

히드록삼酸變法에 의한 牛乳脂肪定量

朴 官和·吳 太廣·盧 奉洙*

서울大學校 食品工學科, *東西食品株式會社

(1981년 3월 31일 수리)

Determination of Fat Content in Milk by Modified Hydroxamate Method

Kwan Hwa Park, Tae Kwang Oh and Bong Soo Noh*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 170

Dongsuh Foods Co, Inchon 160-04

(Received March 31, 1981)

Abstract

A modified hydroxamate method was developed for determination of fat content in milk. Fat globules in milk were destroyed by adding ethanol and diethyl ether, and a homogeneous reaction system was obtained. The homogenate was reacted with hydroxylamine, milk fat formed ferric hydroxamate chelates which had red-purple color, and the ferric hydroxamate chelates was analyzed colorimetrically. This method was simpler than original hydroxamate method and comparable with the Babcock method in accuracy.

序 論

牛乳, 動物의 母乳등의 脂肪定量法으로는 Gerber 法⁽¹⁾, Babcock法⁽²⁾, Roese Gottlieb法⁽²⁾이 使用되어 왔고 最近에는 自動化된 方法⁽²⁾과 赤外線을 利用하는 方法⁽²⁾이 開發되어 있다. 이 方法들은 精密한 方法이 아니고 小量의 試料나 微量의 脂肪定量에는 不適合하다. Goddu⁽³⁾등은 히드록실아민(hydroxylamine)을 예스베르定量에 使用했고 Nijs⁽⁴⁾은 히드록실아민을 이용해서 牛乳脂肪을 定量했는데, 牛乳脂肪은 脂肪球의 形태로 존재하며 그 주위를 지방酸형성단백질이 둘러싸고 있으므로⁽⁵⁾ 히드록실아민과 지방진파의 충분한 반응여부가 문제가 되고 있다고 예상된다.

Park⁽⁶⁾은 히드록삼산(hydroxamate)變法으로 기지의 양을 첨가한 트리-올레인(triolein) 溶液중에서 트리-올레인을 定量하고 이를 리파아제(lipase)力價測定方法으로 利用하였다.

本實驗에서는 相分離가 없는 狀態에서 유기용매 添加로 脂肪球를 開裂시켜서 히드록실아민과 脂肪의 反應을 容易하게 하였을뿐만 아니라 小量의 試料와 微量의 脂肪을 定量할 수 있는 간편한 方法을 開發하였다.

方 法

히드록실 아민 溶液⁽⁶⁾

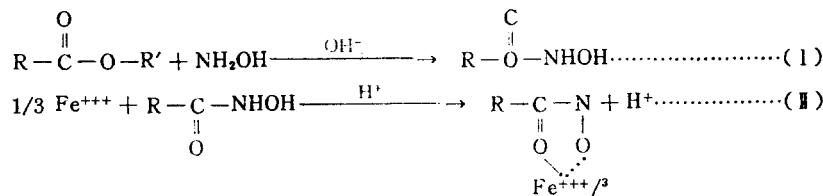
히드록실아민·염산(NH₂OH·HCl) 20 g을 메탄올 220 ml에 녹인 溶液과 3.5 N NaOH를 5 : 3의 비율로 회석한 溶液

FeCl₃ 溶液⁽⁶⁾

FeCl₃ 100 g을 1.2 N 염산 100 ml에 녹인 溶液과 메탄올을 1 : 4로 회석한 溶液

測定原理

알칼리 存在下에서 히드록실 아민이 脂肪酸에스테르를 加水分解해서 히드록삼산(I)(hydroxamic acid (I))을 生成하고 酸의 存在下에서 철 이온(ferric ion)



과 결합해서 붉은자주색의 철-히드록сим산(ferric-hydroxamate)의 철레이트(chelate)복합체(■)를 형성하는 성질을 이용해서 지방을定量하였다⁽⁶⁾.

牛乳와 같이 水溶液中에 脂肪球가 分散되어 있을 경
우에는 히드록실 아민이 직접 脂肪과 作用하는데 방해
가 되므로 本實驗에서는 에탄올과 디-에틸 에테르를 牛
乳에 添加하여 脂肪球를 開裂시키고 히드록실 아민과
잘反應할수 있는 狀態로 하였다.

測定方法

0.2 ml의試料에 2.5 ml에 탄을과 2.5 ml 디-에틸에테르을 넣고서 잘섞은후 1.0 ml의 히드록실 아민溶液을 넣고 均一狀으로 만든후 30분간 反應하게 한다음 0.45 ml 염산과 0.5 ml의 FeCl_3 溶液을 넣고 作用시킨후 2~3분간 원심분리후 525 nm에서 吸光度를 測定하였다⁽⁶⁾.

脂肪定量 略 標準曲線

脂肪(olive油)을 클로로포름으로 100배 희석한 후 其知의 量을 취해서 중탕냄비에서 클로로포름을 捸發시킨 후 0.2 ml의 증류수를 加해서前述한 測定方法으로 吸光度를 測定하였다. 한편, 試料中の 脂肪量을 구하기 위한 標準曲線은 脂肪粉乳(Difco skim milk dehydrated)를 牛乳組成⁽⁵⁾과 같게 조제한 후 其知의 脂肪(olive油)을 넣고 乳化시킨 다음 標準曲線을 만들었다. 이를 利用해서 廉乳와 야구르트(yagurt)脂肪量을 定量하였다.

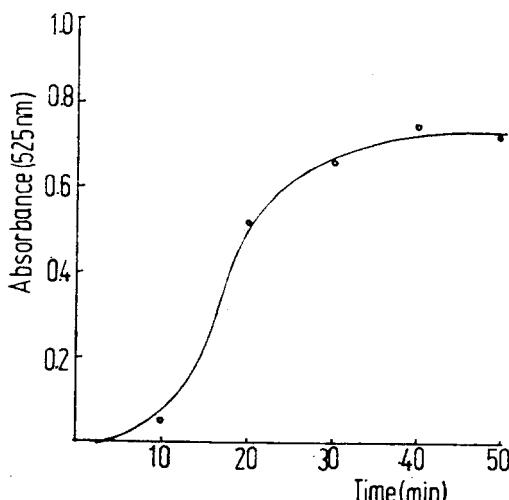


Fig. 1. Effect of reaction time on the hydroxamate formation

는바 이때 市乳는 물로 회석해서 使用하고, 야구르트는 회석치 않고 使用하였다.

結果・考察

히드록살산 形成時間과 色安定性

牛乳를 5배로 회석 후 히드록삼산을 形成하는데 필요 한 時間을 測定한 結果 Fig. 1과 같다. 대체로 30分 이후에서 着度의 變化는 거의 없었다. 또한, 發色후의 色安定性은 Table 1에서와 같아 40분이후 變化가 없으므로, 測定時 發色率 色安定性은 問題가 없었다.

Table 1. Stability of ferric hydroxamate complex as a function of reaction time

Time (min)	5	10	20	30	40
Absorbance (525 nm)	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64

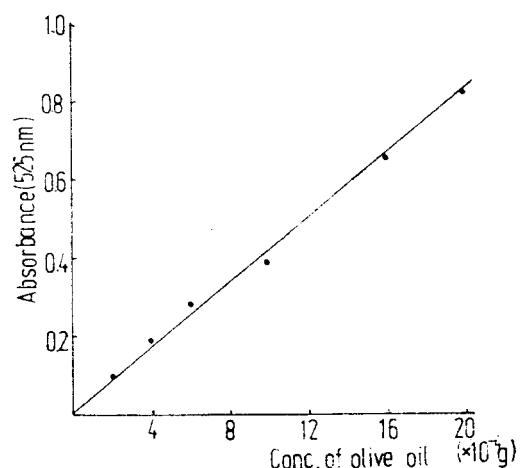


Fig. 2. Relationship between concentration of olive oil and absorbancy of hydroxamate complex

純粹脂肪의 定義

울리브오일의 濃度에 따른 吸光度는 Fig. 2와 같이 直線관계를 보이고 있다. 이를 利用해서 $4 \times 10^{-4} g$ 울리브오일을 添加한 吸光度를 測定하고 脂肪을 定量한 結果는 Table 2와 같다. 95%의 信頼度에서 高度의 有意水準을 가진다.

牛乳중의 非脂肪性物質(N.F.S.)과 수크로오스의 영향

히드록실아민은 에스테르, 안하드리드(anhydrides), 카르본산(carboxylic acid)의 加水分解 가능한 유도체와 反應해서 히드록산을 生成하므로 牛乳중의 N.F.S 및 수크로오스가 本實驗方法에 미치는 영향을 調査한結果 Table 3과 같다.

Table 2. Comparison of modified hydroxamate Method and Babcock Method for determination of fat content in several foods

Sample (12 Replieates)	Modified hydroxamate method		Babcock method
	Average fat content (%)	t**	Average fat content (%)
Olive oil	4.21	0.955	—
Market milk	3.068	0.465	3.30
Yagurt	0.281	—	not applicable

**t_{0.0511} = 2.201

Table 3에서 보는바와 같이 1% 카제인(casein)과 5% 락토오스(lactose)의 경우는 吸光度가 微細하게 영향을 미치지만 牛乳를 물로 회석시 N.F.S의 濃度가 減少되고, 또한 對照區를 N.F.S가 添加된 것을 使用하므로 本實驗에서 그리 問題視되지 않음을 알 수 있었다.

설탕은 야구르트나 加糖한 牛乳의 脂肪定量을 為해 测定하였는데 Table 3에서와 같이 영향을 별로 미치지 않았다.

市乳의 脂肪定量

脫脂乳로 市乳의 組成과 같은 만든 調製乳에 기지의 올리브油를 넣고 市乳를 증류수로 회석했을 때의 脂肪量을 百分率로 表示한 標準曲線은 Fig. 3과 같다

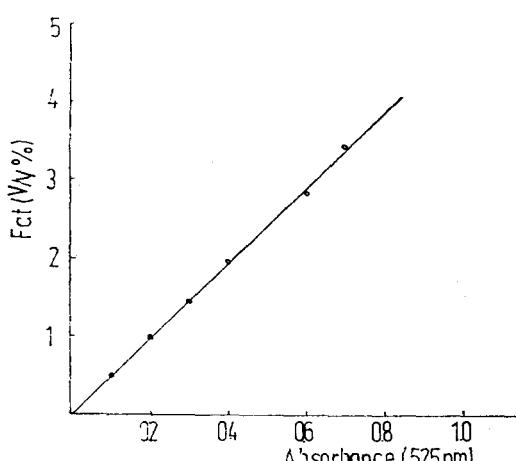


Fig. 3. Calibration curve for determination of fat content in milk

Table 3. Absorbance of non fat solids-ferric hydroxamate chelates

Non-fat solids	Absorbance (525 nm)
5% Lactose	0.041
1% Casein	0.024
15% Sucrose	0.018

나타난다. 이때 부피 百分率로 나타내기 위해서 회석 후, 牛乳密度를 補正한 數置로 標準曲線을 作成했다. 이를 利用해서 市乳 및 요구르트를 定量한 結果 Table 2에서와 같이 牛乳의 경우는 Babcock法과 야구르트의 경우는 Babcock法으로 눈금을 읽기 어려울 정도로 微少해서 測定하기 곤란했지만 강등⁽⁷⁾이 보고한 數值와는 잘 일치한다. 또한 각기 다른 製品의 市乳를 利用해서 Babcock法과 比較한 結果는 Table 4와 같다.

Table 4. Comparison of modified hydroxamate method and Babcock method for determination of fat content in market milks (v/v %)

Method Sample	Modified hydroxamate	Babcock
A	3.03	3.07
B	3.14	3.10
C	3.20	3.18

히드록산의 脂肪定量은 에스테르基가 일정할 수록 정확한 定量方法인데 本實驗에서 牛乳는 97%⁽⁵⁾가 트리-글리세리드(triglyceride)로 되어 있고 0.5%미만의 모노-글리세리드 및 디-글리세리드로 되어 있어서 큰 오차를 가져오지 않지만, 標準曲線 作成時에는 트리-글리세리드量을 補正해 주었다. 또한, 트리-글리세리드에 結合된 지방산의 炭素數와 發色程度는 약간의 差異⁽³⁾가 있어 本實驗方法의 부정확함에 原因이 되나 4

牛中 炭素數가 14이상 18까지가 80%⁽⁵⁾를 차지해서 큰 오차를 가져오지 않는다.

要 約

牛乳의 脂肪함량을 测定할수 있는 간단한 比色定量法을 開發하였다. 牛乳에 에탄올, 디-에틸 에비트를 加하여 反應系를 單一狀으로 하고 脂肪球가 개열되어 히드록실 아민과 反應이 충분히 일어나게 하였다. 여기서 生成된 적자색의 히드록삼산 칼레이트를 비색제로 测定하였다. 本方法은 원래의 히드록삼산法보다 조작이 간편하며 Babcock法과 比較해 본 결과 고도의 정확도를 보였다.

文 獻

1. Bakalor, S.: *Dairy Sci. Abstr.*, **28**, 1 (1966)
2. Horwitz, W.: *A.O.A.C.*, 13th ed., p.245 (1980)
3. Goddu, R. F., Leblanc, N. F. and Wright, C. M.: *Anal. Chem.*, **26**, 1251 (1955)
4. Nijs, J. and Verheyden, J.: *Milchwissenschaft*, **15**, 462 (1960)
5. Harper, W. J. and Hall, C. W.: *Dairy Technology and Engineering*, AVI, p.18 (1976)
6. Park, K. H., Duden, R. and Fricker, A.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **157**, 327 (1975)
7. 강영재, 윤영호, 김현욱: 한축지, **21**, 543 (1979)