

綠茶中の L-Ascorbic Acid의 定量法에 관한 研究

辛 美 慶 · 南 昌 祐*

圓光大學校 食品營養學科 · 同德女子大學 食品營養學科*

(1978년 11월 6일 수리)

Analytical Method of L-Ascorbic Acid Content in Green Tea

Mee-Gyung Sin and Chang-Woo Nam*

Won Kwang University and Dong Duk Women's College*

(Received November 6, 1978)

Abstract

Effects of interfering substances on the determination of L-ascorbic acid (AsA) in green tea and its extracts by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) method was studied, and the removal of these interfering substances was also investigated. Under the condition prescribed for DNP method, AsA content of green tea are effected by some sugar, reductones, dicarbonyl compounds, organic acids, amino acids and others. All interfering substances except amino acids were eliminated by the chloroform extraction after adding o-phenylendiamine to sample solution, and remaining amino acids were eliminated almost completely by the treatment with ion exchange resin(Amberlite IR-120 H⁺).

After removing the interfering substances by the above mentioned procedure, total AsA in green tea was determined by DNP method. The values obtained by this method were in good agreement with those by thin layer chromatography (TLC) method, and the method was more rapid and simple than TLC method.

序 論

綠茶中の L-ascorbic acid (AsA)量에 대해서는 이미 여러 研究者들에 의해서 그 測定結果가 報告되었다⁽¹⁻³⁾ 그러나 山口,⁽⁴⁾ 星野,⁽⁵⁾ 藤田⁽⁶⁾ 및 卿⁽⁷⁾ 등이 지적한 바와 같이 indophenol法으로 綠茶中の AsA를 定量할 경우 tannin 物質 등 非 AsA還元物質의 영향을 받아 定量値가 一般의으로 실제의 含量보다 더 많게 나타난다 또 indophenol法보다는 銳敏하고 選擇的으로 AsA를 定量할 수 있다고 알려진 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP)法에 있어서도 약간의 아미노산과 糖類 등의 영

향을 받기 때문에⁽⁸⁾ 前處理없이 測定한 값은 어느 정도까지가 참값인지 의심스럽다.

이 點을 고려할 때 藤田等⁽⁹⁾이 報告한 thin-layer chromatography(TLC)法은 DNP法에 의한 反應液에서 osazone을 抽出한 후 TLC에 의하여 AsA에 해당되는 획분을 分離하는 우수한 方法이기는 하지만 測定時間이 길기 때문에 日常分析法으로는 불편하다.

이러한 問題點을 解決하기 위하여 梶田^(10,11) 등 및 筆者⁽¹²⁾는 o-phenylendiamine(OPD) 縮合物을 이용하는 polarography法으로 食品中の AsA와 그 관련물질과의 分離定量에 대해서 檢討하였다. 즉, 有機溶媒抽出法으로 방해물질의 일부를 除去하여 실시한 polarogram에

나타난 半波電位差를 利用하는 代數計算에 의한 일련의 分析方法을 報告하였다. 그러나 이 방법은 DNP法 또는 TLC法에 비하여 迅速성의 點에서는 우수하였으나 感度面에서는 뒤떨어졌다.

本 研究는 DNP比色法에 의해 綠茶中の AsA를 定量할 때의 妨害物質의 舉動 및 妨害物質의 일부를 有機溶媒로 抽出除去함으로써 AsA의 眞價定量的 간편화에 대해서 檢討하였던 바 그의 적용 가능성이 判明되었기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 實驗方法

1. 材料 및 試料의 調製

本 實驗의 L-ascorbic acid 정량 재료로는 中級煎茶 (Sen-cha) (日本奈良縣農業試驗場 試製)를 사용하였고. 시험결과를 확인하기 위하여 玉露 (Gyoku-ro) 煎茶 番茶 (Ban-cha) (日本京都府立木津高等學校 試製)를 대조 실험재료로 사용하였다.

한편 dinitrophenylhydrazine法에 의한 L-ascorbic acid 測定試料는 다음과 같이 調製하여 사용하였다. 즉, 中級煎茶를 常法⁽¹³⁾에 따라 浸出한 浸出濾液 10ml에 0.2M o-phenylenediamine 1ml와 5% m-인산을 가하여 20ml로 定容한 다음 25°C에서 30분간 축합반응시켰다 이것을 분액깔때기에 옮기고 等量的의 ether, ethyl acetate 및 chloroform등의 용매로 5분간 격렬히 진탕하여 추출, 방치한 다음 水層을 취하여 DNP法에 의한 分析用 試料로 하였다.

2. L-Ascorbic acid 測定方法

DNP法: DNP法에 의한 AsA의 測定은 Roe의 方法⁽¹⁵⁾으로, 그 改良法은 松下⁽¹⁶⁾의 方法에 의하였다.

TLC法: 藤田⁽⁹⁾의 方法에 의하였다. 즉, DNP法에 의한 反應液에서 osazone을 抽出하여 TLC plate에 spotting하고 展開溶媒로는 toluene: acetone: 5% acetic acid가 2:1:2의 비율로 혼합된 용매를 사용하였으며 展開된 AsA에 해당하는 획분을 分離한 후 比色定量하였다.

3. 夾雜物質의 處理

AsA 측정에 영향을 미칠 것으로 예상되는 histidine tyrosine, tryptophan, reductone, tannin물질 등은 $2.5 \times 10^{-4}M$ 이 되도록 단독 또는 혼합액을 조제하여 브롬으로 처리한 다음 DNP를 써서 osazone을 형성시키고 530nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

結果 및 考察

1. AsA의 定量值에 미치는 夾雜物質의 影響

各種 綠茶中에 存在할 것으로 예상되는 histidine

tyrosine 및 tryptophan등은 DNP와 반응하여 osazone을 형성하고,⁽¹⁷⁾ reductone類와 tannin物質 등도 또한 DNP와 반응할 가능성이 있다. 따라서 이들 물질이 AsA 定量值에 어떤 영향을 미치는가를 檢討하였다.

즉, 이들 물질을 $2.5 \times 10^{-4}M$ 의 농도가 되도록 단독 또는 혼합액을 調製하여 브롬으로 處理한 다음 DNP를 써서 osazone을 생성시키고, 530 nm에서 吸光度를 測定하여 AsA량을 환산한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Effects of interfering substances on the determination of AsA with three different analytical methods

(unit: mg%)

Compounds	DNP Method		TLC Method
	Roe's	Matsushita's	
AsA	4.40	4.40	4.40
Triose reductone	3.75	0.0	0.0
Histidine	0.65	0.53	0.0
Tyrosine	0.20	0.16	0.0
Tryptophan	0.35	0.04	0.0
Pyruvic acid	0.0	0.0	0.0
Hydroquinone	4.10	0.0	0.0
Tannic acid	2.10	0.0	0.0
Nicotinic acid	0.0	0.0	0.0
Methylglyoxal	3.10	0.0	0.0
Diacetyl	0.96	0.12	0.0
Caffeine	0.06	0.06	0.0
Pyrocatechol	0.04	0.04	0.0

(Concentration: $2.5 \times 10^{-4}M$)

Table 1에서 보는바와 같이 Roe法에 의하여 AsA를 測定할 경우 pyruvic acid와 nicotinic acid를 제외하여 化合物에 의하여 방해를 받았고, 改良法인 Matsushita法에서는 pyruvic acid, nicotinic acid 이외에 triose reductone, hydroquinone, tannic acid 및 methyl glyoxal등에 의해서도 방해를 받지 않았음을 알 수 있다.

한편 TLC法과 本 實驗方法에 의해서 AsA를 測定時 이들 물질에 의한 방해는 전혀 인정되지 않았다. 단지 AsA의 立體異性體인 erythorbic acid만은 어떤 方法을 사용하던 간에 AsA와 같이 행동하여 分離定量이 어려웠다. 그러나 梶田⁽¹⁸⁾은 TLC法에서 methyl ethyl ketone의 포화수용액을 展開溶媒로 하는 경우 AsA와 erythorbic acid를 分離시킬 수 있다고 報告한 바 있다 따라서 erythorbic acid가 混在할 가능성이 있는 食品, 예컨대 갈변하기 쉬운 加工食品에 대해서는 AsA를 測定하기 前에 미리 erythorbic acid의 존재 여부를 확인한 후, 만일 erythorbic acid가 存在하면 이를 分離除

去한 후에 AsA를 測定해야 할 것이다.

TLC法으로 AsA를 測定時 酸化型 ascorbic acid 및 酸化型 triose reductone의 spot는 각각 0.20 및 0.72의 Rf值에서 赤色을 나타내고, 브롬處理한 hydroquinone tannic acid, methyl glyoxal, histidine 및 tyrosine등은 어느 것이나 黃色의 spot를 나타냈다.

2. 定量方法에 따른 綠茶中の AsA含量 比較

DNP法과 TLC法으로 玉露·煎茶 및 番茶의 AsA含量을 測定한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Ascorbic acid content in green teas determined by DNP method and TLC method (unit: mg%)

Samples	DNP method		TLC method
	Roe's	Matsushita's	
Gyoku-ro	738.8	379.7	144.6
Sen-cha	681.3	302.3	195.5
Ban-cha	920.0	251.3	132.3

Table 2에서 보는바와 같이 同一試料의 경우일지라도 測定方法에 따라서 AsA의 含量에는 큰 차이를 나타내었다. 즉, Roe法에 의한 AsA含量은 煎茶>玉露>番茶의 順이었으며, 이들은 TLC法에 의한 結果보다 전부 2~7倍 높은 값을 나타내고 있다. 改良法 또한 TLC法의 경우보다 높은 값을 보여주고 있다. 여기서 사용한 改良法⁽¹⁶⁾은 糖類加工品中 非 AsA osazone 生成物의 영향을 받지 않고 AsA만을 定量하는 方法으로 考案되어진 것이기 때문에 綠茶中에 함유된 糖類 이외의 夾雜物質이 定量值에 영향을 미친 것으로 생각된다. 이와 같이 DNP法으로 綠茶中の AsA를 定量할 경우 綠茶中에 存在하는 非 AsA osazone 生成物質의 영향을 받아 測定值가 過大하게 나타나기 때문에 순수한 AsA含量을 얻기 위해서는 미리 非 AsA osazone 生成物質을 除去하지 않으면 안되겠다.

TLC法은 이러한 방해물질의 영향을 받지 않고 순수한 AsA의 含量을 測定할 수 있기는 하지만 測定하는데 많은 時間이 所要되는 것이 短點이다.

3. 綠茶中の 非 AsA osazone 生成物質의 影響

上記 煎茶抽出液을 DNP를 작용시켜 osazone을 生成抽出한 다음 TLC로 展開하면 AsA는 前記한 바와 같이 Rf 0.20에서 赤色の spot를 나타내는 반면에 非 AsA osazone 生成物質은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 煎茶의 경우 4종이나 존재함을 알 수 있다.

이들 불순물이 DNP法에 의한 AsA 測定에 방해하는지의 여부를 檢討한 結果 Table 3에서 보는 바와 같이 TLC로 분리된 불순물은 DNP法에 의하여 측정된 흡광

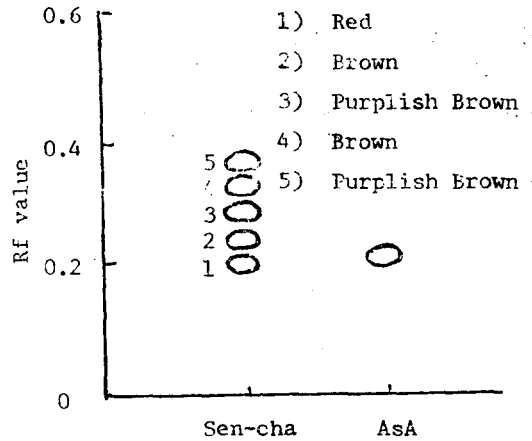


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of osazone compounds of the Sen-cha extracts

Table 3. Effects of coexisting substances in green tea on the determination of AsA by DNP method

spots*	O.D. (at 530nm)	AsA (mg%)**
1	0.15	200.0
2	0.05	5.36
3	0.11	14.66
4	0.075	10.00
5	0.08	10.66

*1: Ascorbic acid, 2~5: Impurities

** AsA content increased by the impurities

도로부터 AsA를 환산하면 AsA인 spot 1에 대하여 불순물인 spot 2~5는 어느 것이나 AsA 측정에 영향을 주며 전체적으로는 약 20%의 과다 측정결과를 초래함을 알 수 있다.

4. 有機溶媒에 의한 夾雜物質의 抽出度

前述한 DNP法에 의한 AsA 定量用 試料調製時, chloroform 이외에도 ethyl ether, ethyl acetate 등의 유기용매에 대한 夾雜物質의 抽出度를 조사하였던 바 이들 방해물질인 triose reductone, 酸化型 ascorbic acid, methyl glyoxal 등은 OPD와 縮合시킴으로써 chloroform에는 거의 100%, ethyl ether 및 ethyl acetate는 각각 60 및 66%의 回收率을 나타내어 chloroform이 가장 좋았다.

그러나 chloroform에 의한 浸出에서도 histidine tryptophan 및 tyrosine등의 아미노酸은 AsA와 똑같은 거동을 나타내어 유기용매에 抽出되지 않았다. 그래서 이들 아미노酸을 除去하기 위하여 上記 水層 10 ml를 Amberlite IR-120(H⁺) column에 통과시킨 후 DNP用 被檢液으로 하였다.

이상 몇가지 檢討結果를 바탕으로 하여 설정한 綠茶中の L-ascorbic acid의 測定方法으로 DNP法을 적용하되, 보다 정확한 含量을 알기 위하여 브롬으로 試料를 酸化하고 OPD를 添加하여 L-ascorbic acid의 測定值에 영향을 미치는 妨害物質과 반응시킨 후 chloroform으로 진탕추출하여 除去한다. 아직도 잔류하는 아미노酸은 Amberlite IR-120 (H⁺) column에 통과시켜 이를 除去하는 前處理過程을 거친 후 DNP法으로 比色定量하면 보다 정확한 AsA 含量을 측정할 수 있다.

5. 本 實驗法과 TLC法의 比較 및 再現性

이상과 같이 검토 설정한 方法으로 綠茶中の L-ascorbic acid를 측정된 결과와 同一試料를 TLC法에 의하여 측정된 결과를 檢討하였던 바 本 實驗法과 TLC法의 측정치가 각각 180.7 및 181.3 mg%로서 큰 차이가 없었다. 그러나 本 實驗法에 의하여 綠茶中の AsA를 測定하는 경우 前處理 및 osazone을 생성시키는 操作 등에 약 6시간이 所要되는데 반해서 TLC法의 경우는 10시간 이상이 所要되어 分析에 所要되는 時間을 현저하게 단축할 수 있었다.

한편 本 實驗方法의 再現性 여부를 확인하기 위하여 같은 試料에 대하여 5回 反復實驗한 結果 그 平均値는 180.4 mg%였고 標準偏差는 0.05로서 극히 좋은 정밀도로 再現性이 있음을 확인하였다.

要 約

綠茶中の L-ascorbic acid를 定量함에 있어서 흔히 사용되고 있는 DNP法을 적용할 때 不純物에 의한 妨害여부와 그의 除去方法에 대하여 檢討한 結果는 다음과 같다. 즉, DNP法으로 AsA를 측정시 ethyl glyoxal, diacetyl, caffeine 등 불순물질 및 아미노酸들이 방해하였으며, 이들 물질을 제거하는 수단으로 브롬酸化후 o-phenylenediamine을 반응시킨 다음 chloroform으로 抽出除去하고 Amberlite IR-120(H⁺)로 아미노酸을 除去한 후에 DNP法으로 比色定量하면 L-ascorbic acid 含量을 정확히 測定할 수 있었다. 또한 分析所要時間

이 TLC法에 비해서 현저히 단축되고 再現性도 좋아서 綠茶中の ascorbic acid 定量에는 本法이 적합함을 확인하였다.

參 考 文 獻

- 1) 星野胤夫: 日本茶業組合文集, 2, 15 (1937)
- 2) 泉敬子: 家政學雜誌(日本), 17, 327 (1966)
- 3) 長谷川于鶴, 梶田武俊: 調理科學(日本) 1, 47 (1968)
- 4) 山口稅三, 慶松一郎: 日本衛生學會誌, 7, 91 (1935)
- 5) 星野胤夫: 日茶試集, 12 (1936)
- 6) 藤田秋治, 海老原勉: 東京醫事新報 3012, 1 (1936)
- 7) 郷千枝子: 醱酵工學雜誌, 28, 159 (1950)
- 8) 稻垣長典: 榮養と食糧, 9, 103 (1956)
- 9) 藤田秋治, 廣瀬福子, 内山由子: ビタミン, 40, 17 (1969)
- 10) 梶田武俊, 千田貢: 日本農藝化學會誌, 46, 137 (1972)
- 11) 梶田武俊, 山本喜男, 千田貢: 分析化學(日本), 22, 1051 (1973)
- 12) 辛美慶: 日本奈良女大大學院 修士論文 (1973)
- 13) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之: 食品分析ハンドブック(建帛社, 東京) p. 304 (1973)
- 14) 野村男次, 大村浩久: レダクトンの化學(内田老鶴園新社, 東京) p. 52 (1969)
- 15) Roe, J. H. and, Kuether C. A.: J. Biol. Chem., 147, 399 (1943)
- 16) 松下竹次郎, 酒井達郎, 音羽鈴子: 榮養と食糧, 13, 31 (1960)
- 17) 池田靜徳, 佐藤守, 木村良太郎: 日本水産學會誌, 29, 757 (1963)
- 18) 梶田武俊, 梶喜代子, 富永育子: 日本食品工業學會誌, 16, 282 (1969)