

근적외 분광분석법에 의한 고춧잎의 Ascorbic Acid 함량 측정

김 계 옥

덕성여자대학교 식품영양학과

Rapid Determination of Ascorbic Acid in Red Pepper Leaves by Near-Infrared Reflectance Spectroscopic Analysis

Kye-Ok Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

The loss of ascorbic acid in dried red pepper leaves prepared with different drying methods of air-, oven-, microwave oven-, and vacuum drying with blanching or without was determined by a HPLC method. Vacuum drying showed the least loss of ascorbic acid than the other drying methods. Additionally, the feasibility of near infrared reflectance spectroscopy(NIRS) to determine the contents of ascorbic acid in the red pepper leaves was studied. NIRS was found to be an efficient way of determining ascorbic acid contents in red pepper leaves, requiring only 30 seconds of an analytical time.

Key words: red pepper leaves, ascorbic acid, HPLC, near-infrared spectroscopic analysis

서 론

식품에서 ascorbic acid는 환원형과 산화형으로 존재하여 생리적 활성효과가 환원형에 비하여 산화형은 50% 정도이며 우리나라 식품소비 형태로 보아 섭취상태가 대부분 침채류나 숙채류로서 신선한 채소의 섭취형태가 비교적 적다. 또한 ascorbic acid는 암, 감염증, 동맥경화 등의 성인병에 따른 억제제로서의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다(1). 다른 보고(2)에서는 알콜 섭취나 흡연이 혈중의 ascorbic acid level을 낮춘다고 하였다. 여름철 채소에서 저장기간 동안에 ascorbic acid의 함량 변화에 대한 연구(1), 채소를 건조하여 저장하였을 때의 ascorbic acid의 변화에 관한 보고(3), 냉동 야채의 저장에 의한 ascorbic acid의 변화에 대한 것(4)과 손쉽게 구할 수 있는 상용채소를 냉장고 저장시 ascorbic acid 함량 변화에 관한 보고(5)도 있다.

채소의 장기 저장법인 건조방법과 전처리를 달리 했을 때 채소의 중요 성분이며 품질 측정의 지표인 ascorbic acid는 열과 산소에 민감해서 건조나 전처리에 의해 많이 파괴된다. 건조 방법, 세척, blanching, 다른 예비처리 등에 의해 ascorbic acid 함량이 생시료의 10~50% 정도 손실된다고 한다. 건조와 blanching에 의한 as-

corbic acid 잔존량에 대한 연구는 광범위하게 이뤄졌으며 원래 시료의 50%가 감소한다고 보고(6)되었다. Ascorbic acid의 잔존량은 전처리(blanching방법, sulfuring), 건조상태(시간, 온도, 방법)에 따라 다르기 때문에 정확하게 비교하기는 어려움이 많다.

Morgan 등(7)은 blanching한 broccoli의 ascorbic acid는 건조 동안에 10~20% 손실됐으나 blanching하지 않은 broccoli는 64%가 손실되었고, blanching한 시금치는 건조동안에 30%의 ascorbic acid가 손실되었으나 blanching 하지 않은 시금치에서는 70%의 손실이 있었다.

열처리에 의한 채소류 중의 ascorbic acid의 손실량은 식품의 종류, 혹은 열처리 방법에 따라 각기 다르지만 일반적으로 대략 40~90%의 범위 내에서 파괴된다고 알려져 있는데 채소류 중에서 시금치, 당근, 완두의 ascorbic acid 잔존률을 비교한 결과 boiling, steaming, microwave 열처리에서 각각 24~93%, 37~100%, 100% 잔존률을 보였다고 보고(8)되었다. Ascorbic acid는 산화되기 쉬운 특성, 열에 불안정, 수용성인 점을 감안해서 채소 조리시, 또는 건조 저장시 잔존량이 문제가 된다. 우리나라 식습관으로 채소를 데치거나 끓여서 먹는 것이 보통이므로 우리가 식용하는 채소는 실제 함유하는 것과는 ascorbic acid 함량에서 차이가 있게 된다.

우리나라 채소류 중에 함유된 ascorbic acid 함량에 대해서는 많은 보고가 있지만, 채소 저장방법의 하나인 건조방법과 건조방법시 blanching의 유무에 의한 ascorbic acid 잔존량을 비교한 연구는 없었다.

Ascorbic acid의 분석 방법으로는 UV spectroscopy를 이용한 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH), 2,6-dichloroindophenol(DCIP) 등이 있고 효소 방법으로 ascorbic acid oxidase(EC.1.10.3.3)를 이용한 것이 있으며 chromatography법으로 liquid chromatography(TLC, HPLC), gas chromatography(9)가 있다. 그러나 이와 같은 방법들은 시료를 화학적으로 처리하는 과정이 복잡하거나 시간의 소요가 많은 단점이 있으므로 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법으로 물리적으로 분쇄한 시료를 사용하여 신속 정확하게 분석하는 비파괴 측정법을 택하는 경우가 있으며 이의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 그 중에서도 특히 근적외 분광분석법은 약 1분 이내에 식품 중의 화학성분들을 일시에 측정할 수 있는 특징이 있어 주목을 끌고 있다(10). 근적외분광분석법(near infrared reflectance spectroscopy : NIR)을 이용해서 ascorbic acid를 측정하는 연구는 전무한 실정이므로 본 연구에서는 ascorbic acid가 많은 고춧잎에서 ascorbic acid를 NIR 분석법으로 측정할 수 있는지 확인하고자 시도하였다.

재료 및 방법

재료 및 전처리

건조 시료에서의 ascorbic acid 손실을 살펴보기 위해 고춧잎을 1991년 9월에 경동시장에서 구입하였다. 건조실험은 5번의 반복 실험을 행하여 그 결과를 평균하였다.

시료는 blanching한 것과 blanching하지 않은 2군으로 나누어 건조방법에 따라 행하였다. Blanching은 Kuznians 등(11)의 방법에 따라 0.5kg의 시료를 100°C 끓는 물 4.7L에 넣었다가 곧 꺼내어 흐르는 수돗물에서 식힌 후 물기를 제거하고 다음에 기술하는 건조실험에 사용하였다. Blanching하지 않은 시료는 흐르는 물에 깨끗이 씻고 Kimwipe로 물기를 닦아낸 후 건조실험에 사용하였다.

건조실험

Blanching한 시료와 blanching하지 않은 시료 각각을 자연건조, oven 건조, microwave oven 건조, vacuum 건조의 방법으로 건조시켜 분석하였다.

자연건조시 Maeda와 Salunkhe(12)의 방법에 따라 통풍이 잘되는 음지에서 3일에서 4일간 건조시켰다. Oven 건조시 국제 이화학사 제품인 oven(Model: Do-Mc)을 사용하여 blanching한 시료는 70°C에서 24시간, blanching하지 않은 시료는 70°C에서 36시간 건조시킨 후 분석에 사용하였다. 삼성전자 제품인 전자렌지 RE 700 W를 사용하여 Mebesa와 Baldwin(13)의 방법에 따라 MV 220V로 30분간 건조하였다. Vacuum oven(Yamata DR 31)에서 76cm Hg, 80°C로 blanching한 시료는 30시간, blanching하지 않은 시료는 42시간 건조하였다. 예비실험을 통하여 시료들에서 수분 함량을 일정토록 하기에는 blanching하지 않은 시료가 시간이 더 걸렸다.

HPLC에 의한 ascorbic acid 정량

고춧잎을 여러가지 건조방법에 따라 건조시킬 때 ascorbic acid의 손실량을 살펴보기 위하여 HPLC로 ascorbic acid를 정량하였다. 각 분말 시료 10g을 Waring blender로 3분간 마쇄한 후 100ml의 6% metaphosphoric acid(pH 5.0)에 녹인 후 암소에서 1.5시간 흔들여 추출하였다. 이를 Whatman no.1 여과지로 1차 여과한 후 0.45µm membrane filter를 이용하여 감압 여과하여 시료액을 만들었다. 같은 조건으로 표준 ascorbic acid를 HPLC(Waters사 제품 Model 440)로 µ-Bondapak C₁₈ column으로 분석한 후 peak 높이로 HPLC 기기에 부착된 monitor로 환산하여 정량하였다. Mobile phase에서 water: methanol: tetrabutyl ammonium phosphate의 비율은 96.5 : 2.5 : 1.0였다. Flow rate는 2.0ml/min였다. UV detector를 사용하였고 254nm에서의 흡광도를 측정하였다.

통계분석

ANOVA 방법으로 통계 처리한 후 Tukey test로 건조방법간과 blanching과 blanching하지 않은 것 사이의 유의성을 검증하였다.

근적외 분광분석

건조방법을 달리한 시료를 5g씩 취하여 시판분쇄기(SK-1800, Susiki Co., Japan)로 20초간 분쇄하여 입도를 균일하게 하였다. 분쇄한 시료 약 3g을 연구용 근적외 분광분석장치(Infrared Analyzer Data Analysis Software) 프로그램을 사용하여 1,100nm에서 2,500nm까지 2nm 간격으로 스펙트럼을 측정하여 그 흡광도 데이터를 컴퓨터(IBM PS/2, Model 50)에 입력시켰다. 본 연구에서 스펙트럼 해석을 위해 사용한 2차 미분 스펙트럼

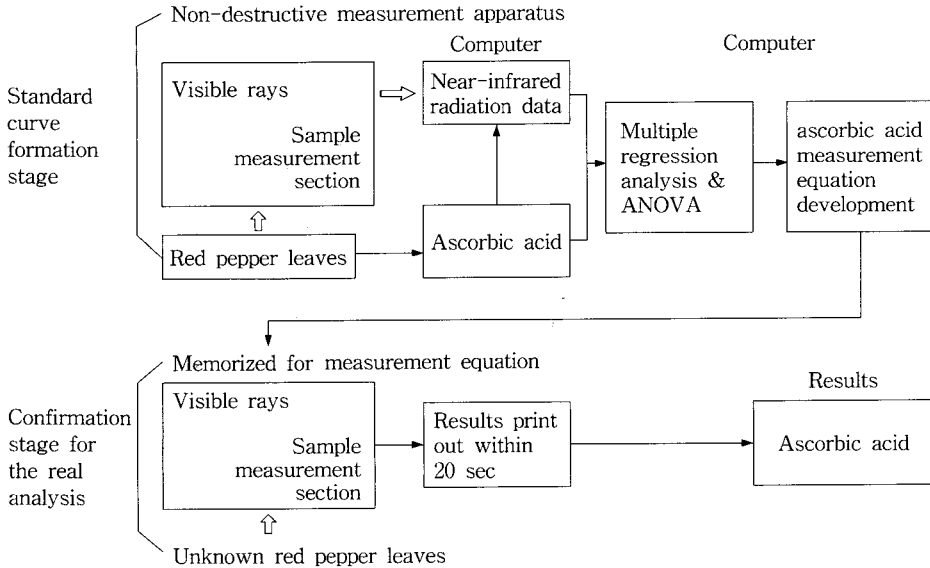


Fig. 1. Overview of NIRS(near infrared reflectance spectroscopy).

에서는 peak가 아래로 돌출될수록 흡수가 강함을 의미한다.

검량식 작성

근적외 분광분석법으로 고춧잎의 ascorbic acid 함량을 비파괴적으로 측정하기 위해서는 일차적으로 ascorbic acid와 관련있는 근적외 파장 및 혼존성분에 의한 오차를 보정할수 있는 파장의 선정 및 그 계수 확정 조작, 즉 검량식의 작성이 필요한데 그 조작 순서는 다음과 같다. HPLC로 분석한 33점의 검량식 작성용 시료의 ascorbic acid 함량치와 근적외 분광 스펙트럼 데이터와의 사이에 ascorbic acid 측정을 위한 파장들로 구성된 복수의 후보 검량식과 각각의 검량식에 대한 중상관계수(MCC: Multiple Correlation Coefficient) 및 기준 분석치와 근적외 분석치 사이의 표준오차(SEE: Standard Error of Estimation)를 상기 IDAS 프로그램으로 계산하여 구하였다. 얻어진 각각이 후보 검량식의 측정 정확도를 확인하기 위하여 별도로 준비한 미지 시료 10점을 취하여 각각 얻은 근적외 분석치와 기지의 혼입치간에 표준오차(SEP: Standard Error of Prediction)를 비교함으로써 실행 정확도가 우수한 검량식을 선정하였다. 그리고 중상관계수와 SEE 및 SEP를 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{중상관계수}(R) = \sqrt{1 - \frac{SEE^2 (n-k-1)}{SD_{\text{range}}^2 (n-1)}}$$

Standard error of estimate(SEE)

$$= \sqrt{\frac{\sum(\text{NIR value} - \text{Reference value})^2}{n-k-1}}$$

SD range=Standard deviation of the range

n=Number of samples, k=Number of wavelengths

결과 및 고찰

본 연구에서는 건조방법에 따른 ascorbic acid 변화를 측정하기 위하여 자연건조, oven-, microwave oven-, vacuum 건조를 실행하였으며 HPLC 방법으로 측정된 ascorbic acid 를 근적외 분광법으로 다시 측정하였다.

건조방법에 따른 고춧잎의 ascorbic acid 변화 결과를 보면 Table 1과 같다. Blanching한 시료가 blanching 하지 않은 시료보다 많은 ascorbic acid 잔존량이 있었으며 건조방법 사이에 유의차가 나타남을 보였다. 건조방법으로는 진공에서 건조함으로 산소와 접촉이 가장 적은 vacuum이 가장 좋은 방법으로 판단된다.

고춧잎 시료의 근적외 스펙트럼을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 이 결과를 보면 건조방법 각각에 대한 차이는 뚜렷하지 않았으나 각 건조방법에 의한 시료에 있어서 blanching 처리의 유무에 따라 차이를 나타내었다. 전반적으로 blanching 처리한 시료군에 있어서는 blanching 처리하지 않은 시료군에 비해 흡광도가 큼을 나타내고 있는데 이는 blanching 처리시 가해진 열에 의해 잎조직이 전체적으로 부드러워져 동일한 분쇄처리

Table 1. The differences in ascorbic acid contents of red pepper leaves depending on drying methods (mg/100g 시료)

Drying method	Pretreatment of sample			
	Blanched		Unblanched	
	Range	Mean	Range	Mean
Air drying	23.4~37.1	28.1 ^a	19.0~24.2	25.7 ^a
Oven drying	18.8~37.6	29.9 ^a	19.1~37.6	24.4 ^a
Microwave oven drying	28.3~48.4	40.3 ^b	16.2~50.4	31.1 ^a
Vacuum drying	22.7~84.7	64.0 ^c	42.2~57.5	51.5 ^b

The means with same superscripts in a row are not statistically different. Means within a column not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey's test.

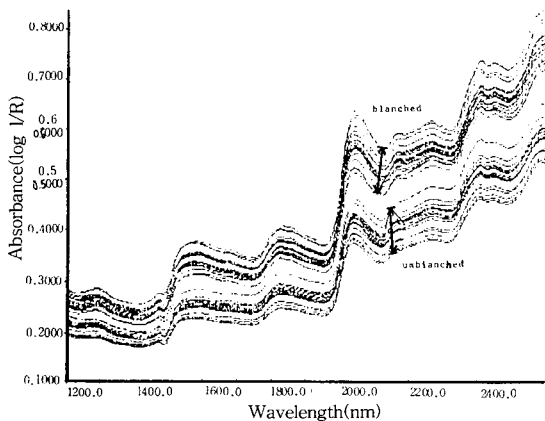


Fig. 2. Near infrared spectra of red pepper leaves powder.

시 입도가 가늘어진 때문이라고 생각된다. 이러한 경향을 응용한다면 blanching 처리를 거친 시료인지 거치지 않은 시료인지 스펙트럼 패턴을 보아 판별이 가능할 것으로 사료된다.

HPLC 법으로 측정된 ascorbic acid 함량치와 근적외 스펙트럼 데이터 간에 중회귀 분석을 행한 결과는 Table 2와 같다.

1과장에서 4과장으로 구성되는 각각의 검량식에 10점의 확인용 시료를 적용시켜 실험 측정 오차(SEP)를 조사한 결과 2,252nm, 2,262nm, 1,744nm, 1,712nm의 4과장으로 구성된 검량식의 SEP가 4.881% 측정 정확도가 가장 높았으며 그때의 중상관계수는 0.933이었다. 상기 4과장으로 구성된 근적외 분석법으로 측정된 고춧잎 시료의 ascorbic acid 함량치와 HPLC에 의한 ascorbic acid 함량치를 상호 비교한 결과는 Fig. 3과 같다.

HPLC에 의해 측정된 ascorbic acid 함량과 NIR로 ascorbic acid 측정치를 상호 비교한 결과 측정 오차가 크게 나타난 시료가 2점 있지만 ascorbic acid 함량치의

Table 2. Result of multiple regression analysis of ascorbic acid content in dried red pepper leaves

Used wavelengths(nm)	MCC	SEE(%)	SEP(%)
1100	0.601	9.958	11.496
1408, 1652	0.779	7.950	9.923
2244, 2292, 1744	0.888	5.931	7.235
2252, 2262, 1744, 1712	0.933	4.731	4.881

Number of sample (n=33) and ascorbic acid content ranges from 13.3mg% to 56.0 mg% and mean value was 31.4mg%. MCC: Multiple correlation coefficient between chemically analyzed and NIR estimated value
SEE: Standard error of estimation
SEP: Standard error of prediction(n=10)

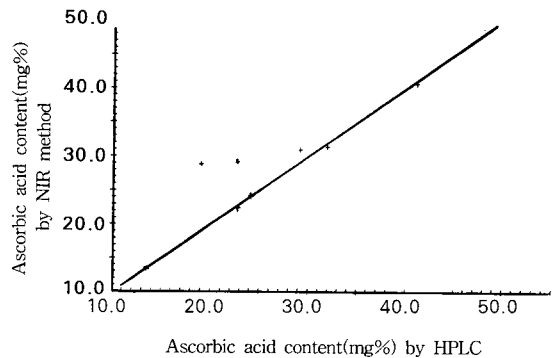


Fig. 3. Relationship between NIR data predicted by use of four wavelengths 2,252nm, 2,262nm, 1,744nm, 1,712nm and contents analyzed by HPLC for 10 samples of dried red pepper leaves powder.

폭이 넓음에 비해 측정오차가 5mg 정도임을 비교해볼 때 근적외 분광분석법으로 고춧잎 중의 ascorbic acid 함량을 신속하게 측정할 수 있는 가능성이 있음을 확인할 수 있다.

앞의 Table 1에서 ascorbic acid 함량을 측정하기 위한 각 검량식을 구성하고 있는 파장의 선별 근거를 확인하기 위해 ascorbic acid 표준품의 근적외 스펙트럼의 raw(Fig. 4) 및 2차 미분 변환 스펙트럼을 측정하여 해석한 결과 1,457nm, 1,749nm, 2,249nm, 2,477nm에서 높은 흡수율이 있음을 알 수 있었다.

그리고 ascorbic acid 함량 정도가 서로 다른 3개의 고춧잎 시료를 선별하여 이들의 2차 미분 스펙트럼을 측정하여(Fig. 5) 부분적으로 확대하여 해석한 결과 Fig. 6에서 1,712nm 부근이, Fig. 7에서 2,250nm 부근이 ascorbic acid 함량 정도의 차이에 비례 관계를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 이들 파장이 앞서의 중회귀 분석결과에서 선별된 검량식에 포함되어 있음을 보아 이들 파장이 고춧잎 중의 ascorbic acid를 구성하는 관능기를 감지하고 있음이 간접적으로 확인되었다고 생각된다. 나

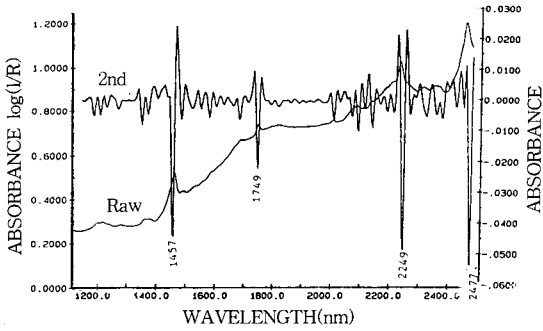


Fig. 4. Raw and 2nd derivative spectra of ascorbic acid.

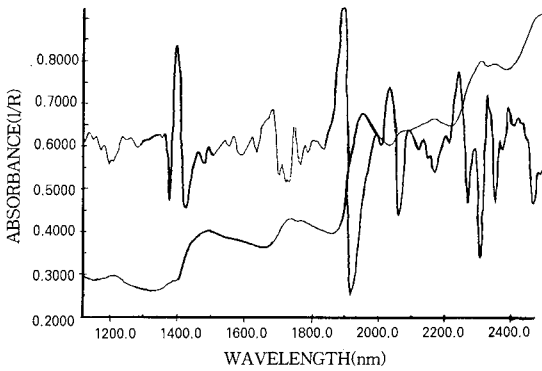


Fig. 5. Raw and 2nd spectra of dried red pepper leaves.

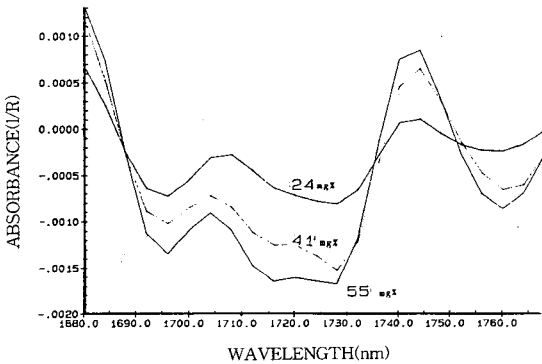


Fig. 6. Second derivative spectra of red pepper leaves samples containing different content of ascorbic acid.

머지 파장은 다른 보정 역할을 하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 사용한 고춧잎의 sample 수는 적었지만 sample 수를 늘리고 HPLC로 분석을 할 때 추출과정에서 생길 수 있는 오차를 줄이는 등의 노력을 통해 SEP 를 더 낮출 수가 있다. 시기와 장소 등의 변이를 둔 채 많은 시료를 구해서 측정한다면 ascorbic acid 함량을 더 정확히 측정할 수 있을 것으로 사료된다.

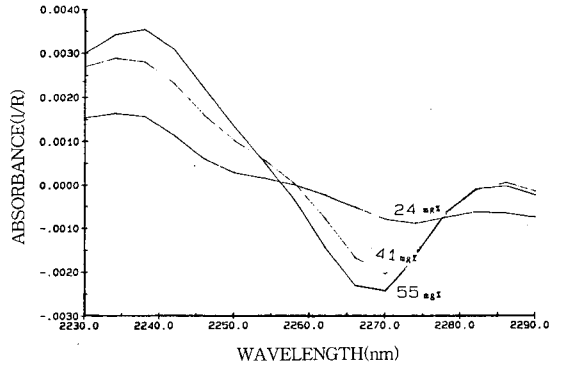


Fig. 7. Second derivative spectra of red pepper leaves samples containing different content of ascorbic acid.

이 방법이 확립된다면 채소에 있어서 ascorbic acid 함량을 약 30초내에 분석할 수 있게 되며 이 방법을 모든 고춧잎에 적용시키기 위해 다양한 고춧잎 시료를 추가로 입수하여 분쇄방법 등을 일정하게 통일하여 범용성이 있는 검량식을 작성해야 할 필요가 있는 것으로 생각된다. 이로써 종래 화학적 성분명과 화학적 분석방법이 확립되어야만 측정 가능한 것으로 간주되어 왔던 식품에서의 ascorbic acid 함량이 근적외 분광분석법에 의해 측정될 수 있는 가능성이 더욱 확대될 것으로 생각되며 최근 근적외 분광분석학 분야에서 개발된 주성분 분석 및 판별 분석에 관한 연구는 이러한 채소의 품질 평가 분야의 연구에 크게 활용될 것으로 기대된다.

요 약

건조 고춧잎의 ascorbic acid 함량은 건조방법간에 다소 잔존량의 차이가 나타났으며 vacuum 건조시 공기와의 접촉이 없어서 ascorbic acid 잔존량이 가장 큰 것으로 나타났다. 근적외 분광분석에 의한 건조 고춧잎의 ascorbic acid 신속 측정 가능성을 조사한 결과로 고춧잎과 같은 채소에 함유된 ascorbic acid 함량을 신속히 측정할 수 있다고 판단되었다.

감사의 글

본 논문이 있을 수 있도록 도와주신 이미순 교수님과 이 논문에서 사용된 NIR은 경북대 농화학과의 조래광 교수님께서 사용할 수 있도록 해주시고 도와주신 결과로, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. 이중희 : 채소류의 냉장고내 보관 기간에 따른 ascorbic

- acid 함량 변화에 관한 연구. 성신여대 생활과학논집, **4**, 27(1987)
2. Frazio, V., Flint, D. M., Wahlqvist, M. Acute effect of alcohol on plasm ascorbic acid in healthy subject. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 2394(1981)
 3. 허필숙 : 조리과학. 수학사, p.67(1987)
 4. Ulrich, R. : Very low temperature(quick freezing) and pseudo-stabilization of the chemical composition of food of plant origin. *Ann Nutr. Aliment.*, **32**, 523(1978)
 5. 황희자 : 채소 저장 중의 ascorbic acid 변화에 관하여. 건대 학술지, **15**, 583(1973)
 6. Labuza, T. P. : Nutrient losses during drying and storage of dehydrated foods. *CRC-Critical Reviews in Food Technology*, **3**, 217(1972)
 7. Morgan, A. F., Mackinney, G. and Calteau, R. : Losses of ascorbic acid and four B vitamins in vegetables as a result of dehydration, storage and cooking. *Food Res.*, **10**, 5(1945)
 8. Hendel, C. E. : Effects of commercial processing on the composition of fruits and vegetables. In "Nutritional evaluation of food processing" Harris, R. S. and Von Loesecke, H. W.(eds.), 148 AVI Publishing Co., West Port, CT(1971)
 9. Kissinger, P. T. and Pachla, L. A. : Analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products, and pharmaceuticals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1(1985)
 10. 조래광 : 식품공업에 있어서 근적외 분석법의 응용. 식품과학, **20**, 4(1987)
 11. Kuznians, A., Bowers, A. J. and Craig, J. : Ascorbic acid and folic acid content and sensory characteristics of dehydrated green peppers. *J. Food Sci.*, **48**, 1246(1983)
 12. Maeda, E. E. and Salunkhe, D. K. : Retention of ascorbic acid and total carotene in solar dried vegetables. *J. Food Sci.*, **46**, 1288(1981)
 13. Mabesa, L. B. and Baldwin, R. E. : Ascorbic acid in peas cooked by microwaves. *J. Food Sci.*, **44**, 932(1979)

(1998년 2월 5일 접수)