

테트라하이드로퓨란에 의한 추출방법을 이용한 츄잉검의 비타민 C 정량

노 회진 · 김 필 · 박 천호 · 이 기정 · 노 봉수* · 최 진환
동양제과 기술개발연구소, *서울여자대학교 식품 · 미생물공학과

Determination of Vitamin C in Chewing Gum Using Extraction by Tetrahydrofuran

Hoe-Jin Roh, Pil Kim, Cheon-Ho Park, Kee-Jung Lee, Bong-Soo Noh* and Jin-Hwan Choi
Tong Yang Confectionery Co. R&D Center,
*Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University

Abstract

Extraction is the most important and tedious step to determine water-soluble vitamin C in water-insoluble chewing gum. For the rapid determination of vitamin C in chewing gum, a new method of dispersion in tetrahydrofuran(THF) was performed. Vitamin C was easily extracted from gum base using THF. The content of vitamin C in chewing gum was rapidly quantified with high reliability by an enzymatic method using a chewing gum sample dispersed in tetrahydrofuran.

Key words : chewing gum, vitamin C, determination, tetrahydrofuran

서 론

츄잉검은 검베이스에 다른 식품 또는 식품첨가물을 가하여 가공한 것으로⁽¹⁾ 검베이스로는 치콜, 제루통, 솔바 등의 천연수지나 초산비닐수지, 뷰틸러버, 폴리이소뷰티렌 등 러버류, 에스테르검, 왁스류 등 고분자 물질을 이용하고 여기에 유화제와 충전제가 균일하게 혼합된 것을 지칭한다. 이러한 검에 비타민 C를 첨가하기도 하는데 품질관리를 위해 비타민을 분석하는 경우, 기존의 방법으로는 충분한 추출이 이루어지지 못하므로 정확한 측정이 이루어지지 못하는 단점을 안고 있다.

현재, 비타민C의 분석에 이용되는 방법에는 2,4-디니트로페닐하이드라진법, 인도페놀적정법, 고속액체크로마토그래피에 의한 정량법^(2,3), o-phenylenediamine을 이용한 형광법⁽⁴⁾, ascorbate oxidase를 이용한 효소법^(5,7) 등이 알려져 있으나 이들 방법은 비타민 C가 반응시약이나 효소와 충분히 접촉하거나 반응할 수 있는 환경에서 가능하다.

검베이스와 같은 폴리머의 경우 쉽게 반응하기가 어려운 한계점을 내포하고 있다.

검에 함유된 수용성 비타민 C의 경우 미량으로 친수성이 아닌 고분자 물질과 함께 혼합되어 있으므로 수용액에 용해되거나 분산되기가 어렵기 때문에, 츄잉검에 포함된 수용성분의 추출을 위해서는 검을 미세한 분말로 분쇄한 후 추출을 통해 분리해야 한다. 그러나 이렇게 분말화 한 후 추출하는 경우에도 입자의 크기나 추출시간에 따라 미량원소의 용출량이 달라질 수 있다. 보고된 바에 의하면, 수용성 당 성분을 충분히 추출하기 위해서는 적어도 48 시간 이상이 소요된다⁽⁸⁾. 그러나 비타민 C의 경우는 미량성분으로 열에 약하며, 산화되기 쉽기 때문에 이처럼 장시간 추출한 후에 정량하는 경우 부정확 할 수 있을 것이다.

소수성인 검 베이스로부터 THF를 사용하여 향료성분을 추출하여 분석하였으며⁽⁶⁾, 이 경우 매우 높은 수율을 보여주었다. 따라서 검베이스에 내포된 비타민 C도 THF에 의해 용이하게 추출될 수 있을 것으로 보인다.

본 연구의 목적은 THF를 이용하여 츄잉검에 포함된 수용성분 중 비타민 C의 추출을 용이하게 하고 이를 신속하게 정량하고자 한다.

재료 및 방법

비타민 C의 분리

사용한 검 시료는 동양제과 기술 연구소에서 자체

Corresponding author : Pil Kim, Basic Research Team, R&D Center, Tong Yang Confectionery Co., 30-10 Munbai-dong, Yongsan-ku, Seoul 140-715, Korea

제작한 시제품을 사용하였다. 분석을 위한 비타민 C를 분리하기 위해 두 가지 방법을 사용하였다. 첫 번째는 검 시료를 냉각(-20°C)시킨 후 블렌더(Hanil, FM 680T, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 분쇄된 검 1g을 *m*-phosphoric acid(1.5% w/v, pH 3.5~4.0) 50 mL에 넣고 1시간동안 강하게 교반하여 수용성분을 추출하였다. 추출된 용액은 membrane filter(0.45 m, Millipore, USA)로 여과한 후 비타민 정량에 사용하였다.

같은 방법으로 분쇄된 검 시료 1g을 50 mL의 THF에 넣고 균일하게 분산될 때까지 10분간 강하게 교반한 후 분산된 용액중 0.1 mL을 정량에 사용하였다. 대조구로는 동일 시료를 20 mL의 *m*-phosphoric acid 용액에서 12시간 교반한 후 다시 침전물에 20 mL의 새로운 *m*-phosphoric acid 용액으로 반복하여 추출하였다. 최종적으로는 40°C, 10 mL의 *m*-phosphoric acid 용액에서 교반하며 추출한 용액을 처음 2회의 추출물과 혼합한 후 50 mL의 부피로 맞추었다.

비타민 C의 검량

Ascorbate oxidase를 이용한 효소 kit(Cat. 409 677, Boehringer Mannheim, German)를 사용하여 비타민 C를 정량 하였다. 이때 시료는 *m*-phosphoric acid 또는 THF에 용해 또는 분산된 상태로 사용했고(0.1 mL), 전체 효소 반응액은 2.7 mL 이었다. 37°C에서 6분간 반응 시킨 후 흡광도는 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)를 이용하여 578 nm에서 측정하였다⁹⁾.

검의 저작

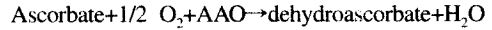
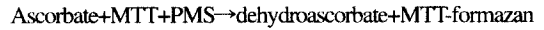
동양제과 기술 연구소에서 자체 제작한 검 시제품을 사용하여 성인 여자 1인이 5g의 시료를 저작하였다. 저작중 1분 및 10분 경과시 약 1g의 시료를 채취하여 검량에 사용하였다. 저작 시료의 채취는 모두 2회 반복하였다.

결과 및 고찰

효소법에 의한 표준곡선 비교

Tetrazolium 염인 MTT[3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]는 PMS(5-methylphenazinium methosulfonate)존재 하에서 모든 환원제에 의해 환원되어 formazan을 형성한다. 비타민 C는 AAO(Ascorbic acid oxidase)에 의해 특이적으로 환원되며, 환원된 비타민 C는 MTT와 반응하지 못하므로, AAO를 첨가한 것과 그렇지 않은 것 간에 MTT-formazan에 의하여 흡광도 차이가 발생되고 이는 비타

민 C 농도와 비례하는 원리를 이용하여 정량할 수 있다.



위 원리를 이용하여 비타민 C의 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 이때 표준 비타민 C는 1.5% meta-phosphoric acid에 녹여서 사용하였다. Fig. 1-a와 같이 흡광도 차이와 비타민 C 농도사이에는 직선상의 관계식을 얻을 수 있었다($R^2=0.9998$). 또한, 비타민 C가 THF에 용해되었을 경우 비타민 C 정량에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 THF에 용해시킨 비타민 C를 토대로 표준곡선을 작성하였다. Fig. 1-b에서 보는 바와 같이 직선적인 상관관계($R^2=0.9996$)를 얻을 수 있었다. 따라서 비타민 C 정량을 위해 폴리머 물질로부터 추출하기 위해 THF를 사용하여 정량할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이것은 전체 반응용

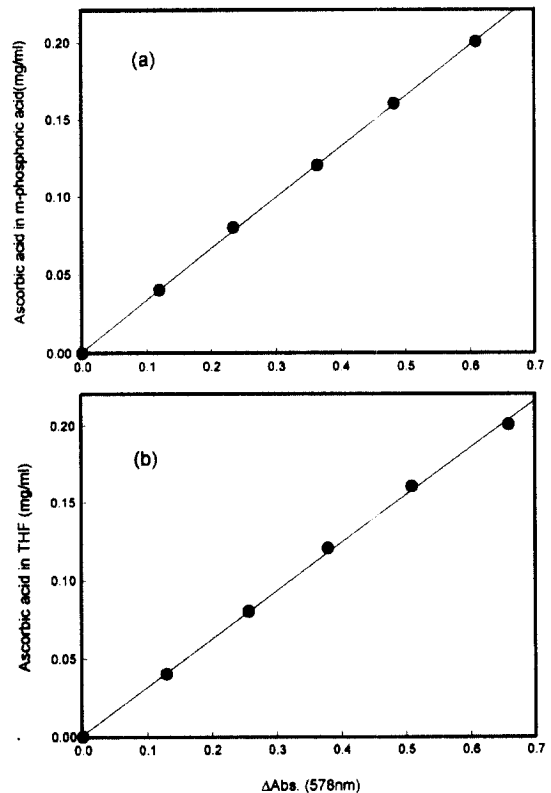


Fig. 1. Standard curve of vitamin C by enzymatic analysis
 (a)in 1.5% *m*-phosphoric acid, $y=0.32725x+0.00101$ ($r^2=0.9998$) (b)in tetrahydrofuran, $y=0.31451x - 0.00093$ ($r^2=0.9996$)

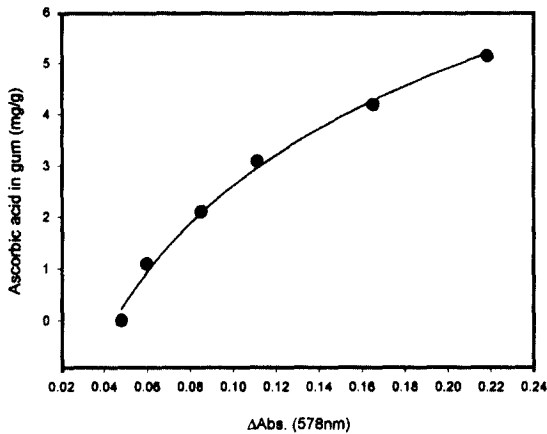


Fig. 2. Standard curve of vitamin C dissolved in THF with dispersion of gum-base
 $y = -121.1 + 131.5x^{0.02625}$ ($r^2 = 0.9934$)

액 2.7 mL 중 THF가 차지하는 부피(0.1 mL)가 상대적으로 낮아서, AAO 효소가 저해받지 않기 때문이었다. 예비 실험결과 THF의 농도가 효소 반응액 중 0.1 mL까지는 첨가되어도 AAO 효소가 저해받지 않고 비타민 C를 정상적으로 정량할 수 있었다.

THF와 효소법에 의한 껌의 비타민 C 정량

껌에 함유된 비타민 C를 정량하기 위해 우선 껌을 THF에 분산시켰다. 이것을 직접 효소반응에 적용하면 껌 분산액에 의해 흡광도 오류가 발생할 수 있으므로, 이를 보정하기 위해서 비타민 C를 포함하지 않은 껌을 THF에 분산시킨 후, 정확한 량의 비타민 C를 첨가한 분산액을 표준액으로 하였다. 껌 분산액을 포함한 비타민 C의 표준곡선(Fig. 2)은 비타민 C 만의 표준곡선(Fig. 1-b)과는 달리 직선의 관계를 나타내지 못하였다. 그 이유는 껌 분산액이 첨가된 효소반응에서 껌 베이스에 의해 빛의 산란이 일어나기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 비록 표준곡선이 직선관계는 아니지만 Power식을 이용한 회귀곡선은 높은 상관관계를 보여 주었다($R^2 = 0.9934$). 이 표준곡선을 이용하여 비타민 C를 함유하는 껌 제품을 THF로 분산 후 효소법에 의해 정량하였다. 이때 대조구로 동일 시료를 1.5% *m*-phosphoric acid 용액을 사용한 추출액을 사용하였고 실험에 사용한 충입껌은 초기에 비타민 C를 500 mg/100 g gum의 농도로 첨가하여 본 연구소에서 제조한 것을 사용하였다.

Table 1은 추출방법에 따른 껌의 비타민 C 함유량을 측정된 것이다. THF를 이용한 추출에서는 3회 측정치가 평균 512 ± 28 mg/100 g 으로 초기에 첨가된 비

Table 1. Determination of vitamin C content in chewing gum¹⁾ with various separation methods

Treatment	Vitamin C (mg/100 g of gum)
Dispersion by THF	512 ± 28
Extraction for 1 hr after grinding ²⁾	332 ± 17
Extraction for 1 hr before grinding ²⁾	43 ± 21

¹⁾Vitamin C (500 mg/100 g gum) was added.

²⁾extraction in an 1.5% *m*-phosphoric acid solution

Table 2. Effect of chewing on the content of vitamin C in gum

Chewing Time	0 min	1 min	10 min
Residual Vitamin C in Gum (mg/100 g gum)	512 ± 28	1.71 ± 0.26	0.05 ± 0.05

The gum harboring vitamin C was masticated for 1 and 10 min. and then the content was estimated by THF-enzymatic analysis.

타민 C에 비하여 2.4%의 오차범위의 농도로 검출되었다. 이것으로부터 THF 분산에 의해 전량의 비타민 C가 회수되었음을 추론할 수 있다. 반면 *m*-phosphoric acid로 1시간동안 추출한 경우에는 각각 332 ± 17 , 43 ± 21 mg/100 g 으로 나타나 동일한 껌에서 검량한 비타민 C 함량 추정치가 서로 크게 차이를 알 수 있었다. 또한 껌 베이스의 분산입자가 작을수록(THF분산 <분쇄 후>분쇄 전) 비타민 C의 함량이 초기 첨가량에 가깝게 나타났다. 이것은 추출에 의해서는 껌에 포함된 비타민 C가 충분히 추출되지 않았음을 암시하며, THF에 의해 껌 베이스가 고르게 분산되는 경우가 분쇄에 의한 방법보다 비타민 C를 보다 잘 용출시킬 수 있음을 나타내었다. 분쇄 후 추출시 가열 등을 통해 껌베이스의 유동성을 증가시킴으로서 추출을 용이하게 할 수 있으나, 비타민 C와 같이 열에 약한 화합물에는 적용시키기 어려운 방법이다. 그러므로 열에 약하고 동시에 THF에 의해 변화되지 않는 물질인 경우에는 THF에 분산시킨 후 분석하는 방법을 고려해 볼 수 있다. THF는 껌 베이스 고분자 물질 중 일부를 분해시켜 껌 조직 속에 묻혀있는 첨가물이 쉽게 유출될 수 있는 것으로 생각되기 때문이다.

저작에 따른 비타민 C 감소효과

껌의 저작에 의해 감소되는 비타민 C를 측정하였다. 각각 1분, 10분씩 저작한 껌을 시료로 하여 THF 분산 후 효소법에 의해 정량한 결과를 Table 2에 나타냈다. 저작에 의해서는 1분 이내에 99% 이상이 유출되는 것으로 나타났다. 그러므로 수용액에서의 추출로는 잘 분리되지 않는 껌에 함유된 수용성분이 저작에

의해서는 잘 분리됨을 알 수 있었다. 또한 일반적으로 츄잉껌에 포함된 수용성분의 분리에는 인체의 구강 조건과 유사한 저작기구를 사용함으로써 껌에 포함된 성분의 정량을 보다 정확히 할 수 있을 것으로 생각된다.

문 헌

1. Korea Foods Industry Association: Food Code, p. 117 (1999)
2. Korea Foods Industry Association: Food Code, pp. 980-984 (1999)
3. Kang, K.H., Noh, B.S., Seo, J.H. and Hawer, W.D. Food Analysis, pp. 234-236. Sung-Kyun-Kwan Univ. Press, Seoul, Korea (1998)
4. AOAC: Official Methods of Analysis 15th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C., 976.22 (1990)
5. Deneke, U., Michal, G. and Beutler, H.O. Neue Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmittel. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 74 : 400-403 (1978)
6. Beutler, H.O. Methods of Enzymatic Analysis 3rd Ed., Vol. VI, pp. 376-385. Verlag Chemie (1980)
7. Kang, S.J., Kim, J.H., Park, S.O. and Noh, B.S. Determination of L-ascorbate in foods with plant tissue based membrane electrode. Foods Biotechnol. 2: 146-151 (1993)
8. Kenjo, K.I. and Sato, K.A. Science of chewing gum, Food Ind. 31: 57-67 (1988)
9. Methods of Biochemical and Food Analysis, p.16, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany (1989)

(1999년 9월 14일 접수)