고하였다. 또한 Back 등¹⁹⁾은 식품보존에 이용되는 식물류의 천연보존료 함유량을 연구하였는데, 15종의 식물류 중 소브산은 대나무잎과 칩잎에서만 검출되었고, 안식향산은 대나무잎, 모시잎 등 6종에서 검출되었다고 보고하였다. 프로피온산관련 연구는 1980년 Kim 등²⁰⁾이 재래식 장의 발효 중 휘발성 향기성분을 분석하면서 프로피온산이 검출되었다고 보고하였고, 1985년에 Lee 등²¹⁾의 연구에 의하면 젓갈류의 발효과정 중에서도 천연유래 프로피온산이 생성됨을 보고하였다. Lee 등²²⁾은 장류 중 프로피온산 함량조사 결과, 고추장, 간장, 된장, 청국장에서 프로피온산이 검출되었다고 보고하였다. Pihlsgard 등²³⁾은 사탕무 설탕에서 생성되는 휘발성 화합물을 분석한 결과 프로피온산이 검출됨을 확인하였다. Kanavouras 등²⁴⁾은 올리브를 염장 기간에 따라 유기산함량을 측정하였는데, 프로피온산이 검출됨을 확인하였다. Thierry 등²⁵⁾은 에멘탈 치즈의 발효과정에서 *Propionibacterium freudenreichii* 균주를 처리한 치즈는 프로피온산이 6,582 mg/kg까지 검출되었고 균주를 처리하지 않은 치즈는 39.3 mg/kg만이 검출됨을 보고하였다. Manolaki 등²⁶⁾은 저지방 페타치즈에서 숙성기간에 따라 프로피온산이 최대 152 mg/kg까지 검출됨을 보고하였다.

식품원료 및 발효·가공식품 중 안식향산, 소브산 및 프로피온산의 천연유래 함량 모니터링에 관한 연구들이 다수 보고되고 있으나 향신료를 대상으로 천연유래 보존료 함량 분석에 관한 연구는 많지 않아 향신료의 천연유래 여부를 판단할 수 있는 기초자료 확보가 필요한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 국내에 유통되고 있는 향신료를 대상으로 안식향산, 소브산 및 프로피온산에 대한 모니터링을 실시하여 천연유래 여부를 판단할 수 있는 근거자료를 마련하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료

대상 시료는 식품공전에 명시된 식품원재료 분류에 따라 겨자, 계피, 고수열매, 몰약, 바질, 박하, 사프란, 산초, 월계잎, 육두구, 정향, 차조기, 후추, 쿠민, 강황 등의 향신료와 식품공전의 향신료 분류에 속하지는 않으나 일반적으로 향신료로 많이 쓰이는 마늘, 양파, 고추, 파프리카도 대상 시료로 선정하여 33종 493건을 구입하였다²⁷⁾. 시료의 구입은 전국 산지 및 유통현황을 파악하여 전국 주요 도시의 백화점, 대형마트, 외국인 마트 및 약재시장에서 2015년 4월부터 10월경 구입하였고, 분쇄기(Blixer 5 plus, Robot Coupe, Vincennes, France)를 이용하여 잘게 분쇄 후 -20°C 냉동고에 보관하면서 보존료 함유량 분석에 사용하였다.

표준품 및 시약

보존료 함량 조사를 위해 안식향산(benzoic acid, BA), 소브산(sorbic acid, SA), 프로피온산(propionic acid, PA) 표준품은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 전처리용 추출용매로는 에탄올(ethanol), 이동상 용매로는 아세토니트릴(acetonitrile)을 Merck사(Frankfurt, Germany)의 제품을 사용하였고, 테트라뷰틸암모늄(tetrabutylammonium hydroxide, TBA-OH), 인산(phosphoric acid)은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 정제수는 Mili-Q ultrapure water purification system (US/A56210-857, Milipore Co., Billerica, MA, USA)을 이용한 18 MΩ·cm 수준으로 정제수를 사용하였다.

표준용액 조제

안식향산, 소브산 및 프로피온산 표준품 100 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 용량 플라스크에 각각 넣고 에탄올을 가하여 완전히 혼합 후 100 mL로 정용하여 1,000 mg/L가 되도록 하였다. 이를 에탄올로 희석하여 안식향산과 소브산은 표준용액의 농도가 0.05-1.0 mg/L가 되도록 조제하여 사용하였고 프로피온산은 0.1-100 mg/L가 되도록 조제하여 사용하였다.

전처리 방법

전처리 방법은 수증기 증류장치를 이용하는 방법인 식품공전의 식품 중 식품첨가물시험법에서 보존료 시험 방법²⁷⁾보다는 여러 개를 동시에 신속하게 전처리하는 것이 가능하며, 농축 및 희석배수 조정이 용이한 축산물의 가공기준 및 성분규격에서 보존료 동시분석법의 전처리 방법을 참고하여 시험용액을 조제하였다²⁸⁾. 시험용액은 시료 5.0 g을 정밀히 칭량하여 에탄올 50 mL를 가한 후 초음파

로 30분간 추출하였다. 이후 3,500 rpm에서 10분간 원심 분리 하였으며 분리한 상등액을 Advantec사(Tokyo, Japan)의 PTFE, 0.45 μm syringe filter로 여과 후 안식향산과 소브산 측정을 위한 시험용액으로 사용하였다. 프로피온산 측정은 원심분리한 상등액 5 mL를 질소농축기로 농축 후 다시 에탄올을 추가하여 총 액이 1 mL가 되게 한 후 0.45 μm syringe filter로 여과 후 시험용액으로 사용하였다. 시험용액의 검출 농도가 검량선 범위를 초과 하였을 경우에는 에탄올로 검량선 내의 농도가 되게 희석하여 재 측정 하였다.

기기분석

향신료 중 안식향산, 소브산 및 프로피온산을 HPLC와 GC로 분석할 경우 향신료 자체 matrix의 간섭이 심해서 분석하기가 쉽지 않고, 좀 더 낮은 함량을 분석하기 위하여 LC-MS/MS (6410 Triple Quad; Agilent Co., Santa Clara, CA, USA)와 GC-MS (QP2010 Plus; Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 기기분석 하였다. 안식향산과 소브산을 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 사용하였고 분석용 컬럼은 Zorbax XDB-C18 (4.6 i.d. \times 150 mm, 1.8 μm , Agilent co.)을 사용하였으며 온도는 40°C로 설정하였다. 이동상은 0.2 mM ammonium acetate와 acetonitrile를 7분 동안은 90:10

Table 1. Analytical conditions of LC-MS/MS for benzoic acid and sorbic acid

Parameter	Condition						
Ionization mode	Electrospray ionization (ESI, negative)						
Column	Zorbax XDB-C ₁₈ column (4.6 mm \times 150 mm, 1.8 μm)						
Column temp.	40°C						
Flow rate	0.2 mL/min						
Injection Volume	10 μL A: 0.2 mM ammonium acetate B: acetonitrile						
Mobile phase	Time (min)	0.0	3.0	7.0	10.0	10.1	12.0
	A (%)	90	90	10	10	90	90
	B (%)	10	10	90	90	10	10
Gas	N ₂						
Gas temperature	325°C						
Analysis mode	MRM						
Capillary voltage	4000 V						
Cone voltage	80 V (benzoic acid), 75 V (sorbic acid)						
Collision energy	3 eV (benzoic acid), 2 eV (sorbic acid)						
Precursor/product ion (m/z) ¹⁾	121/77 (benzoic acid), 111/67 (sorbic acid)						

¹⁾Derived from [M-H]⁻

비율로 흘려주다가 3분 동안은 10:90 비율로 설정하여 0.2 mL/min 유속으로 흘려주었고 injection volume 10 μL 로 분석하였다. 질량분석기로는 전기 분무 이온화(electrospray ionization, ESI) 방식을 이용하였으며, MRM 조건은 안식향산의 precursor ion (m/z)이 121, product ion (m/z)은 77이었고 소브산의 precursor ion (m/z)이 111, product ion (m/z)은 67을 선정하여 분석하였고 이외의 product ion은 감도가 낮아서 선정에서 제외하였다. LC-MS/MS 크로마토그램 상의 피크 머무름 시간(retention time)은 안식향산은 2.7분, 소브산은 3.2분이었고, 자세한 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 프로피온산 분석에는 GC-MS를 이용하였고 분석용 컬럼은 HP-FFAP (0.32 mm I.d. \times 30 m, 0.25 μm , Agilent co.)를 사용하였다. 오븐 온도는 40°C에서 180°C까지 분당 26°C씩 승온한 후 180°C에서 3분간 정지하는 오븐 온도조건으로 설정하였고 주입구와 검출기의 온도를 140°C로 설정하였다. 캐리어 가스는 헬륨을 사용하여 3.4 mL/min으로 흘려주며 시료는 1 μL 를 주입하여 분석하였다. 질량분석기는 전자충격이온화(electron-impact ionization, EI) 방식을 이용하였으며, 70 eV 이온화에너지를 사용하였고 특성이온(m/z)으로 74, 57, 45를 정성 및 정량 분석에 이용하였고 이온들 중 가장 감도가 높은 특성이온(m/z) 74를 정량이온으로 선택하여 정량하였다(Table 2). 또한, 시험용액의 정성 확인에서 프로피온산 표준용액의 특성이온(m/z)간의 이온세기의 비(response ratio)와 시험용액의 이온세기의 비를 비교하여 이온세기의 비가 국제식품위원회(CODEX)에서 제시하는 $\pm 30\%$ ²⁹⁾이내에서 일치하고 GC-MS 크로마토그램 상의 피크 머무름 시간(retention time)인 4.1분과 일치할 때 정성 확인하였다.

Table 2. Analytical conditions of GC-MS for propionic acid

Instrument	Parameter	Condition
GC	Column	HP-FFAP (0.32 mm i.d. \times 30 m, 0.25 μm)
	Oven temp. program	40°C \rightarrow raising to 180°C with rate of 26°C/min and holding 3 min
	Inlet temperature	140°C
	Injector temperature	140°C
	Injection volume	1 μL
	Split ratio	Splitless
	Carrier	Helium, 3.4 mL/min
MS	Ionization mode	EI
	Electron impact mode	70 eV
	Selected ion (m/z)	74 ¹⁾ , 57, 45
	MS ion source temperature	140°C

¹⁾Quantification ion

Table 3. Linearity (r^2), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and recovery of benzoic acid, sorbic acid and propionic acid

Compound	r^2	LOD ¹⁾ (mg/L)	LOQ ²⁾ (mg/L)	Concentration spiked (mg/L)	Recovery (%) \pm RSD ³⁾ (%) (n = 3)	
					Black pepper	Turmeric
Benzoic acid	0.9997	0.01	0.03	0.5	106.9 \pm 2.4	81.8 \pm 2.7
				2.0	93.9 \pm 3.8	90.0 \pm 1.2
				10.0	98.7 \pm 1.6	97.6 \pm 2.1
Sorbic acid	0.9994	0.015	0.05	0.5	104.9 \pm 3.4	100.1 \pm 1.1
				2.0	92.3 \pm 4.8	92.7 \pm 0.8
				10.0	104.7 \pm 2.1	102.1 \pm 1.6
Propionic acid	0.9995	0.05	0.16	0.5	98.3 \pm 2.4	94.5 \pm 2.7
				2.0	90.4 \pm 1.1	96.6 \pm 3.6
				10.0	112.1 \pm 2.9	90.4 \pm 0.6

¹⁾LOD: Limit of detection = 3.3 σ /S²⁾LOQ: Limit of quantification = 10 σ /S σ = Standard deviation of the response

S = Slope of the calibration curve

³⁾RSD (%): Relative standard deviation**Table 4.** Range and mean concentrations of benzoic acid, sorbic acid and propionic acid of 493 samples with 41 commodities

Commodity	Tested Sample	Benzoic acid			Sorbic acid			Propionic acid		
		Detection rate (%)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)	Detection rate (%)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)	Detection rate (%)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)
Turmeric (dry)	42	19	ND ¹⁾ -71.47	4.29	7	ND-6.50	0.19	100	0.56-4.99	1.58
Mustard (dry)	19	11	ND-2.16	0.18	0	ND	ND	100	0.64-3.53	1.35
Cinnamon (dry)	31	100	54.40-391.99	167.15	0	ND	ND	68	ND-19.25	4.56
Coriander (fresh)	3	0	ND	ND	0	ND	ND	100	0.96-1.27	1.10
Pepper (fresh)	5	0	ND	ND	60	ND-1.26	0.25	100	0.67-1.36	0.96
Pepper (dry)	31	71	ND-25.90	4.80	97	ND-5.42	1.86	100	1.53-31.56	5.86
Lamp leaf (fresh)	2	0	ND	ND	0	ND	ND	50	ND-5.63	2.82
Rosemary (fresh)	3	0	ND	ND	0	ND	ND	100	0.83-1.32	1.10
Rosemary (dry)	15	0	ND	ND	0	ND	ND	93	ND-12.34	5.43
Garlic (fresh)	11	0	ND	ND	0	ND	ND	82	ND-53.88	11.05
Garlic (dry)	5	0	ND	ND	0	ND	ND	100	1.18-1.59	1.40
Myrr (dry)	6	0	ND	ND	33	ND-1.79	0.41	83	ND-25.71	13.12
Basil leaf (fresh)	5	0	ND	ND	0	ND	ND	80	ND-6.15	2.15
Basil leaf (dry)	14	29	ND-45.69	3.77	71	ND-57.70	22.79	100	1.16-22.45	8.22
Basil seed (dry)	5	0	ND	ND	20	ND-0.67	0.13	100	0.97-2.81	1.54
Peppermint (dry)	12	92	ND-34.52	15.58	0	ND	ND	50	ND-12.31	4.20
White pepper (dry)	7	0	ND	ND	0	ND	ND	100	1.28-171.97	51.48
Black pepper (dry)	23	26	ND-3.32	0.43	0	ND	ND	96	ND-4.44	1.84
Chinese pepper (dry)	19	5	ND-1.47	0.08	0	ND	ND	74	ND-6.92	3.15
Ginger (fresh)	11	0	ND	ND	0	ND	ND	91	ND-188.21	19.35
Ginger (dry)	10	50	ND-30.73	4.71	0	ND	ND	100	0.69-110.77	14.29
Saffron (dry)	5	40	ND-1.52	0.49	60	ND-1.88	0.87	80	ND-11.85	5.09
Onion (fresh)	15	0	ND	ND	27	ND-0.74	0.18	27	ND-1.28	0.20
Onion (dry)	6	0	ND	ND	0	ND	ND	67	ND-1.22	0.70
Oregano (dry)	5	0	ND	ND	20	ND-0.67	0.13	60	ND-9.00	4.14

Table 4. (Continued) Range and mean concentrations of benzoic acid, sorbic acid and propionic acid of 493 samples with 41 commodities

Commodity	Tested Sample	Benzoic acid			Sorbic acid			Propionic acid		
		Detection rate (%)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)	Detection rate (%)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)	Detection rate (%)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)
Bay leaves (dry)	16	0	ND	ND	0	ND	ND	81	ND-75.97	16.07
Nutmeg (dry)	17	0	ND	ND	18	ND-2.20	0.22	71	ND-5.61	1.61
Perilla Frutescens (dry)	10	80	ND-10.12	3.36	50	ND-4.64	1.00	70	ND-58.86	19.12
Clove (dry)	19	100	54.10-263.18	134.89	95	ND-16.90	4.75	21	ND-5.59	0.66
Cardamon (dry)	7	86	ND-104.75	66.04	14	ND-0.58	0.08	100	1.96-5.06	3.76
Caraway (dry)	3	0	ND	ND	0	ND	ND	100	1.23-4.79	3.47
Curry leaf (dry)	2	100	1.74-4.38	3.06	0	ND	ND	100	2.72-6.95	4.84
Coriander (dry)	20	10	ND-2.13	0.23	0	ND	ND	45	ND-3.21	0.81
Cumin (dry)	15	33	ND-3.01	0.43	0	ND	ND	93	ND-4.76	2.49
Thyme (dry)	14	0	ND	ND	0	ND	ND	57	ND-7.32	3.21
Parsley (fresh)	2	0	ND	ND	0	ND	ND	0	ND	ND
Parsley (dry)	7	43	ND-4.11	0.59	14	ND-1.02	0.15	86	ND-17.78	9.91
Paprika (fresh)	11	91	ND-1.84	0.94	0	ND	ND	91	ND-0.96	0.51
Star anise (dry)	20	80	ND-24.69	3.62	15	ND-0.96	0.12	95	ND-18.87	3.89
Fenugreek seed (dry)	5	0	ND	ND	0	ND	ND	100	0.75-8.14	3.37
Fennel (dry)	15	7	ND-1.32	0.09	0	ND	ND	93	ND-4.54	1.40
Total	493	33	ND-391.99	18.38	19	ND-57.70	1.03	81	ND-188.21	5.27

¹⁾ND: not detected \leq LOQ

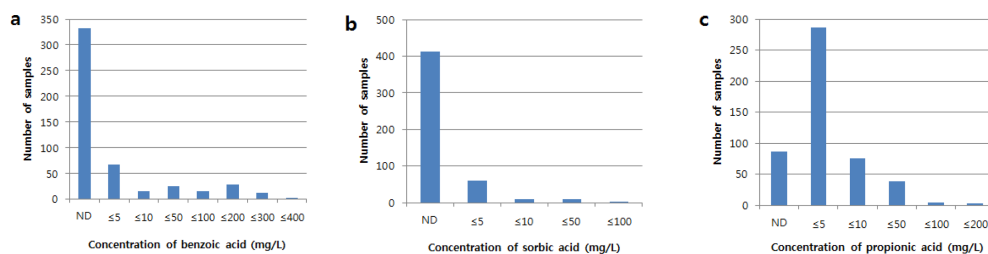


Fig. 1. Concentration distributions of benzoic acid (a), sorbic acid (b), propionic acid (c) with the number of samples.

시험법 유효성 검증

시험법의 유효성 검증을 위하여 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification), 회수율(recovery)을 구하였다. 유효성 검증에 관련된 실험은 모두 3반복으로 수행하였다. 안식향산과 소브산은 0.05-1.0 mg/L, 프로피온산은 0.1-100 mg/L의 농도에서 직선성을 평가하였으며, 각 농도별로 세기(intensity)를 측정하여 검량선을 작성하여 결과는 상관계수(correlation coefficient, r^2)로 표현하였다. 검출한계와 정량한계는 $3.3 \times \sigma/s$, $10 \times \sigma/s$ (σ : standard deviation, s : slop)로 기준을 구하였다. 분석방법의 정확한 평가를 위한 분석성분의 회수율 시험은 후추와 강황 시료에 3가지 농도로 표준물질을 첨가한 후 전처리 과정을 거쳐 3회씩 분석하여 각 농도를 구한 다음 첨가 농도 대비 회수된 농도를 계산하여 회수율을 측정하였다.

Results and Discussion

시험법 유효성 검증 결과

안식향산, 소브산과 프로피온산의 직선성은 상관계수(r^2) 값이 0.999 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다. 안식향산, 소브산, 프로피온산의 검출한계는 각각 0.01 mg/L, 0.015 mg/L, 0.05 mg/L, 정량한계는 각각 0.03 mg/L, 0.05 mg/L, 0.16 mg/L으로 측정되었다. 회수율은 안식향산의 경우 81.8-106.9%, 소브산은 92.3-104.9%, 프로피온산은 90.4-112.1%의 범위로 측정되어 양호한 결과를 보였다(Table 3). 이러한 결과는 본 연구의 분석법이 타당함을 보여준다. 분석결과의 불검출(not detected, ND)은 정량한계에 희석배수를 곱한 값을 적용하여 그 이하는 불검출로 처리하였다. 안식향산과 소브산은 희석배수 10배를 적용하여 각각

0.3 mg/L, 0.5 mg/L이하는 불검출로 처리하였고, 프로피온산은 희석배수 2배를 적용하여 0.32 mg/L이하는 불검출로 처리하였다(Table 4, Fig. 1).

안식향산 함량

향신료 시료에 대해 안식향산의 검출률, 검출범위 및 검출량 결과를 품목에 따라 Table 4에 나타내었다. 안식향산은 향신료 493건 중 165건에서 검출되어 33.5%의 검출률을 보였으며, 계피(54.40-391.99 mg/L), 정향(54.10-263.18 mg/L)과 카더몬(ND-104.75 mg/L)이 향신료 시료 중 가장 높은 검출범위를 나타내었고, 고수, 고추, 램프잎, 로즈마리, 마늘, 몰약, 바질잎, 생강, 양파, 오레가노, 월계수, 육두구, 캐러웨이씨, 타임, 파슬리, 호로파씨 등에서는 안식향산이 검출되지 않았다. 평균 검출량은 계피가 167.15 mg/L으로 가장 높았으며, 그 다음 정향 134.89 mg/L, 카더몬 66.04 mg/L, 박하 15.58 mg/L 순으로 높게 검출되었다. 이러한 결과는 다류와 향신료 중의 안식향산을 분석한 Kim 등¹⁷⁾의 연구결과와 비교 시 계피, 정향, 박하, 강황, 고추는 모두 이번연구결과의 검출범위 안에 들며, 겨자, 후추, 생강, 월계수의 경우 이번 연구결과보다 더 높게 검출되었다. 또한, 2013년 식품의약품안전처의 “건강기능식품원료 중 천연유래 보존료 함유량조사” 연구결과³⁰⁾에서 박하의 경우 이번 결과와 유사한 검출량을 보였으나 계피의 경우 2건 모두에서 불검출이었다. 이러한 결과로 보아 다른 문헌과 비교해 보면 품목별로 검출량이 유사하거나 상이한 것을 알 수 있었다. 그러나 기존의 연구는 품목별로 1-3건 내외를 분석한 결과로 이번 연구에서는 품목별로 최소 2건에서 최대 42건을 조사하여 품목별 검출 범위의 신뢰성을 높였다고 할 수 있겠다.

소브산 함량

향신료 시료에 대해 소브산의 검출률, 검출범위 및 검출량 결과를 품목에 따라 Table 4에 나타내었다. 소브산은 향신료 493건 중 88건에서 검출되어 검출률은 17.8%이며 바질잎(ND-57.70 mg/L)과 정향(ND-16.90 mg/L)이 높은 검출범위를 나타내었으나 그 이외에 강황, 고추, 몰약, 바질씨, 샤프란, 양파, 육두구, 자소엽 등은 7 mg/L이하로 낮게 검출되었다. 또한, 겨자, 고수, 로즈마리, 마늘, 바질잎, 백후추, 산초, 생강, 양파, 월계수, 캐러웨이씨, 커리잎, 코리앤더, 큐민, 타임, 파슬리, 파프리카, 호로파씨, 회향 등에서는 소브산이 검출되지 않았다. Kim 등¹⁷⁾의 연구에서 겨자, 계피 중 소브산이 검출되지 않은 것과, 건강기능식품원료 중 천연유래 보존료 함유량조사²⁹⁾에서 박하와 계피 중 소브산이 검출되지 않은 것, Hiroki 등¹⁶⁾이 마늘에서 소브산이 검출되지 않은 것 등은 본 연구의 결과와 일치하였다.

프로피온산 함량

향신료 시료에 대해 프로피온산의 검출률, 검출범위 및 검출량 결과를 품목에 따라 Table 4에 나타내었다. 프로피온산은 향신료 493건 중 398건에서 검출되어 검출률은 80.7%로 건조하지 않은 생 파슬리를 제외하고는 모든 품목에서 프로피온산이 검출되었다. 검출범위는 생강(ND-188.21 mg/L), 백후추(1.28-171.97 mg/L), 월계수(ND-75.97 mg/L), 자소엽(ND-58.86 mg/L), 마늘(ND-53.88 mg/L) 순으로 높은 검출범위를 보였다. 평균 검출량은 백후추가 51.48 mg/L으로 가장 높았으며, 그 다음 생강, 자소엽, 월계수, 몰약 순으로 높게 검출되었다. 건강기능식품원료 중 천연유래 보존료 함유량조사²⁹⁾에서 박하와 계피 중 프로피온산 함량이 이번 결과와 유사한 검출량을 보였다. 이렇게 대부분의 품목에서 프로피온산이 검출된 것은 프로피온산이 박테리아 발효에 의해 생성되며⁵⁾, 지방산의 산화에 의해 중간 대사산물로 발생되고¹²⁾, 아미노산이 분해되면서 생성되는 대사산물 중 하나로 보고¹³⁾된 것에 기인하여 미량이지만 대부분 품목에서 검출된 것으로 사료된다. 프로피온산은 특히 발효과정에서 더 많이 발생하는데 Park 등³¹⁾의 연구에서 감식초 10일차에서는 1.7 ppm이 1년 후에는 1773.9 ppm까지 높아진다는 연구보고가 있었고, Kanavouras 등²⁴⁾의 연구에서는 간수를 이용해 올리브를 염장기간별로 프로피온산 함량을 조사하였는데 1주차에서는 156.59 ppm이 21주차에서는 451.74 ppm으로 증가되었음을 보고하였다. 따라서 향신료의 저장 방법, 수분함량 등에 따라 같은 품목에서도 프로피온산 함량이 차이가 날 수 있음을 보여준다. 이번 연구에서도 흑후추 보다 걸쭉질을 탈각한 후 유통되는 백후추의 프로피온산 함량이 높은 것은 이러한 이유 때문으로 사료된다.

향신료 중 안식향산, 소브산, 프로피온산 함량 분포

향신료 중 안식향산, 소브산, 프로피온산 함량 분포를 Fig. 1에 나타내었다. 안식향산은 총 493건 중 165건(33.5%)에서 검출되었으며, 정량한계 이상 검출되면서 10 mg/L이하의 낮은 농도로 검출된 건수는 81건(16.4%)이었고 100 mg/L이상 높은 농도로 검출된 건수는 계피 27건, 정향 12건, 카더몬 2건 등 총 41건(8.3%)으로 계피에서 최대 391.99 mg/L이 검출되었다. 향신료 중 안식향산 함량은 소브산이나 프로피온산보다 높은 농도로 검출된 품목 및 시료가 많았다. 소브산은 88건(17.8%)에서 검출되어 안식향산이나 프로피온산에 비해 불검출률이 가장 높았다. 정량한계 이상 검출되면서 10 mg/L이하의 낮은 농도로 검출된 건수는 69건(14.0%)이었고 100 mg/L이상 높은 농도로 검출된 건수는 없었으며, 바질잎에서 최대 57.7 mg/L이 검출되었다. 프로피온산은 총 493건 중 398건(80.7%)이 검출되었고 많은 시료에서 정량한계 이상 검출되었다. 정량한계 이상 검출되면서 10 mg/L이하의 낮은 농도로 검출된

건수는 361건(73.2%)으로 검출률이 높았고 100 mg/L 이상 높은 농도로 검출된 시료는 생강 2건과 백후추 1건이었으며 건조하지 않은 생강에서 최대 188.21 mg/L이 검출되었다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처 연구개발사업(15161MFDS009)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 향신료 중 천연유래 보존료의 함유량을 조사하기 위하여 안식향산, 소브산 및 프로피온산의 함유량을 분석하였다. 향신료 중 안식향산 및 소브산 함량은 액체크로마토그래프 질량분석기(LC-MS/MS)를 이용하였고, 프로피온산 함량은 가스크로마토그래프 질량분석기(GC-MS)를 이용하였다. 에탄올을 이용하여 용매추출 후 원심분리 후 농축하는 방법으로 전처리 방법을 확립하였고, 직선성, 검출한계, 정량한계, 회수율 측정으로 분석방법을 검증하였다. 향신료 493건 수거하여 분석한 결과, 안식향산, 소브산, 프로피온산은 각각 165건, 88건, 398건에서 검출되었다. 안식향산, 소브산, 프로피온산의 검출 범위는 각각 불검출-391.99 mg/L, 불검출-57.70 mg/L, 불검출-188.21 mg/L이었다. 안식향산, 소브산, 프로피온산의 평균 검출량이 가장 높게 나타난 품목은 각각 계피(167.15 mg/L), 바질잎(22.79 mg/L), 백후추(51.48 mg/L)이었다. 본 연구에서 확립된 분석방법은 다양한 향신료를 대상으로 낮은 함량의 천연유래 보존료(안식향산, 소브산, 프로피온산) 분석에 적합한 방법이며, 분석결과는 향신료의 천연유래 보존료 함유량을 알 수 있는 근거자료이다. 따라서, 본 연구의 결과는 향후 식품 검사 시 보존료 사용기준 위반 판정으로 인한 민원제기나 국가간 무역마찰 시 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

References

1. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Korean food additives codes, Standards and specifications of food additives. (Notice 2016-32).
2. Code of Federal Regulation (CFR): Title 21, Food and drugs, parts 170 to 199, §184.1021 Benzoic acid, Revised as of April 1 (2013).
3. Sieber, R., Büttikofer, U., Bosset, J. O.: Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *Int. Dairy J.*, **5**(3), 227-246 (1995).
4. Lück, E., Jager M., Raczek, N.: Ashford's dictionary of industrial chemicals. third edition, 8482 (2011).
5. Code of Federal Regulation (CFR): Title 21, Food and drugs, parts 170 to 199, §184.1018 Propionic acid, Revised as of April 1 (2013).
6. Howard, G., Stadtman, E. R.: Propionic acid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **235**(8), 2238-2245 (1960).
7. Gobetti, M. & Corsetti, A.: Lactobacillus sanfrancisco a key sourdough lactic acid bacterium. A Review. *Food Microbiol.*, **14**, 175-187 (1997).
8. Radin, M.J.: A note on the quantity of benzoic acid and contained in prune and cranberries. *Ind. & Eng. Chem.* **6**, 518 (1914).
9. World Health organization (WHO): Concise International Chemical Assessment 26. Benzoic acid and sodium benzoate. (2005).
10. Sieber, R., Büttikofer, U., Bosset, J.O., Rüeegg, M.: Benzoesäure als natürlicher bestandteil von lebensmittln-eine Übersicht. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **80**, 345-362 (1989).
11. Sieber, R., Büttikofer, U., Baumann, E., Bosset, J.O.: Ueber das vorkommen der benzoesäure in sauermilchprodukten und käse. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **81**, 484-493 (1990).
12. World Health organization (WHO): Food Additives Series 5, Propionic acid and its calcium, potassium and sodium salts. (1974).
13. Environmental Protection Agency (EPA): Reregistration eligibility document propionic acid and salts list D case 4078. (1991).
14. Nagayama, T., Nishijima, M., Yasuda, K., Saito, K., Kamimura, H., Ibe, A., Ushiyama, H., Nagayama, M., Naoi, Y.: Benzoic acid in fruits and fruit products. *J. Food Hyg. Saf.*, **24**(4), 416-422 (1983).
15. Nagayama, T., Nishijima, M., Yasuda, K., Saito, K., Kamimura, H., Ibe, A., Ushiyama, H., Naoi, Y., Nishima, T.: Benzoic acid in agricultural food product and processed foods. *J. Food Hyg. Saf.*, **27**(3), 316-325 (1986).
16. Kubota, H., Ohtsuki, T., Hara, T., Hirakawa, Y., Iizuka, T., Tanaka, M., Iwamura, M., Sato, K., Kawamura, Y.: Search for benzoic acid and sorbic acid in fruits, nets, spices, and their processed foods. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **17**(1), 54-61 (2010).
17. Kim, M.C., Park, H.K., Hong, J.H., Lee, D.Y., Park, J.S., Park, E.J., Kim, J.W., Song, K.H., Shin, D.W., Mok, J.M., Lee, J.Y., Song, I.S.: Studies on the naturally occurring benzoic acids in foods. Part(I) - Naturally occurring benzoic acid and sorbic acid in several plants used as teas or spices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(5), 1144-1152 (1999).
18. Choung, M.G.: Variation of bioactive component contents in plant parts of Paeonia lactiflora pall. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **10**(5), 392-398 (2002).
19. Baek, K.A., Kang, H.K., Shin, M.H., Park, J.J., Kim, J.D., Park, S.M., Lee, M.Y., Im, J.S.: A study of the levels of natural preservatives in wild plants. *Korean J. Food Preserv.*, **21**(4), 529-535 (2014).
20. Kim, J.K., Kim, C.S.: The taste components of ordinary Korean soy sauce. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **23**, 89-105 (1980).

21. Lee, E.H., Koo, J.K., Cha, Y.J., Ahn, C.B., Oh, K.S.: Volatile constituents of fermented big eyed herring and slimy. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**, 437-441 (1985).
22. Lee, S.H., Lee, M.Y., Lim, S.R., Bae, J.H.: Determination of amounts of benzoic acid and propionic acid in fermented soybean products. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**(5), 565-570 (2013).
23. Pihlsgard, P., Larsson, M., Leufven, A., Lingnert, H.: Volatile compounds in the production of liquid beet sugar. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4844-4850 (2000).
24. Kanavouras, A., Gazouli, M., Tzouveleki Leonidas, L., Petrakis, C.: Evaluation of black table olives in different brines. *Grasasy Aceites.*, **56**(2), 106-115 (2005).
25. Thierry, A., Maillard, M., Hervée, C., Richoux, R., Ortal, S.: Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chem.*, **87**, 439-446 (2004).
26. Manolaki, P., Datsiari., Alichanidis, E.: Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chem.*, **98**, 658-663 (2006).
27. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Korean food codes, Standards and specifications of foods. (Notice 2015-34).
28. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Livestock product in the processing standards and ingredient specifications. (Notice 2015-94).
29. CODEX Alimentarius Commission. Guidelines on the use of mass spectrometry (MS) for identification, confirmation and quantitative determination of residues, CAC/GL 56 (2005).
30. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Contents monitoring of natural preservatives in raw materials of functional foods. The Annual Report of Ministry of Food and Drug Safety. (2013).
31. Park, E.R., Lee, S.K., Hwang, S.H, Mun, C.S, Gwak, I.S, Kim, O.H., Lee, K.H.: Monitoring of natural preservative levels in food products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**(12), 1640-1646 (2008).