

비타민 C의 분석법

김정봉[†] · 이종렬 · 공연희 · 김종범 · 조강진

농업생명공학연구원

I. 서 언

Vitamin C의 함량은 식품과 음료의 저장조건과 처리의 평가에 중요한 지표가 되고 있다. 일반적으로 두가지 즉, 환원형(ascorbic acid, AA)과 산화형(dehydroascorbic acid, DHAA)를 합하여 vitamin C의 총함량으로 계산하지만 천연물질로는 존재하지 않는 isoascorbic acid(IAA)와 erythorbic acid 역시 비슷한 활성을 가지고 있고 활성은 크지 않다(Bui-Nguyen, 1980) Finely와 Duang(1981)에 의해서 소개되었던 것처럼 일찌기 HPLC에 의해서 이들 vitamin C를 정량하려는 시도가 많았으나 DHAA에 대한 UV의 감도가 낮아서 시행착오를 겪어 오다가 Keating과 Haddad(1982)등이 reverse phase C₁₈ column을 사용하여 AA와 DHAA를 분리하고 1,2-phenylenediamine dihydrochloride(OPDA)과 fluorophore 3-(1,2-dihydroxyethyl) furo [3,4-b]quinoxaline-1-one(DFQ)을 이용하여 유도체를 만들어서 파장 254 nm와 290 nm에서 각각 검출을 용이하게 한 방법이다(Zapata, S. and Dufour J. P.).

II. 분석방법

1. 장치 및 기구

- 1) blender
- 2) balance
- 3) centrifuge(5000rpm)
- 4) Sep-Pak C18 cartridge
- 5) filter paper(No. 4)
- 6) 삼각플라스크(100 ml)
- 7) 깔대기
- 8) pH meter
- 9) analytical HPLC
 - column: Supelcosil LC-18, 25cm×4.6 mm

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-299-1737 (E-mail) jungbkim@rda.go.kr

- detector: photo diode array (PDA)
- BioRad Biosil Micro-Guard(gard column(C18))
- degaser

2. 시약

- 1) 내부표준물질: isoascorbic acid
- 2) 표준물질: L-ascorbic acid, isoascorbic acid, dehydroascorbate
- 3) 용매: methyl alcohol, H₂O
- 4) citric acid, EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid calcium disodium salt dihydrate)
- 5) cetrimide
- 6) KH₂PO₄(potassium dihydrogen phosphate)
- 7) OPDA (1,2-phenylenediamine dihydrochloride)

3. 조작

- 1) 생시료를 분쇄기로 마쇄하여 시료 1 g을 100 ml 삼각플라스크에 넣고, 추출용 buffer 50 ml(0.1M citric acid, 0.05% EDTA in 5% aqueous MeOH)과 내부표준물질 1 ml(isoascorbic acid, 10-50 mg/100g)을 함께 넣어서 흔들어서 추출한다.
- 2) 추출액은 filter paper (No. 4)를 이용하여 filtration해준 후, 생시료의 불순물을 제거해준 후, 여과액 약 30 ml을 원심분리용 tube에 옮겨 담고 원심분리(rpm-5000; 10 min, 4°C)시킨다.
- 3) 상층액을 50 ml 삼각플라스크에 옮겨 담고 pH meter기를 이용하여 pH 를 2.35-2.4정도로 낮추어 준 후, Sep-Pak C₁₈ cartridge사용하여 filtration한다.
(Sep-Pak C₁₈ cartridge 전처리: methyl alcohol을 10 ml 정도 흘려준 후, H₂O를 10 ml 정도 흘려주고, filter되는 첫 시료의 5 ml정도는 버리고 그 다음 시료를 본 시료로 사용)
- 4) 시료 중 2-3 ml 만 filtration하여 분석 시료로 사용한다(filter는 0.45 μm, nylon syringe filter를 사용)
- 5) L-ascorbic acid가 산화된 형태인 dehydroascorbic aid를 HPLC로 분석하기 위하여 750 μl의 분석 sample에 250 μl의 OPDA(1,2-phenylened iamine dihydrochloride)를 넣고 상온, 암상태(호일로 씌움)에서 37분간 반응시킨다. 즉, HPLC에 injection하기 37분 전에, 750μl의 시료에 250μl의 OPDA를 넣고 HPLC로 분석한다.
- 6) HPLC의 이동상은 methyl alcohol-water(5:95, v/v) (with 5mM cetrimide and 50mM potassium dihydrogen phosphate, pH 4.59)를 이용하였다.
- 7) 용매에 의한 gradient 조건으로서 20분까지 용매 B를 70%까지 흘려주다가 25분까지 85%로 올려서 흘려준 후, 27분까지 용매 B를 40%로 흘려주어 30분까지 유지시키며 안정화시켰다.

비타민 C의 분석법

8) Mobile phase의 유량은 1 μl/min, 시료 주입량은 20 μl로 하였으며 detector의 파장은 290 nm로 하고 시료는 항상 저온(4°C)에서 빛을 피하여 보관하였다.

4. 결과

L-ascorbic acid (B)형태와 산화형 dehydroascorbic acid (A)로 존재하는 비타민 C를 동시에 분석하기 위하여 시료와 OPDA (1,2-phenylenediamine, 3.33 mg/ml)를 넣고 반응시킨 다음 DFQ(3-(1,2-dihydroxyethyl) furo[3,4-b]quinoxaline-1-one)를 만들어서 HPLC로 정량한 방법이다.

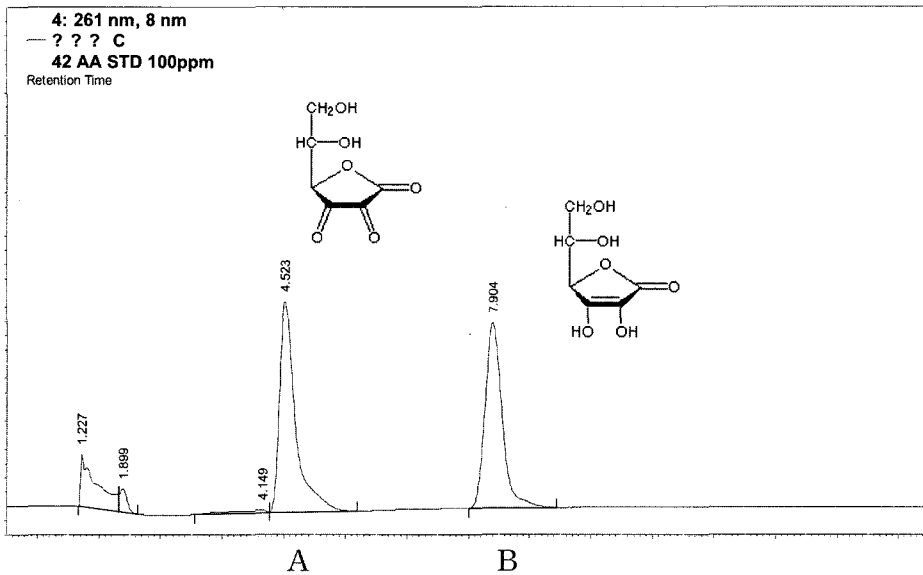


그림 1. 산화형(A)과 환원형(B) vitamin C의 크로마토그램 (column: SUPELCOSIL LC-18, 25cm X 4.6 mm, 5 μm, with BioRad Biosil Micro-Guard column, 용매: MeOH-Water (5 : 95, v/v) with 5 mM CTAB and 5mM Potassium dihydrophosphate, pH 4.59, 1.6 ml/min)

5. 계산

(시료 ascorbate area+시료 dehydroascorbic acid의 area)*내부표준물질량(mg)*100/내부표준물질 area/사용한 시료의 양(g) = mg/100 g

참고문헌

1. Bui-Nguyen, M. H. 1980. Application of high-performance liquid chromatography to the separation of ascorbic acid from isoascorbic acid. J. chromatogr. 196 : 163.
2. Finley, J. M. and E. Duang. 1981. Resolution of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids by paired-ion reversed-phase chromatography. J. Chromatogr. 207 : 44.
3. Keating, R. W. and P. R. Haddad. 1982. Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by reversed-phase ion pair high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. J. Chromatogr. 245 : 249.
4. Zapata, S. and J. P. Dufour. 1992. Ascorbic, Dehydroascorbic and isoascorbic acid Simultaneous Determinations by Reverse Phase Ion Interaction HPLC. J. Food Science. 57 : 506-511.

Analysis of Vitamin C by HPLC

***Jung-Bong[†], Kim, Jong-Yeoul Lee, Yeon-Hee Kong, Jong-Bum Kim,
and Kang-Jin Cho***

*National Institute of agricultural biotechnology, R.D.A., Suwon 441-707, Korea
+82-31-299-1737, jungbkim@rda.go.kr*