

XT15(ANCOM)를 활용한 잎담배 에테르 추출물의 최적 분석방법 구명(AOCS Method)

나승주* · 이정래 · 하아람 · 김석재 · 서정규

KT&G 연구원

(2010년 11월 8일 접수 ; 2010년 11월 19일 수정 ; 2010년 11월 29일 승인)

Optimized Analytical Method of Ether Extract in Leaf Tobacco by XT15(ANCOM) (AOCS Method)

Seung-Ju Na*, Jung-Lae Lee, Ah-Rang Ha, Suk-Jae Kim, Jung-Kyu Seo

KT&G Research Institute Daejeon 305-805, Korea

(Received November 8, 2010; Revised November 19, 2010; Accepted November 29, 2010)

ABSTRACT : The ether extract(EE) of leaf tobacco contains diverse compounds such as lipid, resinoid, paraffin hydrocarbons and pigments. Although the correlation of EE concentration with leaf tobacco has not been established clearly, it is known that in some concentration range, EE concentration of leaf tobacco exerts good influence on the quality of tobacco.

Recently, The American Oil Chemist's Society introduced new method(Am 5-04; AOCS, 2009) to determine EE concentration by AT15 extractor. This method is based on extraction with organic solvent at relatively high temperature and pressure, which significantly reduces the extraction time and ensures safety.

The aim of this study is to optimize analytical condition of AOCS method for analyzing EE concentration of leaf tobacco. When sample pre-drying time and extraction time of XT15 were set to 3 hour and 30 minute and 30 minute respectively, EE concentration obtained from AOAC method. Statistical analysis(T-test) showed that there is no difference($P>0.05$) between EE concentrations from two methods.

Key words : leaf tobacco, ether extract(EE), XT15, AOCS, AOAC

에테르 추출물은 대부분 지방과 수지성 물질, 정유(essential oil), 파라핀계 탄화수소(paraffin hydrocarbons), 몇 가지 유기산, 고급 알코올 및 페놀(phenols)로 이루어져 있다(담배 연구의 최근 동향, 한국연초학회, 1997). 또한 Silva 등 (2010)의

연구에서 보고된 바와 같이 다량의 색소물질도 포함되어 있다.

에테르 추출물을 이루고 있는 다양한 계열의 각 화합물은 잎담배의 관능적 특성에 영향을 주는 요인으로 알려져 있으나, 정의 효과를 주는 성분과

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 연구원

*Corresponding author : KT&G Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea
(phone: 82-42-866-5654; fax: 82-42-866-5544; e-mail: naseungju@ktng.com)

부의 효과를 주는 성분이 공존하기 때문에 학자들 간에 서로 다른 의견이 존재한다.

T. C. Tso (1990)의 저서에서 잎담배 중 에테르 추출물의 함량은 전당, 환원당 등과 같이 잎담배 등급에 긍정적인 영향을 미친다고 하였다.

이러한 에테르 추출물을 분석하기 위해 가장 널리 사용되는 방법은 속슬렛 추출장치(Soxhlet apparatus)를 활용한 방법이다(담배성분분석법, AOAC). 하지만, 이 방법은 잎담배 시료를 에테르로 하루 8 시간 씩 3일 (총 24 시간)을 추출하고 에테르를 제거하는 작업을 진행하는 등의 긴 실험 과정을 거쳐야 하고 이러한 과정 중 에테르가 공기 중으로 유출될 가능성이 커 실험자 및 실험실 안전에 문제를 야기할 수 있다.

최근 미국 유화학자 협회(American Oil Chemist's Society)에서 만든 식품의 에테르 추출물을 분석하는 방법(AOCS;method Am 5-04; AOCS, 2009)은 filter bag을 이용해 높은 온도와 압력으로 유기용매의 추출 효율과 순환 속도를 높여 추출시간을 단축시켰으며, 추출 시에 밀폐된 환경을 제공하는 XT15 (ANKOM, USA) 기기를 활용하여 적은 유기용매를 사용하면서 공기 중으로의 유기용매 유출을 방지하여 기존 방법의 위험성을 감소시켰다. 즉 AOCS법을 활용하면 10개의 시료를 1시간 이내에 추출할 수 있어 기존 AOAC법과 비교하였을 때 최대 3배 이상의 효율을 나타낼 수 있다고 알려져 있다.

이에 본 연구는 잎담배에서 에테르 추출물을 분석하는데 사용되어온 속슬렛 방법을 XT15를 이용한 AOCS법으로 대체하기 위하여, AOCS법의 세부 적용 조건을 설정하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 diethyl ether는 Merck (Germany)사 제품을 사용하였고, magnesium sulfate(anhydrous)는 Junsei Chemical Co.(Japan) 제품을, thimble filter는 ADVANTEC(Japan)사 제품을, 그리고 filter bag은 XT4(ANCOM, USA)사 제품을 사용하였다.

표준담배(Ky3R4F)는 Kentucky Tobacco Research & Development Center (University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로부터 구입하여 사용하였고, AOAC법으로 분석했을 때 에테르 추출물의 함량이 4 % ~ 9 %인 9종의 잎담배를 시료로 하였다.

속슬렛 추출장치(Soxhlet apparatus)는 AOAC (Association of Official Analytical Chemists)에서 추천하는 장치를 Fig. 1과 같이 설치하여 사용하였고, AOCS법에 따른 분석을 위해 Fig. 2의 XT15 (ANCOM, USA) 장치를 사용하였다.

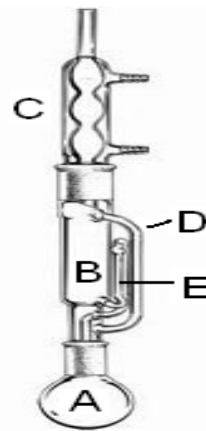


Fig. 1. Soxhlet apparatus

- A : Flask (250 mL)
- B : Extraction chamber
- C : Condenser
- D : Distillation path
- E : Siphon

시료 준비

모든 담배 시료는 40 °C 이하로 유지된 오븐에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 믹서기로 1 mm 이하의 크기로 분쇄한 후 사용하였다.

에테르 추출물 분석 조건

AOAC법으로 에테르 추출을 분석하기 위해 Fig. 3과 같은 순서로 원통 여지에 시료 5 g을 넣고 수분의 영향을 줄이기 위해 무수 magnesium sulfate를 시료 위에 일정량 가한 후 솜으로 막고서 105 °C로 유지된 오븐에서 1시간 동안 건조한 다음 데

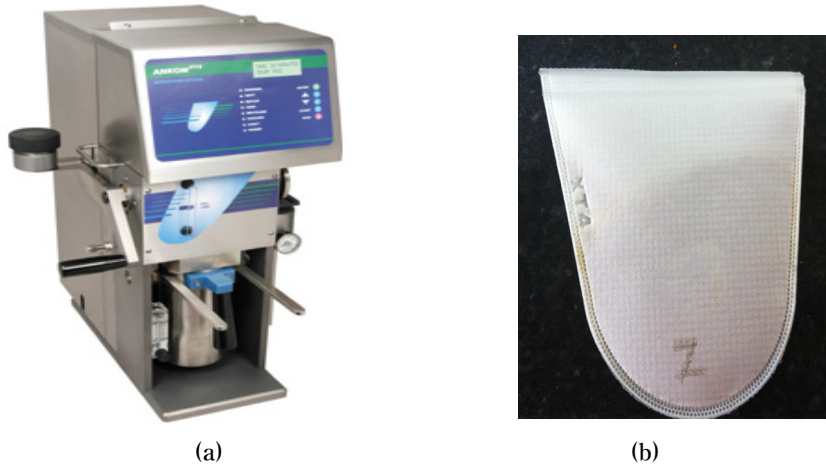


Fig. 2. Photographs of the instrument XT15(a) and filter bag(b) used in AOCS method for ether extraction.

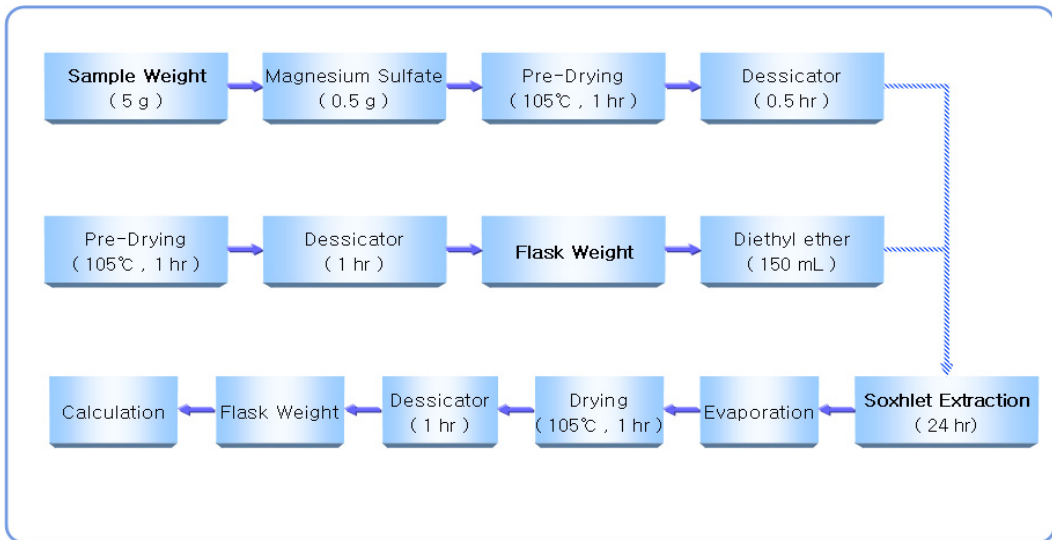


Fig. 3. The process of AOAC method for ether extraction(Soxxhlet apparatus).

시케이터에 보관 후 속슬렛 장치를 사용하여 추출 하였다.

XT15를 활용한 에테르 추출물 분석은 Fig. 4와 같은 순서로 filter bag에 시료 약 1 g을 넣은 후

수분의 영향을 확인하기 위해 105 °C로 유지된 오븐에서의 건조시간을 달리하여 실험하였으며, 최적의 추출 시간을 확인하기 위해 기기의 조건을 달리 하면서 실험하였다.

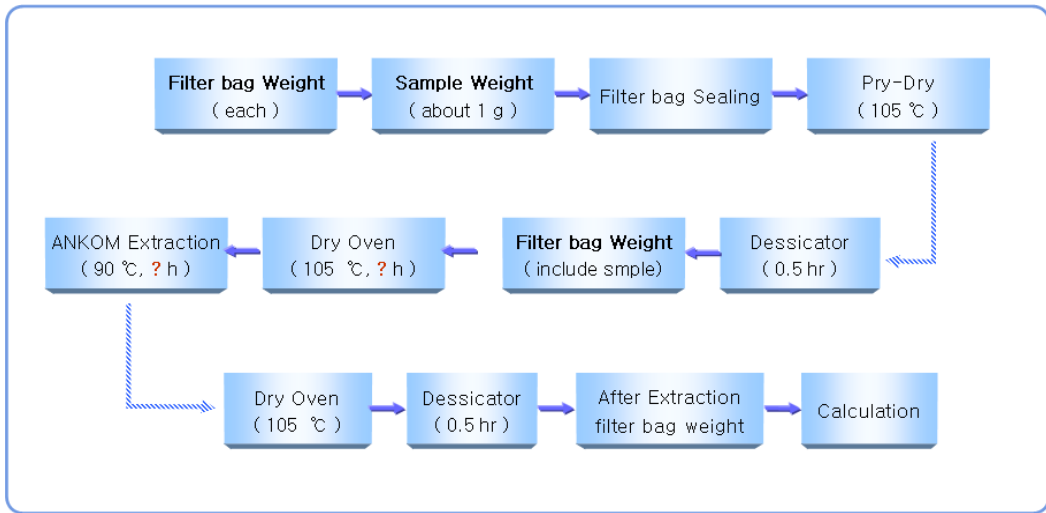


Fig. 4. The process of AOCS method for ether extraction(XT15, ANKOM).

결과 및 고찰

AOCS법을 위한 XT15 작동 조건 최적화

Silva 등(2010)은 연구 결과에서 기존의 속슬렛 추출방법과 비교하였을 때 AOCS 방법이 더 많은 에테르 추출물 함량을 나타낸다고 보고하였지만 이는 추출 효율에 대해 충분히 검토하지 않고 발표한 결과로 판단된다.

Plamquist 등(2003)은 diethyl ether의 특성상 시료에 수분이 포함되어 있을 때 수용성 성분인 urea, carbohydrates, glycerol, lactic acid 등이 용출되어 높은 에테르 추출물 함량을 나타낼 수 있다고 보고하고 있는 바, 이로부터 시료의 예비건조 단계가 매우 중요함을 알 수 있다. 특히 filter bag에 시료를 봉합하는 AOCS법에서는 실험과정 중 시료의 수분을 제거할 수 있는 단계가 없기 때문에 시료의 수분함량이 더욱 중요하다고 보여진다.

또한, AOCS법에서는 추출시간을 명시하지 않고 식물체에 대하여 15분에서 60분 사이로 범위를 명시하고 있는 바, 기존의 에테르 추출물 분석법과 유사한 결과를 나타낼 수 있는 추출장비의 적절한 작동조건 설정이 필요하다.

1) AOCS법에서 시료의 예비건조 시간 설정

위에서 설명한 바와 같이 AOCS법으로 에테르 추출물 함량을 분석하기 위해서 filter bag에 시료를 담은 후 예비건조 시간별로 분석한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 이로부터 AOCS법으로 기존 속슬렛 분석법에 의한 결과와 유사한 에테르 추출물 함량을 얻기 위해서는 3시간 30분의 예비건조 시간이 필요함을 알 수 있다.

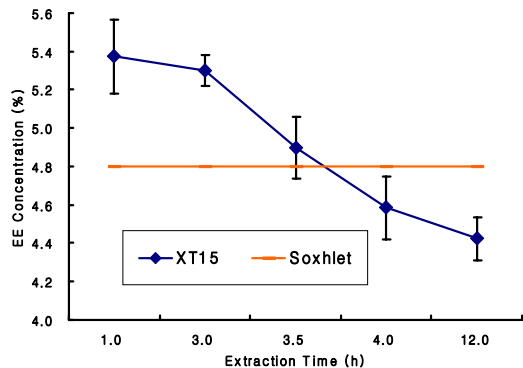


Fig. 5. The change of ether extract concentration according to pre-drying time in AOCS(XT15) method (Ky 3R4F).

2) AOCS법에서의 XT15 적정 추출시간 설정

AOCS법에서의 XT15 추출시간을 15분, 30분 및

60분으로 설정하여 시료 잎담배(각초)의 에테르 추출물 함량을 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 확인할 수 있듯이 XT15의 추출 시간을 30분으로 하였을 때 속슬렛 추출방법과 가장 유사한 결과를 보여주었다.

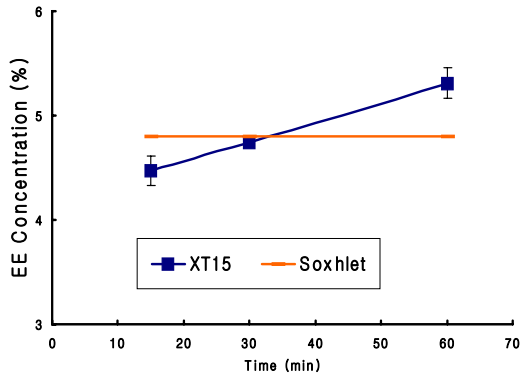


Fig. 6. The change of ether extract concentration according to extraction time in AOCS(XT15) method (Ky 3R4F).

AOAC법과 AOCS법의 반복성 및 재현성 분석 결과 각 분석법에 대한 R&R 통계분석 결과를 Table 1과 2에 나타내었다. AOAC법인 속슬렛 추출방법의 반복(part to part) variation은 0.0511 % 수준, AOCS법인 XT15 장비를 사용한 방법의 반복(part to part) variation은 0.0027 % 수준으로 두 방법 모두 매우 안정된 반복성과 재현성을 나타냈다.

AOAC법과 AOCS법 분석 결과 비교

속슬렛 추출장치를 사용한 AOAC법과 XT15 장비를 사용한 AOCS법을 적용하여 켈련제품 각초 및 잎담배 9종의 에테르 추출물 함량을 분석한 결과와 이들의 유의성 검정결과를 각각 Tabl 3, 4에 나타내었다.

두 방법간의 에테르 추출물의 분석결과에 대한 통계적 유의차는 나타나지 않아 서로의 결과가 매우 유사함을 확인할 수 있다(P>0.05). 이에 각초 및 잎담배에서 에테르 추출물을 측정하는데 두 방법 모두 활용할 수 있음을 확인하였다.

Table 1. The result of statistical R&R analysis in AOAC(Soxhlet) method

		Variance Components; Variable: Res			
		Mean=5.73329 R-bar=4.94393 R(pa			
		Operators: 10 Parts: 3 Trials: 1			
		Include condition: Method='직접법'			
Source	Estimate	Estimate	% of	% of	
(Sigma=R-bar/d2)	Sigma	Variance	R & R	Total	
Repeatability					
Reproducibility					
Part-to-Part	0.0359	0.0012		0.051	

Table 2. The result of statistical R&R analysis in AOCS(XT15) method

		Variance Components; Variable: Res			
		Mean=6.03865 R-bar=5.25222 R(pa			
		Operators: 10 Parts: 3 Trials: 1			
		Include condition: Method='ANKOM'			
Source	Estimate	Estimate	% of	% of	
(Sigma=R-bar/d2)	Sigma	Variance	R & R	Total	
Repeatability					
Reproducibility					
Part-to-Part	0.0088	0.0000		0.002	

Table 3. Ether extract concentrations of cut tobacco(Ky 3R4F) and leaf tobacco by two methods

Sample	Concentration of ether extract (%)			
	AOAC(Soxhlet)		AOCS(XT15)	
	Average	RSD	Average	RSD
Ky 3R4F	4.73	0.69	4.79	0.01
# 1	6.81	2.09	7.54	1.38
# 2	8.87	1.24	9.38	3.02
# 3	5.32	0.97	6.29	3.51
# 4	3.93	2.27	4.13	3.60
# 5	4.93	1.83	5.06	2.47
# 6	4.65	0.63	4.75	2.62
# 7	6.43	0.65	6.49	1.91
# 8	7.49	1.01	7.38	1.59
# 9	4.17	1.14	4.56	3.86

Table 4. Statistical analysis(t-Test) of two methods

t-Test: Two-Method Assuming Equal Variances

	AOAC (Soxhlet)	AOCS (XT15)
Mean	5.733290438	6.03865481
Variance	2.41275433	2.65730077
Observations	30	30
Pooled Variance	2.53502755	
Hypothesized Mean Diff	0	
df	58	
t Stat	-0.7428013	
P(T<=t) one-tail	0.230300012	
t Critical one-tail	1.671552763	
P(T<=t) two-tail	0.460600024	
t Critical two-tail	2.001717468	

결 론

본 연구에서는 기존의 에테르 추출물 함량 분석법

인 AOAC법과 AOCS에서 새롭게 추천하는 분석방법을 비교, 검토하여 AOCS법을 잎담배 분석에 적용할 수 있는지를 확인하기 위해 수행하였다.

기존의 속슬렛 추출장치를 사용한 방법은 속슬렛 추출장치를 설치하고 에테르가 공기에 노출된 상태에서 시료를 3일간(8시간/일), 총 24시간 추출해야 하지만, XT15(ANCOM, USA)를 사용한 AOCS법은 10개의 시료를 1시간 이내에 추출할 수 있고 적은 용매를 밀폐된 장비 내에서 사용하기 때문에 실험자 및 실험실의 안전을 확보할 수 있는 좋은 방법이라고 생각된다. 또한 잎담배 및 각초의 에테르 추출물 함량분석에 적합한 XT15의 작동조건을 설정함으로써 기존의 AOAC법과 유사한 결과를 도출할 수 있으므로 새로운 AOCS법은 잎담배 및 각초의 에테르 추출물 함량 분석법으로 활용 가능하다고 판단된다.

참 고 문 헌

- AOAC (2000) Official methods of analysis 17th Ed., Gaithersburg, MD, official Method 991:36, 2004.
- AOCS (2004) Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction, *Aocs Approved Procedure Am 5-04*
- Palmquist, D. L. and Jenkins, T. C. (2003) Challenges with fats and fatty acid methods, *J. Anim. Sci.*, 81: 3250-3254.
- Thiex, N. J., Anderson, S. and Gildemeister, B. (2003) Crude fat, diethyl ether extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/Submersion Method) : Collaborative Study. *J. AOAC Internation*, 86(5), : 888-898.
- Silva, P. T., Detmann, E., ValadaresFilho, S. C., Detmann, K. S. C., Barros, L. V., Martins, S. C. V., Morais, L. E. and Costa, V. A. C. (2011) Evaluation of total and non-fatty ether extract in feeds and cattle feces using two analytical methods, *Anim. Feed Sci. Technol.* 163(2): 111-117.

- Tso, T.C. (1990) Production, physiology and biochemistry of tobacco plant. *institute of international development & education in agricultural and life sciences, USA*. 610.
- 한국인삼연초연구소 (1991) 담배성분분석법, 146-148.
- 한국연초학회 (1997) 담배 연구의 최근동향, 14-15.