

영양성분 분석에 관하여

양미옥, 김민아, 황진봉

식품분석실

식품분석실에서 수분, 조단백, 회분에 대한 분석 방법을 전보에 게재한데 이어 이번호에는 무기질, 유리당, 비타민A, C에 대하여 설명하고 그에 따른 추천방법을 소개하고자 한다.

1. 무기질(Ca, Fe, Na)

시료용액의 조제는 건식법, 습식법, 가압분해법, 초단파분해법 등 다양한 방법이 있는데 일반적인 전처리 방법을 소개하고 FDA에서 채택한 방법을 자세히 설명하겠다. AAS (Atomic Absorption Spectrometry)이나 ICP-AES(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)분석법은 용액시료를 주요 대상으로 하는 분석법이므로 시료 중의 원소들을 정량하기 위해서는 대부분의 경우, 어떠한 방법으로든지 시료를 분해시켜 투명용액으로 만들어야 한다. 분석 원소의 손실이나 오염없이 시료를 전처리하는 기술은 분석기기를 작동시키는 기술보다 훨씬 중요한 일로서 풍부한 경험에 있어야 하며 고도의 기술이 요구된다. 아무리 성능이 우수한 기기를 이용하더라도 시료의 전처리가 잘못되면 정확한 분석결과를 얻을 수 없음은 물론 정밀성 조차 기대할 수 없다.

한편, 시료의 분해방법에 있어서 시료는 다음 정량과정에 들어가기 전에 예비실험을 통해 결정된 분해방법으로 전처리하게 되는 데 비파괴분석이 아닌 경우를 제외하곤 완전히 분해시켜서 수용액으로

만들어야 한다. 즉, 최종정량방법이 어떻든 간에 일단 투명용액으로 만들어야 한다. 투명용액이 만들어지지 않으면 항상 부의 오차를 수반하며 재현성있는 결과를 얻을 수 없다. 일반적으로 시료를 산류로 분해시켜서 투명용액으로 만드는 데 특별한 경우에는 알카리가 이용되기도 한다.

1.1 AAS(식물 속에 존재하는 금속원소를 분석할 때) 경우

(1) 건식법(Dry ashing method)

잘 혼합된 시료 1~2g을 정확히 달아 자기도가니에 넣고 전열기 위에서 예열처리 한 후 전기로로 옮긴다. 온도를 서서히 올려 500°C에서 2시간 화학시키고 방냉하여 H₂O 10방울을 가해 시료를 적신 다음 HNO₃(1+1) 3mℓ 가하고 전열기에서 HNO₃를 휘발(120°C)시킨다. 500°C에서 1시간 다시 화학시키고 HCl(1+1) 10mℓ를 가한 다음 잘 녹인 후 50mℓ 정용 플라스크로 옮겨 탈이온수로 표선을 채운 다음 여과하여 분석용액으로 사용한다.

(2) 습식법(Wet digestion method)

잘 혼합된 시료 1g을 정확히 달아 250mℓ 비이커에 넣고 HNO₃ 10mℓ를 가해 질산에 완전히 침지시킨 후 방치시킨 다음, 60% HClO₄ 3mℓ를 가하고 전열기에서 거품이 없어질 때까지 서서히 가열하여 HNO₃가 거의 증발될 때까지 계속 가열한다.

만일 시료가 겹게되면(charring), 냉각시킨 후 HNO_3 10mℓ를 다시 가해 계속 가열한다. HClO_4 의 환연기가 나면 종료하고 냉각시켜 $\text{HCl}(1+1)$ 10mℓ를 가해 녹이고 50mℓ 정용 플라스크로 옮겨 탈이온수로 표선을 채운 다음 여과하여 분석용액으로 사용한다. 건식법이나 습식법을 이용시 공시험을 같이 수행한다.

(3) 측정

건식법이나 습식법에서 전처리한 용액에 5% La용액 10mℓ를 가하여 잘 혼합한다음 분석시 HCl의 최종농도가 10%가 되도록 한다.

1.2 ICP-AES의 경우

(1) 건식법(Dry ashing method)

AAS의 경우와 동일하다.

(2) 습식법(Wet digestion method)

잘 혼합된 시료 2~5g(액체인 경우 10mℓ)을 100mℓ Kjeldahl 플라스크(또는 비이커)에 넣고 $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4(2+1)$ 혼합산 30mℓ를 가한 후 비동석 3~4개를 넣는다. 공시험은 시료와 동일한 방법으로 2개를 준비한다. 분해는 낮은 온도에서 천천히 가열, 끓기 시작하면 갈색의 NO_2 연기가 발생하며 계속해서 질산과 수분이 제거될때까지 조심스럽게 가열한다. 연기가 사라지고 과염소산의 영향으로 거품이 생성되는데 이때 시료가 너무 탄화되지 않도록 주의하며 그러기 위해서는 가열, 냉각조작을 반복한다(왜냐하면 시료가 탄화되면 폭발 위험성이 있기 때문). 시료가 완전 분해되면 약 2분간 더 가열한 다음 분해를 종료한다. 분해된 시료는 50mℓ 정용 플라스크에 옮긴 다음 탈이온수로 표선까지 채운 다음 여과하여 분석한다.

1.3 가압하에서의 분해

마그네트론에서 발생하는 강력한 microwave를

이용하여 일정한 압력까지 견디는 테프론 용기 내에 있는 시료를 분해하는 초단파 분해(microwave digestion method)와 steel재질의 chamber 내의 테프론 용기에 산을 가하고 마개를 한 후 전기오븐에 넣어 일정 온도로 가열해 줌으로써 소량의 산으로도 시료를 전처리할 수있는 가압 산분해(pressure bomb digestion method)법이 있다.

1.4 원소의 분석

(1) Atomic Absorption Spectrometric Method

원자흡수분광법은 금속원자를 불꽃 또는 전기로 등에 의해 높은 온도로 가열함으로써 만들어진 기체상태의 중성원자에 적당한 복사에너지를 쪼여 줌으로써 일어나는 복사에너지 흡수현상을 기초원리로 한 분석방법이다.

한편, 표준용액의 제조는 다음과 같다.

① Calcium용액 : CaCO_3 1.249g을 달아 소량의 3N HCl용액에 녹이고 증류수로 1ℓ로 정용한 다음 잘 섞은 후 사용한다. 실제 사용 할 때에는 앞서 제조된 용액 50mℓ를 1ℓ로 희석한 다음 이 용액 0, 5, 10, 15, 20mℓ을 25mℓ정용 플라스크에 넣고 La용액 5mℓ넣어 분석한다.

② Fe용액 : 순수한 철 1.0g을 6N HCl 약 30mℓ에 녹이고 1ℓ로 희석하여 사용한다.

③ Na용액 : NaCl 2.5421g을 증류수에 녹이고 1000mℓ로 정용한다.

* La용액 : 여기서 La용액의 제조는 다음과 같다. La_2O_3 58.65g을 달아 비이커에 넣고 여기에 HCl 250mℓ를 가해 천천히 녹인 후 증류수로 희석하여 1ℓ로 정용하여 사용한다.

AOAC에서 추천한 시료는 다음과 같다.

- 968.08—Minerals in animal feed
- 975.03—Metal in plants
- 965.09—Nutrients(minor) in fertilizer
- 991.25—Ca, Mg and P in cheese
- 985.35—Minerals in Ready-to-Feed

(2) Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission spectrometry에 의한 분석

유도결합 플라즈마 원자방출 분광법은 라디오 주파수의 전류가 흐르는 코일에 의해 유도된 전자장이 결합된 플라즈마를 광원으로 중성원자에 열에너지를 가해 최외각 전자를 들뜨게 하고, 이로부터 방출되는 복사선을 분광시켜 화학분석에 이용하는 방법이다.

이 방법은 극미량까지 검출이 가능하고 검정곡선에서 4~5승의 역학적 범위를 가지며 다중원소를 동시에 분석할 수 있으며 안정한 플라즈마 불꽃을 유지할 수 있어 재현성이 좋은 결과를 얻을 수 있다.

AOAC에서 추천한 시료는 다음과 같다.

- 953.01—Metals in plants
- 985.01—Metals and other elements in plants
- 984.27—Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium and Zinc in Infant Formula

(3) 그밖의 방법으로는 적정법 등이 있다.

- 921.01—Calcium in plants
- 983.19—Calcium in mechanically separated poultry and beef
- 968.31—Calcium in canned vegetable
- 944.03—Calcium in flour

2. 유리당

2.1 HPLC에 의한 정량법

지방이 많은 시료의 경우 잘 분쇄된 시료 2~

10g을 100ml 원심분리기통에 넣고 petroleum ether를 50ml를 가하고 혼들어 20분간 방치한 다음 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 잔사가 나가지 않도록 상등액을 버리고 잔사를 시료로 사용하며 이 과정을 3번 반복한다. 탈지 후 시료의 당액 추출은 시료에 alcohol-H₂O(1+1) 100ml를 가한 다음 80~85℃ 수욕상에서 25분간 가끔씩 교반한다. 실온에서 식힌 다음 원래 무게만큼 알콜을 가하고 원심분리를 하거나 0.45μm filter로 여과하여 분석한다.

HPLC조건은 다음과 같다.

Column : μ-Bondapak carbohydrate column
 Detecter : Refractive Index
 Mobile phase : CH₃CN : H₂O(80+20)
 Flow rate : 1.5ml/min
 Chart speed : 0.5cm/min
 Injection volume : 10μl

AOAC에서 권장하는 대상 품목은 다음과 같다.

- 982.14—Glucose, Fructose, Sucrose and Maltose in presweetened cereals
- 980.13—Fructose, Glucose, Lactose, Maltose and Sucrose in milk chocolate
- 984.17—Sugar in licorice extracts
- 977.20—Separation of sugars in honey
- 983.22—Saccharides (minor) in corn sugar
- 979.23—Saccharides (minor) in corn sirup

2.2 기타방법

Gas Chromatographic Method(971.18—Carbohydrates in fruit juice), Charcoal Column Chromatographic Method(954.11—Separation of sugars in honey, 979.21—Separation of sugars in honey.), Glucose Oxidase Method (969.39—Glucose in Corn sirups and sugars), Enzymatic Method (984.15—Lactose in milk) 등이 있다.

3. 비타민 A

3.1 HPLC에 의한 정량법

- (1) 비타민 A의 추출(지방이외의 여러 성분이 혼합되어 있을 경우)
- ① 일정량의 시료를 취함(최종 비타민A의 농도가 10~20IU/ml이 되게)
 - ② CHCl₃:MeOH:H₂O(1:2:0.8) 혼합용액을 시료량의 5~10배량 정도 가함.(당으로 코팅된 스넥제품은 MeOH로 추출함)
 - ③ 균질화(5,000rpm에서 3~5분)
 - ④ 균질화된 것에 다시 CHCl₃과 H₂O을 각각 1part씩 가함
 - ⑤ 2차 균질화(10,000rpm에서 8분)
 - ⑥ 원심분리 또는 여과
 - ⑦ 분액여두에 옮김 후 진탕
 - ⑧ 충 분리후 CHCl₃(하층)를 취함
 - ⑨ 무수황산나트륨으로 수분제거후 여과
 - ⑩ 감압농축
- (2) 검화(마가린 및 유지제품은 검화단계로 곧 바로 들어감)
- ① 추출한 감압건고물에 2N KOH-EtOH 용액 20ml를 정확히 가함
 - ② 끓는 물증탕에서 30분간 검화
 - ③ 20ml의 증류수로 냉각관을 세척하여 검화수기에 받아 물에서 굽냉
 - ④ 250ml 분액여두에 옮김(지방수기를 30ml 증류수로 세척)
 - ⑤ 50ml 에틸에테르를 분액여두에 넣고 15초간 격렬히 혼들어 방치 후 에테르층을 취함(상층)
 - ⑥ 40ml 에틸에테르를 재차 가하여 상기의 방법으로 추출(3회 반복)
 - ⑦ 에테르층 모두 합하여 1% phenolphthalein 지시약을 넣고 50ml 증류수를 가해 KOH를 제거(약4회 정도 실시하나 붉은색이 있으면 계속한다)
 - ⑧ 에틸에테르층에 무수황산나트륨을 가해 탈수, 여과

- ⑨ 감압농축으로 에테르 제거
- ⑩ 감압건고물을 일정량의 MeOH를 가해 용해함(비타민A가 1ml당 10~20IU정도가 되도록 MeOH를 가함)
- ⑪ 0.45μm membrane으로 여과
- ⑫ 여과물 20μl를 다음의 HPLC조건에 주입 함
한편, HPLC 조건은 다음과 같다.

Column: Reversed-phase column(μ-Bondapak C18 30X 0.39cm)

Detector: UV(325nm)

Mobile phase: Methanol:H₂O=90:10(v/v)

Flow rate: 1.0ml/min

Chart speed: 0.5cm/min

AUFS: 0.1~0.2

Injection volume: 10μl or 20μl

Column temperature: 40°C

이 방법의 적용 대상은 다음과 같다.

992.04-Vit A (Retinol Isomers) in milk and milk-based infant formula

992.06-Vit A (Retinol) in milk-based infant formula

3.2 삼염화안티몬법(Carr-Price Method)

삼염화 안티몬(antimonous trichloride, SbCl₃)의 클로로포름 포화용액은 비타민 A와 반응하여 620nm에서 최대흡수파장을 나타내는 청색을 띤다. 이 반응은 극히 예민하여 미량의 비타민 A 검출도 가능하다. 그러나 청색의 퇴색이 빠르고 수분이 있으면 정색반응이 잘 이루어지지 못하는 단점이 있다.

3.3 GDH(Glycerol-Dichloro-Hydrin)법

GDH시약에 삼염화안티몬(antimonous trichloride, SbCl₃)을 가하여 감압증류한 즉, 활성화

GDH를 비타민 A에 가하면 안정된 적자색이 나타나는 데 이를 비색정량한다. 이 방법은 삼염화안티론법에 비해 정색이 1/4 정도 밖에 되지 않고 Carotenoid의 영향을 다소 받는 단점이 있으나 시약이 안정되고 습기의 영향을 받지 않으며 정색이 안정하다.

4. 비타민 C

4.1 HPLC에 의한 정량법

(1) 비타민 C의 추출

- ① 비타민 C 함량은 추출 후 추출용액 100ml당 1.5~2.5mg가 되도록 취함
- ② 채취시료에 추출용액을 가하여 저온에서 신속히 추출(파일쥬스등은 혼합후 5분정도 혼들어 주며 고체시료는 비타민 C가 신속하게 충분히 추출되도록 저어준다) 한다.

(2) 추출용매의 제조

추출용매는 5% metaphosphoric acid로 사용한다.

(3) 표준용액의 제조

Ascorbic acid 표준시약 약 100mg를 정확히 취하여 추출용매로 100ml가 되도록 정용한 다음 잘 섞고, 이를 다시 1, 2, 3ml취하여 추출용매로 100ml가 되도록 정용한다.

(4) 비타민 C 분석을 위한 HPLC 조건은 다음과 같다.

Column: YMC-PackPolyamine II (4.6 × 250mm)

Detector: UV(254nm)

Mobile phase: CH₃CN:50mM NH₄H₂PO₄=70:30 (v/v)

Flow rate: 1.0ml/min

Chart speed: 0.5cm/min

AUFS: 0.16

Injection volume: 10μl or 20μl

Column temperature: 40°C

4.2 Indophenol(Reduced Ascorbic acid) 법

Ascorbic acid는 산화-환원형 지시약인 2,6-dichloroindophenol을 환원시켜 무색이 되게 한다. 따라서 산성용액 하에서 2,6-dichloroindophenol을 비타민C가 있는 시료에 가하면 비타민 C가 다소 멸진 후에는 적색을 띠게 된다. 그러나 Fe, Sn, SO₂등의 환원물질이 있는 경우에는 이 방법을 피하는 것이 좋다.

(1) 시약

추출용매는 초산 80ml를 중류수 400ml에 녹인 후, metaphosphoric acid 30g을 중류수에 녹여 1ℓ가 되도록 정용한다.

(2) Indophenol 표준용액

42mg의 탄산수소나트륨을 중류수 50ml에 잘 녹인 후, 인도페놀 50mg을 첨가하여 다시 잘 녹인다. 이것을 중류수와 잘 섞어서 200ml로 정용한다.

(3) Ascorbic acid 표준용액:HPLC법과 동일

(4) 시험방법

- ① 삼각플라스크에 시료 약 5g을 정확히 달아 추출용매 200ml를 넣어 잘 섞는다.
- ② 인도페놀 표준용액으로 분홍색이 나타날 때 까지 적정하여 소비량을 구한다.
- ③ 위와 동일한 방법으로 Ascorbic acid 표준용액을 1, 2, 3ml를 각각 홀피펫으로 삼각플라스크에 취해 추출용매를 20ml 씩 첨가하여 인도페놀 용액으로 그 소비량을 구한다.

적용대상은 다음과 같다.

967.21-Vit C (ascorbic acid) in vitamin preparations and juices

985.33-Vit C (Reduced ascorbic acid) in ready-to-feed milk based infant formula

