

## Starch-iodine Complex의 변색반응을 이용한 $\alpha$ -Cyclodextrin의 정량

서인영 · 허철성 · 황인규  
한국야쿠르트유업(주) 연구소

### Colorimetric Determination of $\alpha$ -Cyclodextrin by Using the Decoloration of Starch-iodine Complex

In-Yeong Suh, Chul-Sung Huh and In-Kyu Hwang  
*Hankuk Yakult Institute*

#### Abstract

A new colorimetric method to analyze  $\alpha$ -cyclodextrin( $\alpha$ -CD) by using a property of  $\alpha$ -CD to decolor the starch-iodine complex, was presented.  $\alpha$ -CD was quantitatively determined as follows. The  $\alpha$ -CD standard solutions at concentrations up to 2 mg/ml were prepared. To 1 ml of starch-iodine complex solution which contained starch(1%) and iodine(0.02% I<sub>2</sub>, 0.2% KI) equivalently in distilled water, 200  $\mu$ l of  $\alpha$ -CD standard solutions and 3 ml of distilled water were added and the absorbance was measured at 570 nm. Using this method  $\alpha$ -CD concentration range at 0~2 mg/ml could be determined and their absorbance patterns at 570 nm showed a good linearity.  $\beta$ -CD and glucose had no interference in this method for  $\alpha$ -CD determination.

Key words :  $\alpha$ -cyclodextrin, colorimetric determination, starch-iodine complex

#### 서 론

식품분야에 있어 그 응용성이 크게 기대되는 cyclodextrin(CD)은 포도당이 6개 이상 모여  $\alpha$ -1,4 결합으로 환상구조를 형성하는 화합물로서 cyclomaltodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19,  $\alpha$ -1,4-glucan 4-glycosyl-transferase)라는 효소에 의해 생성된다<sup>(1)</sup>. 이러한 CD와 관련된 연구를 수행하기 위해서는 CD를 정량, 정성분석할 수 있는 적당한 방법들이 선행되어야 하며, 현재까지 이와 관련된 여러 가지 방법들이 개발되었다.

High-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 분석법은 CD 혼합물내에서  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD를 동시에 정량, 정성분석할 수 있다는 점에서 널리 이용되고 있다<sup>(2,3)</sup>. 그러나 HPLC 운영상의 어려운 점과 maltohexaose나 maltoheptaose와 같은 malto-oligosaccharide가 분석을 방해하기가 쉽다는 단점을 지니고 있다<sup>(4)</sup>.

한편, Kato 등은 CD의 포접능과 bromocresol green(BSG)의 spectrum을 이용하여  $\gamma$ -CD를 정량할 수 있음을 보고하였으며<sup>(5)</sup>, Hirai 등은 congo red, methyl orange 그리고 crystal violet를 이용하여 각 화합물이 CD와 혼합체를 형성하였을 때 각 혼합체의 특징적인 spectrum이 나타남을 보고하였다<sup>(6)</sup>.

본 연구에서는 CD 생성 효소에 관한 연구의 일환으로, 변색반응을 이용한 빠르고 간단한  $\alpha$ -CD의 정량법을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 시약

$\alpha$ -CD와  $\beta$ -CD는 Sigma사(미국)로부터 구입하였으며, 가용성 starch와 iodine은 각각 Shimakyu사(일본)와 Junsei사(일본)로부터 구입 사용하였다.

##### 흡수 spectrum의 작성

1% starch 용액과 iodine 용액(0.02% I<sub>2</sub>, 0.2% KI)이 동량 혼합된 혼합액 1 ml에  $\alpha$ -CD 표준용액 200  $\mu$ l를 첨가하고, 다시 증류수 3 ml를 가하여 Gilford Response Spectrophotometer(Gilford Ins., Lab., USA)를 이용하여 270~750 nm의 파장범위에서 흡수 spectrum을 작성하였다.

##### $\alpha$ -CD 정량을 위한 표준 실험조건

1% starch 용액과 iodine 용액(0.02% I<sub>2</sub>, 0.2% KI)이 동량 혼합된 혼합액 1 ml에  $\alpha$ -CD 표준용액 200  $\mu$ l를 첨가하고, 다시 증류수 3 ml를 가하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때  $\alpha$ -CD 정량 표준곡선의 작성을 위하여 0~2 mg/ml의 농도범위의  $\alpha$ -CD 용액을 사용하

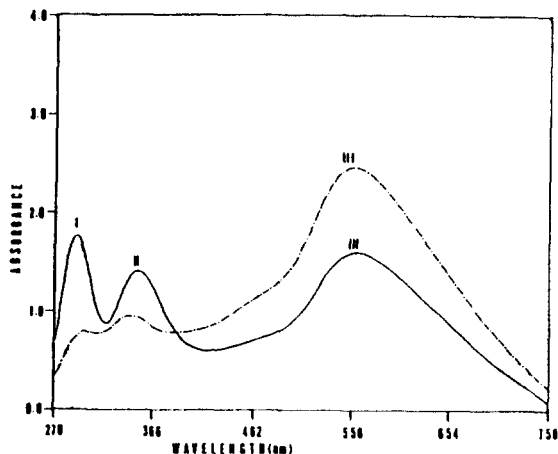


Fig. 1. Absorption spectra of iodine-starch complex (---) and  $\alpha$ -CD treated iodine-starch complex(—)

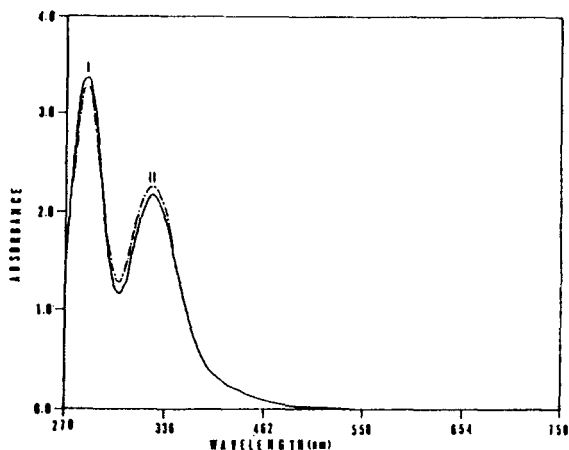


Fig. 2. Absorption spectra of iodine(---) and  $\alpha$ -CD-iodine complex(—)

였으며,  $\beta$ -CD와 glucose의 방해효과 실험에서 사용된  $\beta$ -CD와 glucose의 농도범위는 각각 0~1 mg/ml과 0~20 mg/ml이었다.

### 결과 및 고찰

#### iodine-starch 복합체에 대한 $\alpha$ -CD의 효과

Fig. 1은 iodine-starch 복합체 용액에  $\alpha$ -CD를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우를 270~570 nm 흡수파장 범위에서 scanning한 결과이다. Iodine-starch 복합체의 표준 흡수 spectrum은 560 nm에서 최대 흡광을 나타낸다. 그러나 동일한 조건에서 iodine-starch 복합체 용액에  $\alpha$ -CD를 첨가하게 되면 3개의 전형적인 흡광 peak들의 흡광도에 있어 커다란 변화가 나타난다. 즉, 흡광 peak

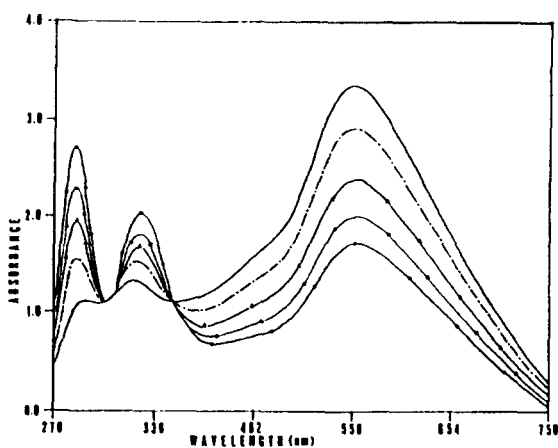


Fig. 3. Absorption spectra of iodine-starch complex treated with  $\alpha$ -CD at various concentrations  
--- : 0 mg/ml, -.- : 0.5 mg/ml,  $\blacktriangle$  : 1.0 mg/ml,  $\blacksquare$  : 1.5 mg/ml,  $\bullet$  : 2.0 mg/ml

I과 II는 흡광도가 증가하는 반면 흡광 peak III의 흡광도는 감소한다.

한편, 이러한 흡광도의 변화요인이 어디에 기인되는가를 조사하기 위하여 새로운 흡수 spectrum을 작성하였다. Fig. 2는 iodine 용액과  $\alpha$ -CD가 첨가된 iodine 용액을 270~750 nm의 흡수파장 범위에서 scanning한 결과이다. 이 결과 두 용액의 흡수 spectrum은 전혀 차이점이 없었으며, 따라서 앞선 실험결과와 비교하였을 때 흡광 peak I과 II는 iodine이나 iodine과  $\alpha$ -CD와의 복합체에 의해 생성되는 전형적인 모습으로서 결국 iodine-starch 복합체 용액에  $\alpha$ -CD를 첨가하면  $\alpha$ -CD의 내포능에 의하여 iodine이 iodine-starch 복합체에서 분리되면서 흡광 peak III의 흡광도가 감소함을 알 수 있었다.

#### $\alpha$ -CD의 정량화

Fig. 3은 일정 iodine-starch 복합체 용액에  $\alpha$ -CD 표준용액을 처리하여 270~750 nm의 흡수파장 범위에서 작성된 흡수 spectrum 결과이다. 이 결과  $\alpha$ -CD의 농도 변화에 따라 흡광 peak들의 흡광도도 일정하게 변화하고 있으며, 이러한 특성은  $\alpha$ -CD 농도변화에 따라 흡광도의 변화도 상당히 정량적일 수 있음을 시사하고 있다. 이 사실은  $\alpha$ -CD의 표준곡선을 작성하여 확인할 수 있었다. 즉, 290 nm 흡광 peak I과 570 nm의 흡광 peak III에서 작성된 표준곡선의 상관계수는 각각 0.998과 0.999로 둘 모두가 1에 매우 근접된 결과를 나타내었다.

#### $\alpha$ -CD 농도와 흡광도와의 linearity

Table 1은 가시광선 영역인 570 nm에서 여러 가지  $\alpha$ -

**Table 1.** Statistical data for linearity between  $\alpha$ -CD concentration and absorbance at 570 nm

$\alpha$ -CD conc. (mg/ml) range	Correlation	Slope	Error
0~5.0	-0.981	-0.0020	0.414
0~3.5	-0.992	-0.0025	0.085
0~2.0	-0.998	-0.0029	0.041

**Table 2.** Statistical data for the interference of glucose in the  $\alpha$ -CD determination

Glucose conc. (mg/ml)	Correlation	Slope	Error
0	-0.999	-0.0028	0.021
5	-0.999	-0.0028	0.019
10	-0.999	-0.0028	0.024
20	-0.999	-0.0028	0.024

CD 농도범위의 표준곡선을 작성하여 이를 통계적으로 처리하여 정리한 결과이다. 이 결과  $\alpha$ -CD의 농도범위가 0~2(mg/ml)일 때 농도와 흡광도와의 상관계수가 1에 가장 근접하였으며, 따라서  $\alpha$ -CD를 정량할 때는 이 농도범위를 기준으로 삼았다.

#### Glucose와 $\beta$ -CD에 의한 방해효과

Table 2는 표준 정량조건에서 glucose 농도변화에 따른  $\alpha$ -CD 표준곡선의 통계적 data를 정리한 결과이다. 이 결과 glucose 농도가 시료액에 20 mg/ml까지 함유되어 있어도  $\alpha$ -CD 정량을 위한 본 방법에는 아무런 방해효과가 없음을 알 수 있었다.

Table 3은 표준 정량조건에서  $\beta$ -CD 농도변화에 따른  $\alpha$ -CD 정량 표준곡선의 통계적 data를 정리한 결과이다. 이 결과  $\beta$ -CD는  $\alpha$ -CD 정량을 위한 본 방법에 아무런 방해효과가 없음을 확인할 수 있었다.

#### 요 약

$\alpha$ -cyclodextrin(CD)이 starch-iodine 복합체를 변색시킬 수 있다는 성질을 이용하여  $\alpha$ -CD의 새로운 비색정량법을 확립하였다. 이 새로운  $\alpha$ -CD의 정량법은 다음과

**Table 3.** Statistical data for the interference of  $\beta$ -CD in the  $\alpha$ -CD determination

$\beta$ -CD conc. (mg/ml)	Correlation	Slope	Error
0	-0.998	-0.0026	0.027
0.25	-0.998	-0.0029	0.030
0.50	-0.999	-0.0028	0.027
1.00	-0.998	-0.0028	0.035

같다.  $\alpha$ -CD의 표준용액을 2 mg/ml까지 농도별로 준비하였다. 그리고 동량으로 혼합된 starch-iodine 복합체 용액 1 ml에  $\alpha$ -CD 표준용액 200  $\mu$ l와 증류수 3 ml를 함께 가하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법으로  $\alpha$ -CD의 농도범위는 0~2 mg/ml까지 측정할 수 있었고, 570 nm에서의 흡광도도 가장 좋은 직선성을 나타내었다. 한편,  $\beta$ -CD와 glucose는  $\alpha$ -CD 정량을 위한 본 방법에 아무런 방해효과가 없었다.

#### 문 헌

1. French, D. : The Schardinger dextrins. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12, 189(1957)
2. Zeadon, B., Otta, K.H. and Tudos, F.J. : Separation of cyclodextrins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 172, 490(1979)
3. Hokse, H. : Analysis of cyclodextrins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 189, 98 (1980)
4. Kitahata, S., Yoshikawa, S. and Okada, S.J. : Determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin by high performance liquid chromatography. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 25, 19 (1978)
5. Kato, T. and Horikoshi, K. : Colorimetric determination of  $\gamma$ -cyclodextrin. *Anal. Chem.*, 56, 1738(1984)
5. Hirai, H., Toshima, N. and Uenoyama, S. : Inclusion complex formation of cyclodextrin with large dye molecule. *Polymer Journal*, 13, 607(1981)

(1990년 8월 6일 접수)