

## 발색시약 Blue Tetrazolium Chloride를 이용한 잎담배중 환원당의 비색법적 정량.

이 문 수 · 김 신 일 · 김 찬 호\*

한국연초연구소

(1980. 10. . 접수)

### The Spectrophotometric Determination of Reducing Sugar in the Tobacco Leaves by Using a Color Developing Reagent, Blue Tetrazolium Chloride.

Moon-Soo Lee, Sin-Il Kim and Chan-Ho Kim\*

Korea Tobacco Research Institute

(Received Oct. .1980)

#### 초 목

Blue tetrazolium chloride를 발색시약으로 사용하여 잎담배중의 환원당을 흡수분광 광도변에 의해 정량하는 방법을 연구 하였다.

Blue tetrazolium과 환원당과의 환원반응에서 생성된 formazan dye의 극대흡수파장은 530nm였으며 fructose농도가 0.02mg/ml-0.14mg/ml범위내에서는 Beer-Lambert법칙에 잘 일치함을 보여 주었다. 이 방법에 의한 환원당 정량의 정확성을 알아보기 위하여 표준 fructose를 잎담배중에 첨가한 후 이 표준 환원당의 농도를 계산하여 보니, 당시의 농도보다 적은 값을 얻었다. 그러나 상대 오차-2%이하로서 비교적 분석적 재현성이 좋게 나타났다.

흡수분광광도계를 사용하지 아니하고 Visual read out 방법으로 환원당을 정량하였을 경우, 그 상대오차가  $\pm 10\%$ 범위로 나타났다.

#### ABSTRACT

The spectrophotometric determination of reducing sugar in the tobacco leaves was carried out by employing blue tetrazolium chloride as a color developing reagent.

The absorption maximum of formazan dye which is the product of the reaction between blue tetrazolium chloride and fructose was shown to be 530nm.

In the fructose concentration range of 0.02mg/ml-0.14mg/ml the calibration curve was well coincided to the law of Beer-Lambert. In order to take a look at the accuracy and/or recovery rate of fructose determination, the standard fructose was added to the

tobacco leaves and the concentration of this standard fructose was estimated. A little lower concentration of the standard fructose compared with the pure one in solution was observed. However, an excellent analytical recovery was revealed under the -2% of relative error limit. When we carried out the quantitative determination of this reducing sugar by the method of visual read-out (without using the spectrophotometer), the relative error was obtained to be  $\pm 10\%$ .

## 서 언

환원당 분석방법으로 잘 알려져 있는 Somogyi 법(9)은 실험조작을 함에 있어 소요되는 시간이 긴것으로 잘 알려져 있다.

최근에 널리 사용되고 있는 Autoanalyzer법(5, 3, 2)은 Auto-Technicon이 준비되어 있지 않은 곳에서는 잎담배중의 환원당을 정량분석 할수가 없으며 TPTAC(Tri-phenyl tetrazolium chloride)을 사용한 Mattson의 방법(6)이나 Wahnlich의 방법(10)도 조작이 복잡하거나 특별한 계측장비를 필요로 하고있다. Harvey는 Mattson의 분석방법을 변형하여서 잎담배중의 fructose간이정량 분석방법(4)을 정립하였지만 Mattson의 분석방법과 비슷하였다. 그리고 이Harvey의 방법은 TPTAC가 수용액에서 비수용성 formazan dye(8)가 형성되기 때문에 Acetone이나 pyridine과 같은 유기용매를 사용하여 염료를 용해시켜서 흡수분광을 관측해야하는 문제가 수반될 뿐만 아니라, 생성된 염료의 용해정도에서 오는 분석오차를 제거 시킬수가 없어서 분석값의 재현성에 의문점이 없지 않다.

본 실험에서는 Blue tetrazolium(3, 3-dianisole bis-4, 4(3, 5-diphenyl tetrazolium chloride)을 발색시약으로 사용하여Harvey 방법에서 우려가 되었던 용해성의 문제를 개선하고 가시부 파장 영역에서 흡수분광도를 측정할 수 있는 방법을 실험 하였다.

실험조작에 있어서도 실험실이나 field에서 활용이 될수 있도록 단순화 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시 료

실험에 사용한 잎담배시료는(Va.115, Hicks 청주 79년산) 지름 1mm이하의 분말시료로서  $80 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 3시간 건조한 시료를 사용하였다.

### 2. 장 치

흡광도는 Cary17D Spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

### 3. 시 약

Blue tetrazolium solution(9)의 조제는 blue tetrazolium chloride(Merck 특급) 100mg을 95% ethyl alcohol 100ml에 녹여서 갈색병에 넣어  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관한것을 반응시약으로 사용하였다.

추출용액은 빙초산 20ml와 99% ethyl alcohol 200ml를 증류수로 묽혀 1ℓ 가 되도록 조제하여 잎담배중의 fructose 추출용액으로 사용하였다. Alcohol-sodium hydroxide solution은 NaOH 80g을 증류수 200ml에 녹이고 ethyl alcohol로 묽혀서 1ℓ 가 되도록 조제하였으며, 이때의 NaOH의 농도는 2노르말에 해당이 된다.

표준 fructose용액은 D-fructose (Tokyo Kasei Co.) 특급 100mg를 정확히 평량하여 100ml 눈금플라스크에 취하고 추출용액으로 눈금까지 채운다음 이 용액을 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ml를 정확히 취하여 50ml 눈금플라스크에 넣고 활성탄70mg을 각각 첨가한 뒤, fructose 추출용액을 가하여 눈금까지 채운다음 걸음종이(Toyo filter paper 5. B)를 사용하여 거른용액을 표준 fructose용액으로 사용하였다. 이들 용액 각 1ml는 fructose 0.02, 0.04, 0.06, 0.08,

0.10, 0.12, 0.14mg에 해당된다.

잎담배 착색물질 제거를 위하여는 activated carbon(Wako Co., Darco, G-60)을 사용하였으며, 이외의 시약은 일반 실험실에서 사용이되는 시약을 필요에 따라 조제하여 사용하였다.

#### 4. 분석조작

a) Visual readout: 잎담배 시료200mg을 100ml 눈금플라스크에 취하고 활성탄150mg을 넣은 다음 추출용액으로 눈금까지 채운다.

때때로 흔들어 주면서 30분간 정치시킨뒤 거름종이를 사용하여 거른다.

거른 시료용액25ml을 취하여 50ml 눈금플라스크에 옮기고 추출용액으로 눈금까지 채운다. 그 다음 25ml 시험관에 위 용액 2ml을 정확히 취하고 alcoholic NaOH용액 5ml을 가하고 blue tetrazolium solution 2ml을 흔들어서 주면서 가하고, 즉시 어두운 곳에서 20분간 반응시키고 4N-HCl을 가하여 용액을 산성으로 하여 반응을 종결시킨다. Fructose표준용액도 같은 방법으로 조작하여 각각의 발색정도에 따라 시료용액과 대조하여 시료용액중에 함유된 fructose량을 계산한다.

b) Instrumental readout: Visual readout과 같은 방법으로 조작하여서 반응을 종결시킨 시료용액을 530nm에서 흡광도를 측정하고 측정값을 표준용액으로 작성한 검량선을 기준으로 다음식에 따라서 함량을 계산한다.

Fructose검량선은 fructose 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14mg/ml 표준용액을 취하여서 Visual readout의 조작과 같이하여 파장 530nm에서 각각 측정하여서 fructose의 함량에 대한 흡수 분광도의 값으로 작성한다.

계 산

$$\text{환원당 (\%)} = \frac{C \times 100}{S} \times 100$$

(fructose)

where C : 표준fructose 농도 (mg)  
S : 시료 무게 (mg)

#### 결과 및 고찰

0.08mg/ml의 fructose표준용액에 blue tetrazolium을 반응시켜서 측정된 흡수 스펙트럼은

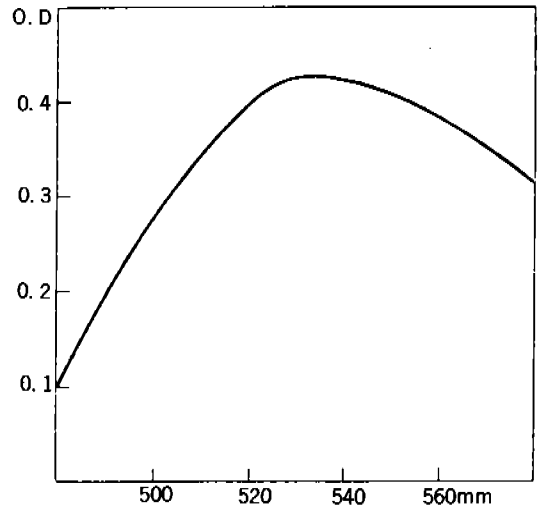
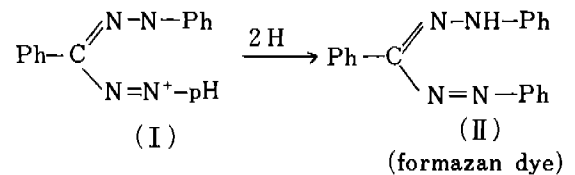


Fig. 1. Absorption spectrum of formazan dye in ethanol.

그림 1과 같이 가시부에서 흡수분광극대점이 나타났다. 흡수극대파장은 530nm-550nm였으며, 이 범위 안에서는 흡수 분광도가 거의 비슷한 값을 가짐을 알았다. 실험조건을 검토하기 위한 모든 실험에서는 파장530nm에서 흡수 분광도값을 측정하였다.

Tetrazolium계 화합물은 알카리성에서 fructose의 환원력에 의해 (II)와 같은 formazan dye가 형성되는데,



시험용액의 표면에서는 대기중의 산소에 의하여 (II) → (I)의 역반응이 일어날수 있을 것으로 생각되며, 이러한 현상은 흡수분광도의 값을 흔들리게하는 원인이 될 것으로 보인다. (II)

→ (I)의 역반응에 의한 흡수분광도 값의 감소 경향을 발색이후 경과시간에 따라 매5분마다 관찰한 결과 그림 2와 같았다. 이때, 시료 용액중

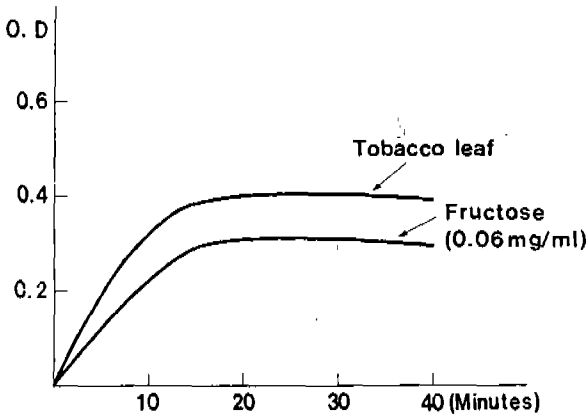


Fig. 2. The absorbance change at 530nm as a function of time.

의 fructose의 함량은 0.06mg/ml 였으며, 잎담배 시료는 fructose 함량이 10mg/100mg 이었으며 blue tetrazolium chloride solution의 첨가량은 실험조작에서와 같았다. Blue tetrazolium을 첨가하고 약15분을 경과할 때까지는 흡수분광도의 값이 완만하게 증가하였는데 위 반응식에서 (I) → (II)의 반응평형이 약15분 정도 소요되는 것으로 생각되며 15분에서 30분까지 흡수분광도는 거의 같은 값을 유지하다가 예상되었던 바와 같이, 흡수 분광도의 값은 점차로 감소하는 경향을 보였다. 본 실험에서는 퇴색현상을 고려하여 발색시약을 첨가한 뒤 20분에 알카리성 시험용액을 산성으로 바꾸어서 반응을 종결시키고 흡수분광도를 측정하였다.

Fructose를 시험용액 1ml당 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14mg/ml을 각각 취하고 발색시약을 첨가한 다음 20분 후에 파장 530nm에서 흡수분광도를 측정하여서 fructose함량에 대한 흡수 분광도의 값으로 점령선을 작성한 결과, 그림 3과 같았다. 흡수분광도의 값은 fructose 0.02mg/ml에서 0.14mg/ml까지 선형적이었으며, 이 범위에서 Beer-Lambert의 법칙에 잘 맞아 주었다.

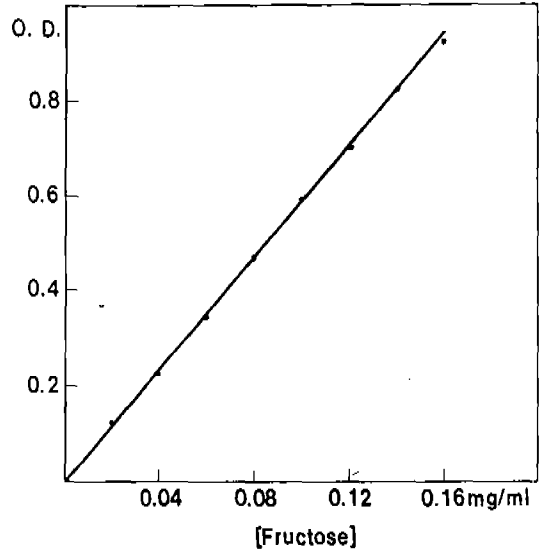


Fig. 3. The absorbance change at 530nm as a function of fructose concentration.

Fructose와 blue tetrazolium solution의 반응계에 잎담배중의 내용성분이 미치는 영향을 보고자 표준물질 첨가법에 의해 조사한 결과 표 1과 같았다. 잎담배중의 fructose 함량은 별도로 분석하여 얻은 값이며 이값에 fructose 일정량을 첨가하여, 본 방법에 따라 실험조작을 하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 발생된 오차는 모두(-)의 값을 보여서 잎담배중의 어떤 성분이 (II) → (I)의 역반응 요인으로 영향을 미치고 있음을 알수 있으며 잎담배중의 fructose 함

Table 1. Assay of fructose in the tobacco leaves by using a standard addition technique.

Samples	Fructose Contents (mg)			error
	without standard fructose	with standard fructose	Observed value	
flue-cured Hicks	3.50	1.00	4.47	-0.03
		3.00	6.40	-0.10
	10.50	1.00	11.45	-0.05
flue-cured Va 115		3.00	13.40	-0.10
	5.90	1.00	6.80	-0.10
		3.00	8.79	-0.11
	13.10	1.00	13.92	-0.12
	3.00	15.90	-0.20	

량의 크기와 오차값의 크기와는 함수적 관계가 보이지 않았다.

Fructose의 양이 4.5mg에서 15.9mg에 이르기까지 오차값의 범위는  $-0.03\text{mg} \sim -0.20\text{mg}$ 였으며 상대오차 2%범위내로서 분석적 재현성이 높다고 보아진다. 일담배 시료 및 몇가지에 대해서 이 연구에 정립한 방법과 Harvey method에 의해 분석한 결과는 표 2와 같았다.

Table 2. Comparison of fructose amounts in the tobacco leaves between the values measured by the proposed method and Harvey method.

Sample (Tobacco leaf)	fructose content(%)	
	Proposed method	Harvey method
1	3.5	4.0
2	12.5	13.0
3	13.1	13.0
4	5.9	5.5
5	5.6	5.5
6	15.0	13.0
7	10.5	11.0
8	13.9	14.0

표 2에서 보면 Harvey 방법은 fructose의 함량이 적은 1번 시료에서 우리가 제시한 방법에서 보다 0.5%가 큰 값을 보인 반면, fructose의 함량이 큰 6번 시료에서는 본 시험방법의 값이 15.0%인데 반하여 13.0%로서 -2%의 편차를 보이고 있다. 즉 Harvey 방법은 서론에서 언급한 바와같이 발색시약에 의해 생성이 되는 formazan dye를 acetone으로 용해시키는 과정에 있어, 용해정도에서 오는 분석오차가 개입될 수 있기 때문에 발생오차의 범위가 클수도 있음을 보이는 것이라고 생각이 되며, 이 연구에서 정립한 방법은 표 1에서 보는 바와 같이 대체로 (-)의 오차를 보이지만 그 범위는 상대오차 2%이내로서 표 2의 분석값도 이 범위 이내라고 할수가 있을 것이다.

제측장치를 사용하지 아니하고 이 방법에 따라 실험한 값을 본 시험방법의 값과 비교하면 표 3과 같았다.

Table 3. Comparison of fructose amounts in the tobacco leaves measured by visual readout and the instrumental readout.

Sample (Tobacco leaf)	fructose content(%)		
	visual readout	instrumental readout	error%
1	3.2	3.5	-0.3
2	11.5	12.8	-1.3
3	13.0	13.1	-0.1
4	5.5	5.9	-0.4
5	5.5	5.6	-0.1
6	14.0	15.0	-1.0
7	9.0	10.5	-1.5
8	13.5	13.9	-0.4

표 3에서 보는 바와 같이 visual readout으로 fructose 함량을 측정된 결과는 흡수분광도계로 측정된 것보다 대체로 낮은 값이었다.

오차값의 경향은 fructose의 함유량이 적을 때는  $-0.2 \sim -0.5\%$ 의 값이었는데 10%를 넘은 시료 용액에서는  $-1.3\%$ 의 오차를 보였다. 최대의 상대오차가 10%이내로서 관측장치가 없는 field에서도 간이분석 방법으로 활용이 될 수 있을 것으로 생각이 되어 오차를 보다 더 줄이기 위하여는 앞으로 계속 연구되어야 할 과제로 보인다.

## References

1. Andre, S. : Anal, Chem., 27, 5, 813 (1955).
2. Gaines, P. : J., of the AOAC, 56, 6, 3141 (1973).
3. Harvey, W. R, and A. M. Palmer, : Tobacco Sci., 13, 13 (1969).
4. Harvey, W. R. : Tobacco, Sci., 15, 29 (1971).
5. Masao, Yamazaki, Hiroko Kimura, Toshiko Namiki : 日本專賣中研報, 11, 77 (1969).
6. Mattson, A. M. and C. O. Jensen : Anal, Chem., 22, 1, 182 (1950).
7. Mader, w. J, and R. R. Buck : Anal, chem., 24, 4, 666 (1952).
8. Recknagel, R. O. : J., Lab., & Clinical

- Medicine 48, 3, 463 (1956).
9. Somogyi, M. : J., Biol., Chem., 195, 19 (1952).
  10. Wahnlichz Z. : Anal., Chem., 28, 2, 150 (1956).