

밀감 주스 香氣 成分의 定量

김 호 · 조도현 · 박연희 · 이춘영* · 이양희**

아주 공과대학 화공과, *서울대학교 농과대학 농화학과

**한국과학 기술연구소 식품공학 연구실

(1980년 3월 2일 수리)

Quantitative Determination of Flavor Constituents of Korean *Milgam* (*Citrus unshiu*) Juice

H. Kim, D.H. Jo, Y.H. Park, C.Y. Lee* and Y.H. Lee**

Department of Chemical Engineering, Ajou Institute of Technology

*College of Agriculture, Seoul National University

**Korea Institute of Science and Technology

Abstract

The flavor constituents of Korean *Milgam* were extracted with a nitrogen gas stream under partial vacuum and identified by gas liquid chromatography. By employing the extraction coefficient, it was possible to determine the concentration of components in *Milgam* as well as in the extracts. Among 53 GLC peaks, 26 components were identified. Ethanol was the most abundant component (140ppm), followed by limonene (120ppm). These two were the most important flavor constituents.

머 리 말

오렌지의 향기 성분 대부분이 휘발성 성분으로서 이의 동정은 Gas liquid chromatography (GLC)의 발달로 큰 진전을 가져왔다. GLC를 사용하여 Bernhard¹⁾와 Clark²⁾이 lemon oil을 분석하였고, Stanley³⁾은 orange oil의 aldehyde類를 분석하였다. Wolford와 Attaway⁴⁻⁶⁾는 GLC에 의한 오렌지 주스의揮發性香氣成分을分離, 同定하는 방법을發表하였고 Wolford⁷⁻⁹⁾은 Programmed Temperature Gas Chromatography와 2種類의 column을 사용하여 오렌지 주스와 orange peel oil에서 46成分을 同定하였다. 그

후 orange oil에서 sesquiterpene類가 同定되고¹⁰⁾ Electron Capture Detector를 사용한 GLC分析으로 58成分이 同定되었다.^{11,12)} 또한 Moshonas¹³⁾는 tangerine을 처음으로 분석하여 34成分을GLC에 의해 분석하고 主成分으로 ethanol, methanol, acetone, acetaldehyde 등이 들어있음과 thymol, piperitone, 1,8-p-methadiene-9-01, 1,1-ethoxy methoxy ethane 등이 citrus系統 과일의 香氣成分임을 처음으로 밝혔다. Ifuku¹⁴⁾는 日本 温州蜜柑의 peel oil에서 高沸點 成分들을 분석하여 pinene 등 27成分을 同定하여 報告하였다. 最近에는 各成分의 同定에 I.R., U.V., M.S., N.M.R. 등을 사용함으로써 더 正確한 分析이 可能하게 되었다.¹⁵⁾ 향기 성분의 精量적인 方法으로는 일반적인

화학 분석 방법^{17,18)} 이외에 GLC상의 각 성분의 peak면적 비율로 나타내거나 internal standard를 사용하는 방법^{19,20)} 등이 보고되어 있다.

우리나라 밀감에 대해서는 일반 성분 분석에 관한 보고^{21,22)}가 있을 뿐 향기 성분에 관한 연구는 거의 없는 형편이다. 本實驗은 蜜柑 juice 香氣成分變化에 關한 基本的인 實驗으로서 濟州道에서 生産된 蜜柑의 加工 juice中 含有되어 있는 揮發性 香氣成分을 nitrogen gas와 ice trap, dry ice alcohol mixture trap, liquid nitrogen trap 등을 使用한 抽出裝置를 통해 抽出하고 GLC로 分析하여 各 成分의 同定과 함께 Extraction Coeffi-

cient의 概念을 導入하여 揮發性 香氣成分을 定量 하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

濟州道産 温州蜜柑(*Citrus unshiu*)을 脫皮한 후 壓搾하여 Thin Layer Evaporator로서 65Brix로 濃縮하여 貯藏하고 이것을 抽出할 때 13Brix로 희석하여 使用하였다.

향기 성분의 추출

揮發性 香氣成分의 抽出에는 Fig.1과 같은 裝置를

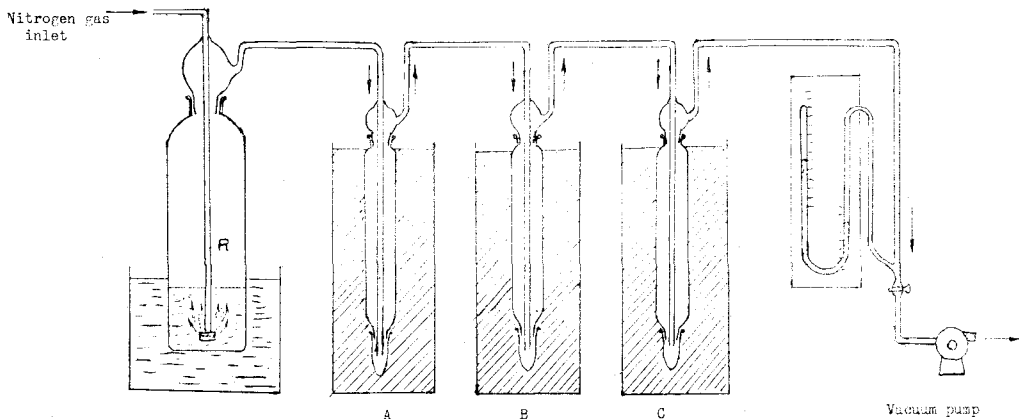


Fig. 1. Extraction apparatus

使用하였다. 36°C의 恒溫을 維持하는 water bath 안에 있는 容器에 試料 200ml를 넣고 抽出 gas로 서 nitrogen gas를 試料에 分射시켰다. Gas가 試料에 끌고루 分射되게 하는 perforator는 11G3 glass filter의 disc를 使用하였다. 壓力은 715mm Hg~725mmHg로 하였으며 抽出時間은 45分間이었다. Trap A,B,C는 각기 cooling material로 A trap은 ice, B trap은 dry ice-alcohol mixture 그리고 C trap은 liquid nitrogen을 使用하였으며 이때 各 trap의 溫度는 A trap이 0°C, B trap은 -78°C 그리고 C trap은 -140°C였다.

GLC分析

Gas Liquid chromatography는 Girdel 3,000型으로서 injection量은 2.1 μ l였으며 column은 10% polyethyleneglycol (PEG) 1,545를 80~100mesh의 chromosorb W에 被覆시킨 1/10"×25'의 stainless steel column을 使用하였다. Column의 溫度는 Programmed Temperature Method로서 65°C에서 分當 2°C씩으로 185°C까

지 上昇시켰다.

Carrier gas는 nitrogen gas를 使用했으며 flow rate는 11.2ml/min로 하였다. Detector는 Flame Ionization Detector로 fuel gas로는 水素를 1.5 atm., 空氣를 1.0atm.로 섞어 使用하였다. Detector의 溫度는 270°C였고 injection part의 溫度는 250°C로 하였으며 range는 10(2) 或은 10(16)을 사용했고 chart speed는 0.5cm/min이었다.

香氣成分의 定量

各 成分의 同定은 表準物質과의 retention time을 比較하여 同定하였고 定량은 各 成分의 extraction coefficient를 求하고 이를 통해 試料 內的 含量을 算出하였다(Fig. 2).

Internal standard의 reference curve 作成: Internal standard인 dichloroethane을 一連의 濃度로 희석한 溶液을 일정량씩 GLC에 injection하여 나타난 peak들의 面積을 計算하고 濃度에 따른 面積의 reference curve를 作成한다. Dichloroethane의 reference curve는 Fig. 3과 같다.

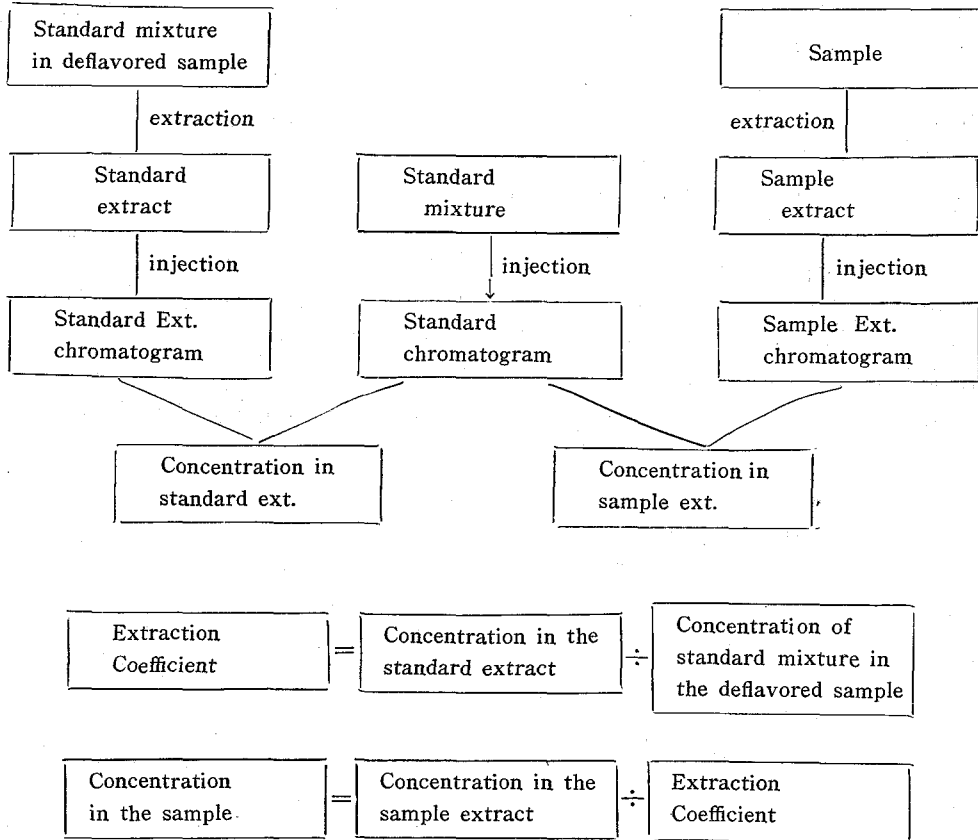


Fig. 2. Quantitative determination method

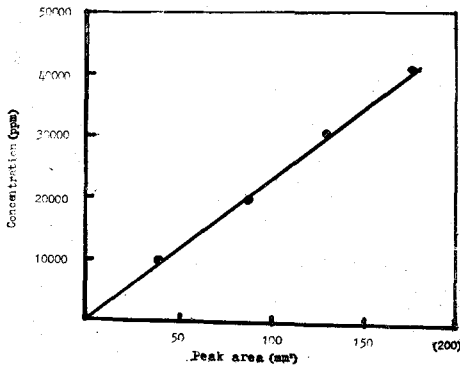


Fig. 3. Standard curve of dichloroethane (internal standard)

Extraction Coefficient의 算出: Dichloroethane을 포함하는 各 香氣成分들의 標準物質들을 섞은 standard mixture 一定量을 GLC에 injection하여 standard chromatogram을 얻고 여기서 各 peak面積을 計算한후 各 成分의 relative peak area factor (f_1)를 구한다.

$$f_1 = \frac{\text{Area of dichloroethane per unit weight}}{\text{Area of constituent per unit weight}}$$

Standard Mixture를 deffavored sample 試料에서 分析하고자 하는 成分들을 除去시킨 試料이며 試料를 約 80°C의 water bath內에서 30mmHg의 減壓으로서 約 4시간동안 nitrogen gas를 통과시켜서 만든 후에 一定 濃度[m]로 희석하여 試料와 同一한 條件으로 抽出한다. 여기서 얻은 Standard extract를 injection하여 standard extract chromatogram을 얻고 여기 나타난 dichloroethane의 peak面積을 計算하여 reference curve로부터 dichloroethane의 濃度[D_1]를 구한다.

各 成分의 dichloroethane에 對한 面積比率(r_1)을 計算한 다음, 이 面積比率과 먼저 구한 relative peak area factor(f_1)로부터 standard extract內의 各 成分 濃度[M_1]를 구한다.

$$r_1 = \frac{\text{Area of constituent}}{\text{Area of dichloroethane}}$$

$$[M_1] = [D_1] \times f_1 \times r_1$$

各 成分의 extraction coefficient(a)는 다음과

같이 구한다.

$$a = [M_1]/[m]$$

試料内の 濃度 算出 : Dichloroethane을 넣은 試料를 抽出하여 얻은 sample extract의 一定量을 injection하여 sample chromatogram을 얻고 여기서 dichloroethane의 面積을 計算한 다음 reference curve로부터 濃度 $[D_2]$ 를 구한다. 各 成分의 dichloroethane에 對한 面積比率(r_2)과 relative peak area factor (f_1)로부터 sample extract內的 各 成分濃度 $[S_1]$ 를 구한다.

$$[S_1] = [D_2] \times f_1 \times r_2$$

最終的으로 구하고자 하는 試料内の 各 成分濃度 $[S_2]$ 는 다음과 같이 계산한다.

$$[S_2] = [S_1]/a$$

결과 및 고찰

TRAP에 따른 EXTRACT成分의 比較

抽出時 使用한 3가지 trap에서 포집된 extract

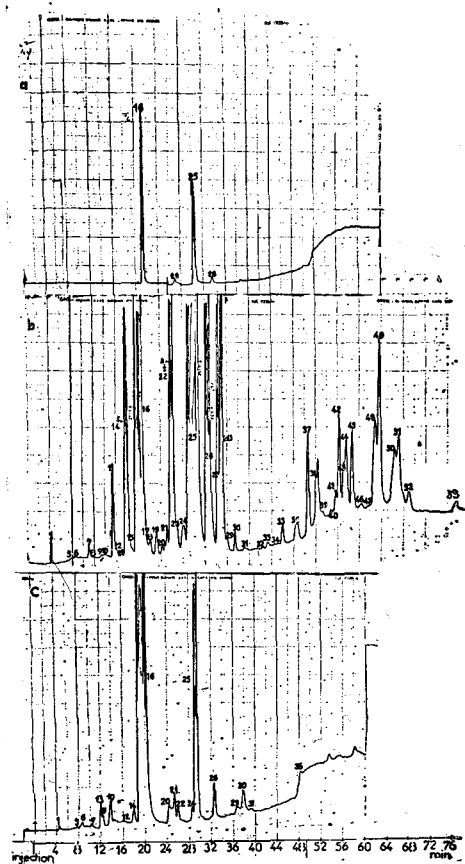


Fig. 4. Chromatogram of sample extract.
(a) Trap A (b) Trap B (c) Trap C

를 GLC에 injection하여 Fig. 4와 같은 chromatogram을 얻었다.

Ice trap에서 포집된 extract는 大部分이 물이었고 peak 16, 22, 25, 26의 4가지 成分만이 나타났다. Dry ice-alcohol mixture trap에서는 모두 53개의 peak가 나타나 가장 많은 成分들이 포집되었다. liquid nitrogen trap에서는 retention time이 빠른 20여개의 peak만이 나타났다.

Ice trap과 liquid nitrogen trap에서 포집된 成分들은 모두가 dry ice-alcohol mixture trap에서 포집된 成分들과 同一한 것 들이었고 또한 量的인 면에서도 ice trap의 4 peak는 dry ice-alcohol mixture trap에 比較하였을 때 매우 적은 量이었다. 또한 liquid nitrogen trap에서의 6, 8, 10 등 3peak들을 除外하고는 dry ice-alcohol mixture trap에 훨씬 많은 量이 포집되어 있으므로 이 實驗에서는 dry ice-alcohol mixture trap에서 포집된 extract만을 分析하였다.

Table 1. The retention time of identified peaks

Peak No	Constituents	Retention time (min)
1	<i>n</i> -Hexane	4.6
2	Isopropyl ether	5.2
3	Acetaldehyde	5.8
5	Propionaldehyde	7.6
6	Acetone	8.5
7	Ethyl acetate	10.7
8	Methanol, Formaldehyde	11.5
	Methylethyl ketone	
9	Ethanol	13.0
10	<i>n</i> -Butyl ether	14.1
14	Thujen	17.5
15	2-Propanol	18.3
16	Dichloroethane	19.6
17	Camphene	20.8
19	β -Pinene	22.8
21	<i>n</i> -Butanol	24.6
22	Myrcene	25.4
23	Terpinyl acetate	26.2
25	Limonene	28.6
26	7-Terpinene	31.2
27	α -Phellandrene	33.2
28	Terpinolene	33.7
34	Cyclohexanol	42.4
36	Furfural	46.8
42	Longifolen	54.4
49	α -Terpineol	61.6
52	Borneol	66.2

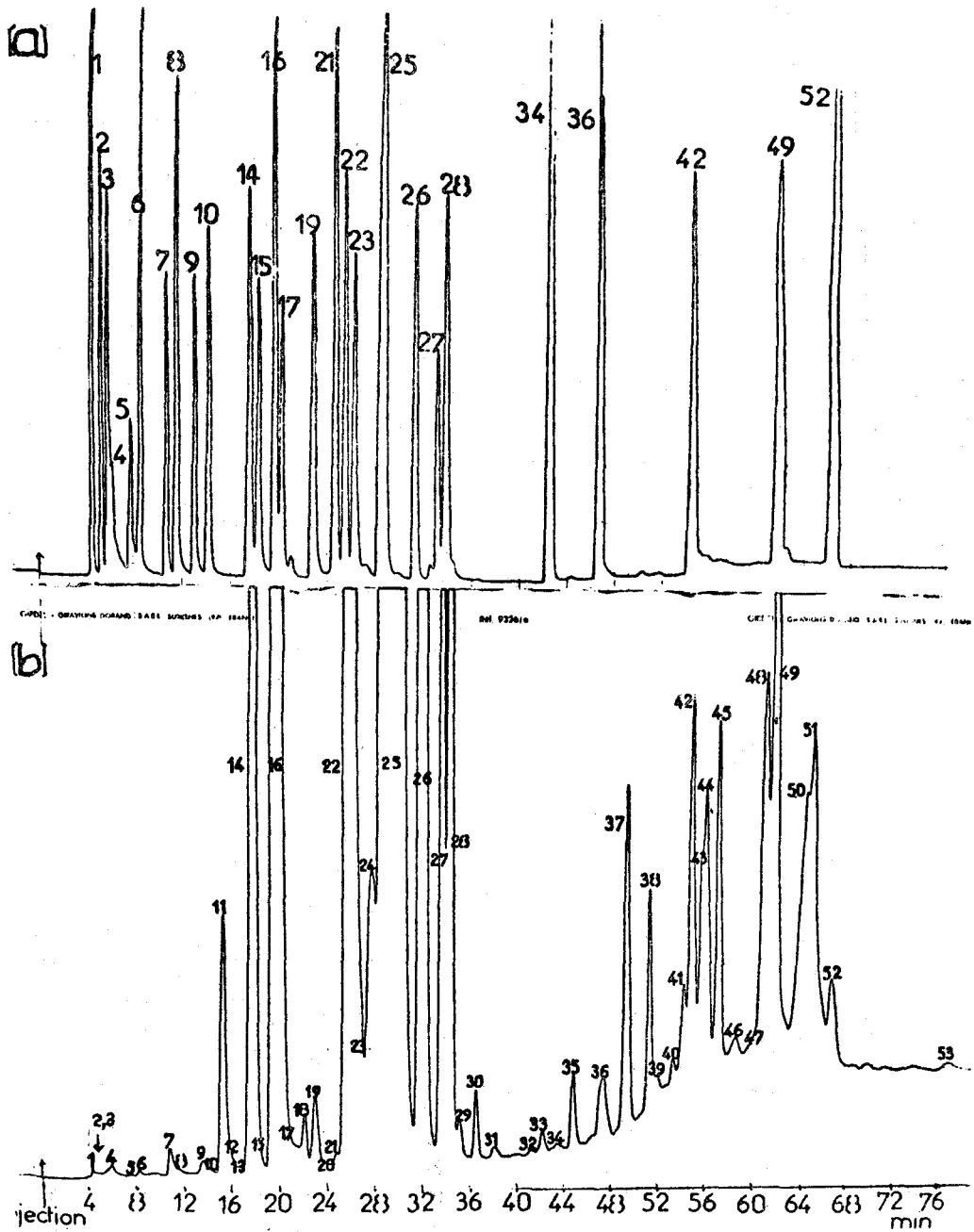


Fig. 5. : (a) Chromatogram of standard mixture
(b) Chromatogram of sample extract

향기 성분의 동정

揮發性 香氣成分의 同定結果는 Fig. 5와 같고 각 성분들의 retention time은 Table 1과 같다. Fig. 5에 나타난 총 53 peak중 26成分을 同定하였으며 높은 peak로 나타난 성분들은 大部分이

terpene類인 것으로 밝혀졌으며 alcohol類, aldehyde類, ether類는 대개 retention time이 짧고 작은 peak로서 나타났다. 本實驗에서 同定된 揮發性 香氣成分을 中心으로 文獻上에 나타난 3가지의 citrus系統 果實의 揮發性 香氣成分을 比較

Table 2. Comparison of the flavor constituents of citrus fruits

Flavor Constituents	Milgam	Japanese Migang ¹⁾	Orange ²⁾	Tangerine ³⁾
n-Hexane	+	-	+	-
Iso-propyl ether	+	+	+	-
Acetaldehyde	+	+	+	+
Propionaldehyde	+	+	-	-
Acetone	+	+	+	+
Ethyl acetate	+	+	+	+
Methanol	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+
n-Butyl ether	+	+	-	-
Thujen	+	-	+	-
2-Propanol	+	+	+	+
Camphene	+	-	+	-
β-Pinene	+	+	+	+
n-Butanol	+	+	+	-
Myrcene	+	+	+	+
Terpinyl acetate	+	+	+	+
Limonene	+	+	+	+
γ-Terpinene	+	+	+	-
α-Phellandrene	+	+	-	-
Terpinolene	+	+	+	+
Cyclohexanol	+	+	+	-
Furfural	+	+	+	-
Longifolen	+	-	-	-
α-Terpineol	+	+	+	+
Borneol	+	-	-	-

1) 2 varieties^{16,23,31)}

2) 4 varieties^{6,7,10,17,32)}

3) 1 variety¹³⁾

4) identified by Kirchner *et al.*²⁵⁾

하면 Table 2와 같다.

濟州道産 蜜柑과 함께 比較된 3가지 과일의 實際로 同定된 揮發性 香氣成分은 그 分析方法이 모두 同一한 것은 아니었으나 orange의 경우 100개 이상의 成分이 同定되었고, 4~9,15) tangerine은 34개 이상의 成分들이 同定되었으며¹³⁾ 日本 溫州 蜜柑은 40개 이상의 成分들이 同定되었다.^{14,15,23,24)}

Table 2에 실린 成分들중 thujen은 本 實驗에서 同定이 되었지만 지금까지 Kirchner 등²⁵⁾에 依해서만 初期에 化學的 分析方法으로 香氣成分임이 報告되었을 뿐이고, longifolen과 borneol等은 citrus의 香氣 成分으로 전혀 나타나지 않았던 成分인데 이들 thujen, longifolen, borneol 3成分에 對하여는 I.R., M.S.等으로 確實한 同定이 앞으로 必要하리라 생각된다.

Table 2에서 보듯이 日本 溫州蜜柑의 香氣成分

이 本 實驗結果와 가장 類似한 것으로 나타났는데 이것은 本 實驗에서 使用한 濟州道産 蜜柑이 日本 溫州蜜柑과 그 品種이나 材培條件 등이 거의 같기 때문이라 생각된다. Tangerine은 orange보다 濟州道 蜜柑과 形態와 맛이 더욱 가까운 것이나 그 香氣 成分 比較結果는 orange보다 더 큰 차이가 있었다. 이것은 orange에 對해서는 많은 研究가 이루어져 왔으나 tangerine의 香氣成分에 關하여는 研究가 거의 이루어지지 않았고, 또 한편 濟州道 蜜柑에 關해서도 本 實驗이 처음이므로 양쪽 모두 그 香氣成分 分析이 一部에 對하여만 이루어졌기 때문이라고 推測되나 이에 關하여는 더 많은 研究가 必要하리라 생각된다.

향기 성분의 정량

각 성분에 대한 extraction coefficient를 도입하여 구한 시료의 각 성분 함량은 Table 3과 같다.

Table 3. Extracriion coefficients and concentrations of flavor constituents in *Milgam*

Peak No.	Flavor constituents	Extraction coefficient	Concentration in sample (ppm)
1	<i>n</i> -Hexane	1	3.7
2	Isopropyl ether	4	3.0
3	Acetaldehyde	—	—
5	Propionaldehyde	3	13
6	Acetone	2	11
7	Ethyl acetate	6	16
8	Methanol, Formaldehyde	7	3.4
	Methylethylketone		
9	Ethanol	1	140
10	<i>n</i> -Butylether	170	0.7
14	Thujen	230	1.4
15	2-Propanol	200	1.0
16	Dichloroethane*	140	250
17	Camphene	420	0.2
19	β -Pinene	400	0.3
21	<i>n</i> -Butanol	70	1.8
22	Myrcene	350	4.7
23	Terpinyl acetate	500	0.1
25	Limonene, Isoamylalcohol	440	120
26	γ -Terpinene	490	9.2
27	α -Phellandrene	600	2.4
28	Terpinolene	500	1.7
34	Cyclohexano ¹	60	0.4
36	Furfural	90	1.4
42	Longifolen	360	0.6
49	α -Terpineol	140	5.0
52	Borneol	140	1.2

* Internal Standard

구성 성분중 ethanol이 140ppm으로 가장 많이 들어 있고, 다음이 limonene으로서 120ppm이며, 이 두 성분이 양적으로 중요한 성분이었으며 acetaldehyde는 그 비점이 22.2°C로서 정량이 불가능하였다. Table 3에서 보는바와 같이 Ext. coeff는 각 성분에 따라 그 차이가 대단히 크므로 Fig. 5의 sample extract chromatogram에 나타난 함량과 sample중의 실제 함유되어 있는 각 성분의 양과는 현격한 차이를 보인다.

예를들면 Fig. 5에 나타난 peak 9의 ethanol과 peak 11 thujen을 비교할 때 peak area는 Thujen이 ethanol의 20배 정도이나 extraction coefficient가 ethanol은 1인 반면 thujen은 230이기 때문에 시료내의 실제 ethanol 함량은 140ppm인 반면 Thujen은 1.4ppm에 지나지 않는다.

일반적으로 사용되는 향기성분 정량방법은 물리적 혹은 화학적방법으로 추출하여 얻은 extract에서 관능기의 반응을 이용하는 방법^{17,25)} 외에 extract를 GLC로 분석하여 chromatogram에 나타나는 peak 총 면적에 대한 각 성분 peak의 면적비율을 계산하여 제반 조건에 따른 향기성분의 함량변화를 단순히 면적비율의 변화로 나타내거나,^{13,16,23,26~28)} Internal Standard Method로서 정량하는 방법^{19,20)} 등이 사용되었다. 그러나 이러한 방법들은 시료내의 함량이 아니라 extract내의 함량이며 추출과정에서 손실되는 성분의 양을 무시한 것으로 추출과정에서의 각 성분의 extraction coefficient를 결정하지 않았기 때문에 시료내의 실제 양과는 큰 차이가 있게 됨을 알 수 있다.

이 extraction coefficient는 Bertand²⁹⁾ 및 Park³⁰⁾ 등이 포도주, 포도즙 등에서 향기성분을 추출할 때 사용한 바가 있다. 본 실험 방법에 의한 결과와 이미 알려져 있는 Citrus류의 향기성분 함량을 비교해 볼 때 실험방법과 함량산출 방법의 차이에도 불구하고, Citrus류에서 ethanol과 limonene이 휘발성 성분으로 월등히 많은 양이 들어 있음은 일치되는 것으로 밝혀졌다. 또한 terpene류에서는 limonene 다음으로 γ -terpinene, α -terpineol, myrcene등이 양적으로 중요한 성분인 점도 본 실험 결과와 일치함을 보였다. 이러한 결과로 본 실험 방법으로 밀감 juice extract의 향기성분의 함량 결정은 물론 시료내의 향기성분의 절대적인 함량을 동시에 결정할 수 있으며, 또한 동일 계통의 시료에 대해서는 한번 구한 extraction coefficient를 계속 사용할 수 있다.

要 約

제주산 밀감 juice의 향기성분을 질소 gas로 추출하여 gas liquid chromatography로 동정하였고 각 성분의 extraction coefficient를 사용하여 함량을 구하였다. 50여개의 peak중 26성분을 동정하였다. 향기성분중 ethanol이 140ppm이며 limonene이 120ppm으로 이 두 성분이 가장 중요한 성분으로 밝혀졌다.

참 고 문 헌

- Berhnard, R.A.: J. Chromatog., 3 : 471 (1960)
- Clark, J.R. and Berhnard, R.A.: Food Res., 25 : 389 (1960)
- Stanley, W.L., Ikeda, R.M., Vannier, B.H. and Rolle, L.A.: J. Food Sci., 26 : 43 (1961)
- Attaway, J.A., Woford, R.W. and Edward, G.J.: J. Agr. Food Chem., 10 : 66 (1962)
- Wolford, K.W., Alderding, G.E. and Attaway, J.A.: J. Agr. Food Chem., 10 : 297 (1962)
- Wolford, R.W. and Attaway, J.A.: In 'Gas Chromatography,' N. Prenner, J.E. Callen and N.D. Weiss (ed.), p.457. Academic Press, N. Y. (1962)
- Wolford, R.W., Attaway, J.A., Alberding, G. E. and Atkjne, C.D.: J. Food Sci., 28 : 320 (1963)
- Wolford, R.W., Attaway, J.A. and Barabas, L.J.: Proc. Florida State Hort. Soc., 78 : 268 (1965)
- Attaway, J.A. and wolford, R.W.: In 'Gas Chromatography, Proceedings of 5th Symposium,' A. Goldup (ed.), p.170. The Elsevier Publ. Co., Amsterdam (1964)
- Hunter, G.L.K. and Brogden, W.B.Jr.: J. Food Sci., 30 : 1 (1965)
- Wolford, R.W. and Attaway, J.A.: J. Agr. Food Chem., 15 : 369 (1967)
- Wolford, R.W., Attaway, J.A., Dougherty, M.H. and Edward, G.J.: J. Agr. Food Chem., 15 : 688 (1967)
- Moshonas, M.G. and Shaw, P.E.: J. Agr. Food Chem., 20 : 70 (1972)
- Ifuku, Y., Maeda, H. and Sawamura, H.: J. Food Sci. Technol. (Japan), 23 : 20 (1976)
- Manabe, T.: J. Food Sci. Technol. (Japan), 22 : 337 (1975)
- Radford, T., Kawashima, K., Friedel, P. K., Pope, L.E. and Gianturco, M.A.: J. Agr. Food Chem., 22 : 1066 (1974)
- Braddock, R.J. and Kesterson, J.W.: J. Food Sci., 41 : 1007 (1976)
- Lifshitz, A., Stanley, W.L. and Stepak, Y.: J. Food Sci., 35 : 547 (1970)
- Shaw, P.E. and Coleman, R.L.: J. Agr. Food Chem., 19 : 1276 (1971)
- Lund, E.D., Berry, R.E., Wagner, C.J. and Velhuis, M.K.: J. Agr. Food Chem., 20 : 685 (1972)
- 양차법, 박훈, 김계옥 : 한국농화학회지, 8 : 29 (1967)
- 박훈, 김영섭, 김계옥 : 한국농화학회지, 9 : 41 (1968)
- Imagawa, K., Yamanishi, T. and Koshika M.: Nippon Kagaku Zasshi, 48 : 560 (1974)
- Namura, D. and Hayakawa, I.: J. Food

- Sci. Technol. (Japan), 23 : 176 (1976)
25. Kirchner, J.G. and Miller, J.M.: J. Agr. Food Chem., 5 : 283 (1957)
26. Attaway, J.A., Wolford, R.W., Dougherty, M.H. and Edwards, G.J.: J. Agr. Food Chem., 15 : 688 (1967)
29. Rymal, K.S., Wolford, R.W., Ahmed, E. M. and Dennison, R.A.: Food Technol., 22 : 1592 (1968)
28. Coleman, R.L. and Lund, E.D.: J. Food Sci., 34 : 610 (1969)
29. Bertrand, A.: These 3^{me} Cycle, Univ. de Bordeaux, France (1968)
30. Park, Y.H.: These 3^{me} Cycle, Univ. de Bordeaux, France (1974)
31. Kodama, M., Manabe, T.M., Bessho, Y. and Kubo, S.: J. Food Sci. Technol. (Japan), 21 : 151 (1974)
32. Colenan, R.L., Lund, E.D. and Moshonas, M.G.: J. Food Sci., 34 : 610 (1969)