

Gas Chromatography에 의한 Dicarbonyl類의 分離定量에 관한 研究

辛 美 慶 · 南 昌 祐

同德女子大學 食品營養學科

(1976년 3월 2일 수리)

Studies on the Separation and Determination of Dicarbonyl Compounds by Gas Chromatography

by

Mee-Gyung Sin and Chang-Woo Nam

Depart. of Food and Nutrition, Dong Duck Women's College

(Received March 2, 1976)

Abstract

The separation and determination of dicarbonyls such as diacetyl, methylglyoxal and triose reductone in their mixed aqueous solution were carried out by means of gas chromatography with transformation of these compounds into quinoxaline derivatives with o-phenylenediamine.

A column used for this experiment was consisted of Celite 545 (80-100 mesh) coated with 5% Silicon Gum SE-30. The column temperature was 180°C.

It is desirable that this approach will be applicable to dicarbonyl study in gas chromatographic determination.

序 論

糖類를 알칼리와 함께 加熱하면 reductone類⁽¹⁾와 methylglyoxal (MG) 및 diacetyl (Dac)과 같은 dicarbonyl化合物⁽²⁾이 생기며 이들은 o-phenylenediamine (OPD)과 반응하여 quinoxaline 誘導體를 생성한다는 것은 이미 오래전부터 알려진 사실이다.

高木들^(3,4,5)은 quinoxaline 誘導體의 polarograph 還元波를 이용하여 還元糖의 定量法을 개발하였고, 和佐, 武者들^(6,7)은 糖類의 quinoxaline 誘導體의 polarograph 的 舉動과 그의 定量에 대하여 研究한 바 있다. 한편 筆者中의 한 사람인 辛⁽⁸⁾도 OPD 縮合物을 이용한 polarograph法으로 食品中의 L-ascorbic acid (AA) 및 dehydroascorbic acid (DAA)의 定量時 quinoxaline 誘導體의 舉動을 검토하였다. 그 결과 MG-OPD, Dac-OPD 및 dehydrotriase reductone (DTR)-OPD는 어느 것이나 넓

은 pH범위에서 2段의 還元波를 나타냈으나 모두 DAA-OPD의 halfwave potential과는 다르기 때문에 DAA의 定量에는 별로 영향을 미치지 않음을 알았다. 그러나 MG와 Dac는 第1波 및 第2波가 모두 거의 同一電位에 還元波를 나타내어 이들이 混在할 경우에는 重複波로 되고 또한 이들의 第1波는 DTR의 第2波를 방해하는 것을 관찰하였다.

따라서 本研究은 이것들의 分離定量을 목적으로 아직 報告된 바 없는 gas chromatography (GLC) 方法을 이용하여 分離定量할 수 있는 條件을 검토하였던 바 MG 및 Dac가 함께 섞여 있을 때도 同時定量이 가능함을 알았기에 그 결과를 報告한다.

材料 및 方法

1. 供試材料

MG, Dac 및 reductinic acid (RA)는 Merck의 특급품

을 사용하였고, methylquinoxaline (MQ)은 日本大阪府立大學農學部 生物物理化學研究室에서 분양받은 것을 사용하였다. Triose reductone (TR)은 野村⁽⁹⁾의 방법을 참고하여 glucose를 알칼리로 처리하여 合成하였고, DTR과 dehydroreductinic acid (DRA)는 TR 및 RA를 pH 3.8의 acetate buffer 또는 증류수에 녹여 브롬으로 酸化시켜 調製하였다. 기타 일반시약은 시판의 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 試料의 調製

MG, DAc, DTR를 각각 $5.80 \times 10^{-3}M$, $1.14 \times 10^{-2}M$ 및 $1.00 \times 10^{-2}M$ 이 되도록 증류수에 녹이고, 여기에 같은 농도의 OPD용액을 가하여 25°C에서 30분간 반응시켜서 quinoxaline誘導體를 만든 후 이것을 같은 量의 클로로포름으로 5분간 세게 진탕추출하여 GLC 被檢液으로 사용하였다. 또 D-glucose 180mg을 0.1N-NaOH 10ml에 용해하고 같은 농도의 OPD를 가하여 沸騰水槽에서 5分間 정확히 가열한 후 急冷시켜서 반응을 정지시키고 반응액을 클로로포름으로 抽出하여 試料로 사용하였다.

3. 裝 置

Gas chromatography는 hydrogen flame ionization detector로 구비된 Yanagimoto GCG-550F에 內徑 3mm의 스텐레스 U字型 column을 사용하였으며, 5% Silicon Gum SE-30을 충전제로 사용하였다.

Polarography는 Yanagimoto 自動平衡記錄式 PB-4型을 사용하였다. span 電壓은 0~1.5V로 조절하였으며 전해액은 飽和甘汞電極(vs. SCE)을 照合極으로 하는 H-型의 것을 사용하였다.

結果 및 考察

1. MG, DAc, DTR의 OPD縮合物的 分離條件

Column 溫度, carrier gas流量 등을 달리하면서 이들 糖誘導體의 GLC상의 분리조건을 검토하였던바 Table 1에서 보여준 條件이 가장 알맞는 분리효과를 나타냈따라서 이 條件으로 얻어진 MG-OPD와 DAc-OPD의

Table 1. Conditions of the gas chromatographic analysis.

Stationary	5% Silicon Gum SE-30
Carrier materil	Celite 545 (80-100 mesh)
Column	Stainless Steel (3mm×2.25m)
Column temp.	180°C
Injection temp.	180°C
Carrier gas flow rate	N ₂ , 30ml/min H ₂ , 30ml/min
Chart speed	10mm/min

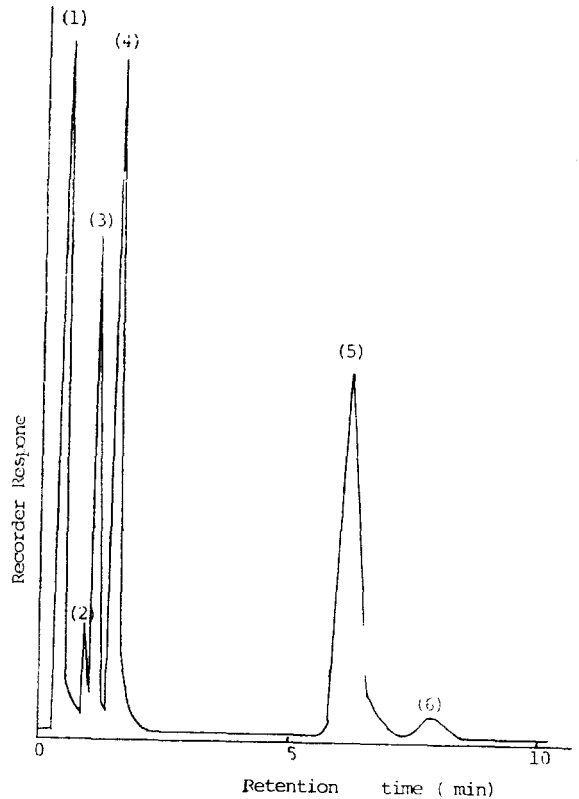


Fig. 1. Gas chromatogram of MG-OPD, DAc-OPD and n-octadecane.

- (1) Chloroform
- (2) OPD
- (3) MG-OPD
- (4) DAc-OPD (1st peak)
- (5) n-Octadecane
- (6) DAc-OPD (2nd peak)

gas chromatogram은 Fig. 1과 같다.

MG-OPD는 retention time (tr)이 1.15분에 한개의 peak가 나타났고, DAc-OPD는 1.15분과 7.9분에 두개의 peak를 나타냈다. DTR-OPD는 그 농도에서는 peak가 확실하지 않았기 때문에 抽出液을 감압농축하여 실시하였던 바 tr 1.15분에 아주 낮은 peak가 나타났다. 이 位置는 MG-OPD의 第1 peak와 같은 位置이며 共存할 경우에는 重複된다. DTR-OPD는 클로로포름 抽出에 의하여 溶媒層에 移動한 다음에 침전하기 때문에 DAc-OPD의 定量에는 지장이 없음을 확인하였다.

한편 클로로포름에 의한 MG-OPD, DAc-OPD의 抽出狀態를 polarograph에 의하여 검토하였던 바 어느 것이나 거의 100%의 抽出率을 보였다. 여기서 抽出率 100%라 함은 水層의 polarograph選元波高의 消失 및 回收率을 말한다.

2. pH의 影響

上記한 바와 같이 MG-OPD, DAc-OPD는 클로로포름

Table 2. Effects of pH on the chloroform extraction of MG-OPD and DAc-OPD.

Compound	pH	pH						
		2.2	4.0	5.4	6.0	7.0	8.0	10.0
MG-OPD		0.65	0.89	0.93	1.00	1.03	0.97	0.95
DAc-OPD	Peak 1	0.83	0.93	1.02	1.00	0.99	0.86	0.91
	Peak 2	—	—	0.75	1.00	1.00	1.03	—

All values are expressed as proportion of the peak height of chromatogram based on the value of pH 6.0 is 1.00.

에 의하여 거의 100% 抽出됨을 알았는데 이것은 pH 6.0에서의 결과이다. 이들 試料溶液의 pH를 달리하였을 때의 抽出率은 Table 2와 같으며, 그 수치는 *n*-Octadecane의 peak에 대한 비⁽¹⁰⁾로서 pH 6.0의 peak높이를 1.00으로 하였을 때의 비율이다. MG-OPD, DAc-OPD 모두 유사하게 pH 5.4~7.0에서 가장 높은 抽出率을 보여주고 있다.

3. 抽出物의 安定性

OPD의 縮合物을 클로로포름으로 抽出할 경우 MG-OPD 및 DAc-OPD가 클로로포름용액중에서 安定한지를 검토하기 위하여 그 抽出液을 15±2°C에서 5日間 저장하면서 매일 前記方法에 따라 일정량을 GLC에 걸고, 그 抽出 첫날의 peak를 기준으로 하여 각 저장기간에 따른 peak의 response를 본 결과 Table 3과 같다. 즉, MG-OPD, DAc-OPD 모두 저장 5日 후에도 調製 직후와 거의 변화가 없고 극히 安定하다는 것을 알았다. 또 pH 3.8에서 DTR-OPD에 대하여 검토하였던 바 MG-OPD, DAc-OPD에 비해서 그다지 좋은편이 못되었다.

Table 3. Stability of MG-OPD and DAc-OPD in chloroform phase during the keeping after extraction.

Compound	Keeping day				
	1	2	3	4	5
MG-OPD	1.00	1.00	0.96	0.94	0.99
DAc-OPD	1.00	1.06	0.96	0.95	1.01

All values are expressed as proportion of the peak height of chromatogram based on the value of 1st day after extraction, is 1.00.

4. 再現性

MG 및 DAc의 GLC에 의한 反復再現性を 검토하기 위하여 이들을 각각 $1.74 \times 10^{-2}M$ 및 $3.42 \times 10^{-2}M$ 이 되도록 混合水溶液을 만들어 같은 농도의 OPD용액을 가하여 반응시킨 후 클로로포름으로 抽出한 용액 2 μ l로 GLC를 실시하였다. 10回 反復한 再現性은 Table 4에서 보는 바와 같이 MG-OPD의 평균값은 1.96, 표준편차 0.05, DAc-OPD의 평균값은 2.28, 표준편차 0.03으

로서 어느 것이나 비교적 양호한 再現性이 있음을 확인하였다.

Table 4. Reproducibility of MG-OPD and DAc-OPD

	MG-OPD	DAc-OPD
a)	1.96	2.28
b)	10	10
c)	0.05	0.03

a) Average b) Experiment No. c) Standard deviation

5. 檢量線

MG-OPD, DAc-OPD 및 DTR-OPD의 농도를 달리하여 그 peak 높이로 만든 檢量線은 Fig. 2, Fig. 3과 같다. 특히 DTR-OPD만은 에틸에테르로 抽出한 것이며, 그 농도의 증가에 따라 peak比는 $2.00 \times 10^{-2} \sim 4.00 \times 10^{-2}M$ 에서만 直線關係를 나타내고, 그 이상의 농도에서는 정비례되지 않았다. 또 $200 \times 10^{-2}M$ 이하의 농도

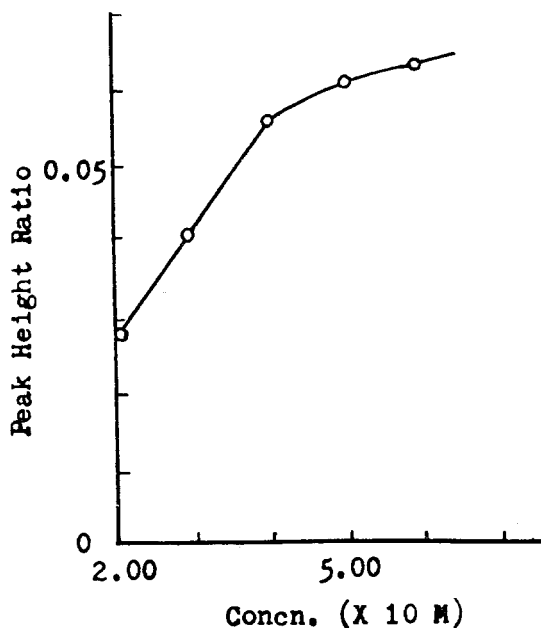


Fig. 2. Calibration curve of DTR-OPD.

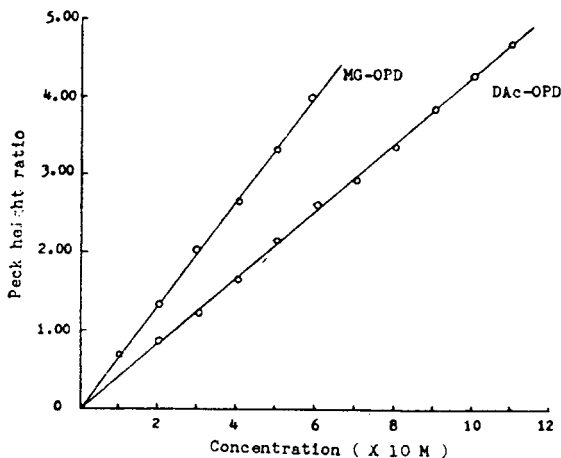


Fig. 3. Calibration curve of MG-OPD and DAc-OPD.

에서는 peak가 나타나지 않았는데, 이것은 에틸에테르에 의한 抽出率이 約 66%에 불과한데 기인된다고 생각된다. 또 MG-OPD와 DAc-OPD는 농도가 증가할 수록 peak比도 비례적으로 증가하였다.

6. 糖類의 dicarbonyl化條件

糖類의 dicarbonyl化되는 條件을 검토하기 위하여 먼저 glucose의 加熱時間, 농도 및 pH 등을 달리하면서 chromatogram상에 나타난 peak의 出現狀態를 보았다. 즉 加熱時間이 peak에 미치는 影響을 조사하기 위하여 試料의 調製에서 언급한 바와 같이 glucose를 알칼리에 처리한 후 pH조절없이 OPD와 반응시켰다. 이를 다시 클로로포름으로 抽出할 때 pH 6.0으로 조절하여, GLC에 걸어 본 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 t_R 1.15分(G_1), 1.55分(G_2), 2.00分(G_3), 3.25分(G_4) 및 3.65分(G_5)에 5개의 peak가 나타났는데 G_1 과 G_2 는 5分間 加熱處理에서도 확실한 peak가 나타나고 20分間까지는 가열시간에 따라 peak도 증가하였으나 그 이후는 거의 변화가 없었다.

Glucose의 농도가 chromatogram의 peak에 미치는 影響을 알기 위하여 glucose 60mg, 120mg, 180mg 및 240mg을 각각 알칼리에 處理한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 60mg에서는 G_1 이외의 peak는 확실하지 않고 120mg에서는 G_1, G_2 만 검출되다가 180mg에서는 $G_1 \sim G_5$ 의 5개의 peak가 나타났다. 즉 glucose의 농도가 증가할수록 peak의 數가 많아졌으나 240mg에서는 G_1 의 peak

Table 5. Effects of heating time on converting dicarbonyl compounds of glucose in alkaline solution.

Heating time(min)	Peak height				
	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5
5	3.22	0.05	0.02	0.03	0.05
10	3.46	0.08	0.02	0.03	0.05
20	3.63	0.10	0.02	0.03	0.05
30	3.56	0.10	0.02	0.03	0.05
40	3.62	0.12	0.02	0.03	0.06

가 scale over되었다. 또 G_1 의 peak높이의 增加는 glucose농도의 增加와 正比例하였으므로 本實驗의 條件下에서 G_1 은 定量的으로 生成된다는 것을 알았다.

Table 6. Effects of glucose concentration on their gas chromatograms.

Content of glucose (mg/10ml)	Peak height				
	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5
60	2.06	—	—	—	—
120	3.02	0.08	—	—	—
180	3.94	0.11	0.02	0.02	0.02

Glucose용액의 pH가 chromatogram에 미치는 影響을 조사하기 위하여 0.1N-NaOH (pH 13.0), 0.1N-HCl (pH 1.0) 및 pH 7.0의 McIlvain buffer solution으로 glucose의 농도를 0.1M이 되도록 만들어 前記方法에 의하여 chromatogram을 求해 본 결과 알칼리 加熱의 경우만 5개의 peak가 나타났고 中性 및 酸性에서 加熱한 것에는 peak가 확인되지 않았지만 OPD가 소비된 것을 보아 縮合反應은 進行되었다고 생각된다. 高木⁽³⁾은 quinoxaline의 生成反應은 알칼리성에 비하여 酸性에서 완만하다고 報告한 바 있는데 本實驗에서도 같은 결과를 얻었다.

Glucose 이외의 糖類의 dicarbonyl化가 어떠한 舉動으로 나타나는지를 보기 위하여 fructose, maltose 및 soluble starch를 각각 0.1M이 되도록 알칼리에 용해하여 上記와 같은 方法으로 處理한 후 chromatogram을 求하였던 바 어느 것이나 glucose와 같은 位置에 peak가 나타났으나 maltose와 soluble starch는 glucose 및 fructose에 비하여 peak가 낮았다. 이것은 二糖類 및 多糖類가 單糖類에 비하여 分解되는데 더욱 時間을 要하기 때문이라고 생각된다.

7. GLC에 의한 dicarbonyl化合物測定

食品分析에의 應用을 考慮하여 GLC에 의한 dicarbonyl化合物의 測定을 實驗해 본 결과, 이상의 實驗結果에

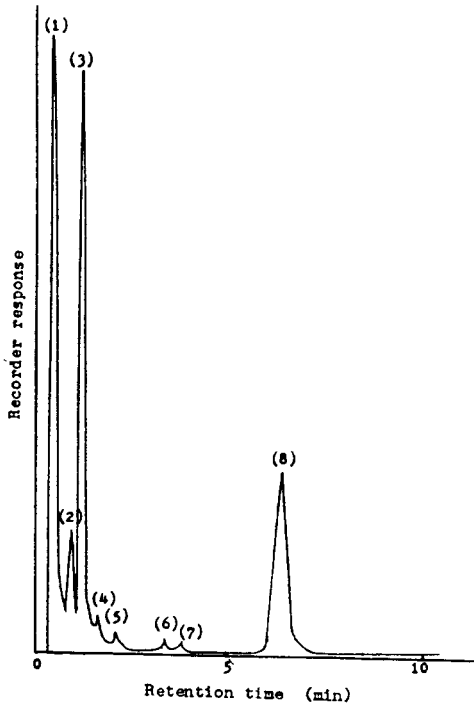


Fig. 4 Gas chromatogram of heated glucose and n-octadecane.

- | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| (1) chloroform | (2) OPD | (3) G ₁ -OPD |
| (4) G ₂ -OPD | (5) G ₃ -OPD | (6) G ₄ -OPD |
| (7) G ₅ -OPD | (8) n-octadecane | |

서 나타난 바와 같이 (Fig. 4) G₁~G₅의 5개의 peak가 나타났는데, G₁과 G₂는 표준 MG-OPD 및 DAc-OPD의 t_R과 일치함을 알았다. 이것을 다시 thin layer chromatography에 의하여 同定해본 결과 G₁은 MG-OPD, G₂는 DAc-OPD의 R_f值 및 그 빛갈이 모두 일치하여 同一物質임을 확인하였다.

要 約

Gas chromatography를 이용하여 methylglyoxal, diacetyl 및 triose reductone과 같은 dicarbonyl類를 分離測定할 수 있는 條件을 實驗하였던 바 다음과 같은 結果

를 얻었다.

1. MG, DAc, DTR의 混合物에 OPD를 반응시켜 quinoxaline 誘導體를 만들고 이것을 클로로포름으로 抽出하면 MG 및 DAc는 거의 100%抽出되었고, DTR은 에틸에테르에 抽出되었다.
2. SE-30을 충전제로 하여 얻어진 column 條件에서 MG-OPD와 DAc-OPD는 완전히 分離測定할 수 있었다.
3. 糖類中 glucose의 OPD 縮合物形成條件은 D-glucose 180mg을 0.1N-NaOH 용액 10ml에서 5分間 가열 후 OPD와 反應시켜 pH 6.0에서 클로로포름으로 抽出하여 GLC에 걸면 5개의 peak가 나타났고, 그 중에서 2개는MG-OPD와 DAo-OPD임을 확인하였다. 그러나 中性 및酸性加熱인 경우는 peak가 확실치 않았다.

文 獻

1. H. von Euler, U. Martius: *Liebigs Ann. Chem.*, 505, 73(1933).
2. 三寶捷, 林 金雄: 炭水化合物概論, 岩波書店(日本) (1949).
3. 高木正之助, 水谷眞也, 松田一郎, 小野宗三郎: レダクトンの化學と生化學シンポジウム, 於 日本福岡大(1970)
4. M. Takagi, Y. Gotoh, R. Hosogaki, S. Amano and S. Ono: *Starke*, 20, 215(1968).
5. M. Takagi: *Review of Polarography*, 16, 43 (1969).
6. W. Tamotsu, S. Musha: *Bull. Kyoto Chem. Soc. Japan*, 40, 1624(1967).
7. W. Tamotsu, S. Musha: *Bull. University of Osaka Pref. Series*, 17, 139(1968).
8. 辛美慶: 日本奈良女子大學 大學院修士論文(1973).
9. 野村男次, 福谷敬三: 日農産技研誌, 6, 163(1959).
10. M. Vecchi and K. Kaiser: *J. Chromatog.*, 26, 22 (1967).