



목 차

제 4. 건강기능식품 시험법

1. 일반원칙	3
2. 일반시험법	9
2-1 봉해시험법	9
2-2 내용량 시험법	16
2-3 입도시험법	18
2-4 산도시험법	19
2-4-1 산도	19
2-4-2 유기산 산도	21
2-5 유해물질 시험법	23
2-5-1 시안화합물	23
2-5-2 카페인	25
2-5-3 디에틸렌글리콜	28
2-5-4 시트린	32
2-5-5 초산에틸	37
2-5-6 디시안디아미드(Dicyandiamide)	41
2-5-7 디하이드로트리아진(Dihydrotriazine)	44
2-5-8 트레온산	47
2-6 화학적 시험법	50
2-6-1 아니시딘가	50
2-7 성상시험법	52
2-8 용출시험법	53

3. 개별 성분별 시험법	62
3-1 비타민 A	64
3-2 베타카로틴	71
3-3 비타민 D	74
3-4 비타민 E	79
3-5 비타민 K	91
3-6 비타민 B ₁	99
3-7 비타민 B ₂	108
3-8 나이아신	115
3-9 판토텐산	127
3-10 비타민 B ₆	137
3-11 엽산	146
3-12 비타민 B ₁₂	160
3-13 비오틴	172
3-14 비타민 C	183
3-15 구리, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 셀렌, 크롬	195
3-16 칼슘	201
3-17 요오드	208
3-18 철	215
3-19 아연	221
3-20 칼륨	225
3-21 조단백질	229
3-22 아미노산	235
3-23 글루코사민	240
3-24 N-아세틸글루코사민	246
3-25 베타글루칸	249
3-26 식이섬유	258

3-27 총 다당체	275
3-28 콘드로이친황산	278
3-29 키토산(총 글루코사민으로서)	284
3-30 키토올리고당	290
3-31 프락토올리고당	291
3-32 지방산	297
3-33 인지질(아세톤불용물로서)	309
3-34 인지질 중 포스파티딜콜린의 함량	311
3-35 콜레스테롤	320
3-36 구연산	326
3-37 스쿠알렌	329
3-38 식물스테롤	332
3-39 유리식물스테롤	344
3-40 알콕시글리세롤	348
3-41 바틸알콜	352
3-42 옥타코사놀	355
3-43 총(-)-Hydroxycitric acid	357
3-44 루테인	360
3-45 아스타잔틴	364
3-46 카테킨	373
3-47 안트라퀴논계화합물(무수바바로인으로서)	377
3-48 총 플라보노이드	380
3-49 파라(p)-쿠마르산(Coumaric acid), 계피산(Cinnamic acid)	383
3-50 다이드제인 및 제니스테인	392
3-51 총 모나콜린 K	395
3-52 코엔자임Q10	399
3-53 대두이소플라본	402
3-54 진세노사이드	413

3-55 총 엽록소	419
3-56 총 페오포르바이드	423
3-57 유산균수	426
3-58 유산간·구균 및 비피더스균	431
3-59 총 폴리페놀	435
3-60 코로솔산(Corosolic acid)	438
3-61 플라보놀 배당체(Flavonol glycoside)	441
3-62 킱콜릭산(Ginkgolic acid)	445
3-63 실리마린(Silymarin)	451
3-64 PGG(Penta-O-galloyl beta-D-glucose)	455
3-65 포스파티딜세린	458
3-66 테아닌(L-theanine)	461
3-67 엠에스엠(MSM)	464
3-68 폴리감마글루탐산	467
3-69 히알루론산	476
3-70 로사빈	480
3-71 안토시아노사이드	483
3-72 알리인	485
3-73 크레아틴 모노하이드레이트	489
3-74 알파에스1카제인(α_{S1} -casein) _(f91-100)	492
3-75 라이코펜(lycopene)	496
3-76 글루코실세라미드(Glucosylceramide)	500
3-77 소포리코사이드(Sophoricoside)	503
3-78 비타민 A 및 비타민 E 동시분석법	506
3-79 카테킨 및 카페인 동시분석법	511
3-80 포스콜린(Forskolin)	516
3-81 알로인	519

1

일반원칙



1. 일반원칙

1-1. 시료채취 방법

- 1) 시료는 채취된 검체에서 시험에 직접 사용되는 물질을 말한다.
- 2) 시료채취는 시험의 대표성을 가질 수 있도록 균질하여 해당 시험항목에서 기재된 필요한 양을 정확히 채취한다.
- 3) 시험에 사용된 시료는 규격항목에 따라 채취 방법을 달리한다.
 - (1) 미생물, 부정물질, 봉해 및 성상
 - (가) 캡슐은 외피를 포함하여 시험의 시료로 사용한다.
 - (2) (1)항을 제외한 규격항목
 - (가) 캡슐은 외피를 제거하고 내용량을 취하여 균질화 시킨 후 시험의 시료로 사용한다.
 - (나) 과립, 정제 및 환은 분쇄하여 균질화 시킨 후 시험의 시료로 사용 한다.
 - (다) 분말 및 액상은 균질화 시킨 후 시험의 시료로 사용한다.

1-2. 용어의 정의 및 단위

- 1) 이 공전에서 계량의 단위는 다음의 기호를 사용한다.
 - (1) 길이 : m, cm, mm, μm , nm
 - (2) 용량 : L, mL, μL
 - (3) 질량 : kg, g, mg, μg , ng, pg
 - (4) 넓이 : cm^2 , m^2 , mm^2
 - (5) 열량 : kcal, kJ
 - (6) 온도 : $^{\circ}\text{C}$
- 2) 원자량은 최신 국제원자량표에 의하고, 분자량은 국제원자량표에 의하여 계산한다.
- 3) 질량백분율을 표시할 때에는 %의 기호를 쓰며, 용액 100 mL중의

물질함량 (g)을 표시할 때에는 w/v%로, 용액 100 mL중의 물질함량(mL)을 표시할 때에는 v/v%의 기호를 쓴다. 질량백만분율을 표시할 때에는 mg/kg을 사용하며, mg/L도 사용할 수 있다.

- 4) 표준온도는 20°C, 상온은 15~25°C, 실온은 1~35°C, 미온은 30~40°C로 한다.
- 5) “찬 곳(냉소)”이라 함은 따로 규정이 없는 한 0~15°C의 장소를 말한다.
- 6) 시험은 따로 규정이 없는 한 상온에서 실시하고 조작 후 30초 이내에 관찰한다. 다만, 온도의 영향이 있는 것에 대하여는 표준온도에서 행한다.
- 7) 시험에 쓰는 물은 따로 규정이 없는 한 증류수 또는 정제수로 한다.
- 8) 액성을 산성, 알칼리성 또는 중성으로 표시한 것은 따로 규정이 없는 한 pH미터기 또는 리트머스지를 써서 시험한다. 액성을 상세히 나타낼 때에는 pH값을 쓴다. 또한, 강산성은 pH 약 3.0이하, 약산성은 pH 약 3.0~5.0, 미산성은 pH 약 5.0~6.5, 중성은 pH 약 6.5~7.5, 미알칼리성은 pH 약 7.5~9.0, 약알칼리성은 pH 약 9.0~11.0, 강알칼리성은 pH 약 11.0 이상을 말한다.
- 9) 혼액을 (1 : 1), (4 : 2 : 1) 등으로 나타낸 것은 액체시약의 혼합 용량비 또는 고체시약의 혼합 무게비를 말한다. 또한, 용액의 농도 (1→5), (1→10), (1→100) 등으로 나타낸 것은 고체 시약 1 g 또는 액체시약 1 mL를 용매에 녹여 전량을 각각 5 mL, 10 mL, 100 mL 등으로 하는 것을 뜻한다.
- 10) 무게를 “정밀히 단다”라 함은 달아야 할 최소단위를 고려하여 0.1 mg, 0.01 mg 또는 0.001 mg까지 다는 것을 말한다. 또 무게를 “정확히 단다”라 함은 규정된 수치의 무게를 그 자리수 까지 다는 것을 말한다.
- 11) 검체를 취하는 양에 “약”이라고 한 것은 따로 규정이 없는 한 기재량의 90~110%의 범위 내에서 취하는 것을 말한다.
- 12) 건조 혹은 강열할 때 “항량”이라고 기재한 것은 다시 계속하여 1시간 더 건조 혹은 강열할 때 전후의 칭량차가 전회 측정한 무게의 0.1%이하임을 말한다. 다만, 칭량차가 화학천칭을 썼을 때 0.5 mg이하, 마이크로 화학천칭을 썼을 때 0.01 mg 이하인 경우에는 항량으로 본다.
- 13) 데시케이터의 건조제는 따로 규정이 없는 한 실리카겔로 한다.
- 14) 감압은 따로 규정이 없는 한 15 mmHg이하로 한다.

- 15) 시약, 시액, 표준용액을 보존하는 유리용기는 용해도 및 알칼리도가 매우 낮고 납 및 비소를 될 수 있는 대로 함유하지 아니하는 것을 사용한다.
- 16) 용매는 특별한 규격이 없는 한 “HPLC용”을 사용한다.
- 17) 따로 규정이 없는 한 시약, 표준품은 최순품을 사용한다.
- 18) 따로 규정이 없는 한 표준용액을 이용하여 검량선을 작성할 경우 3가지 이상의 농도로 검량선을 작성하여야 하고 시험용액 중 분석하고자 하는 농도가 검량선 내에 포함될 수 있도록 표준용액 농도를 조절하여 사용한다.
- 19) 따로 규정이 없는 한 시험용액 시험 시 반드시 공시험을 함께 한다.
- 20) 영양정보에 표시된 열량, 탄수화물, 단백질, 지방 및 나트륨의 시험법은 식품공전 제8. 일반시험법에 따른다.
- 21) 이 공전에 별도로 규정이 없는 시험법에 대해서는 식품공전 시험법을 따른다.

2

일반시험법



2. 일반시험법

2-1 봉해시험법

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료가 물이나 시험액상에서 반복된 상하 움직임에 의하여 시료가 녹는 시간을 측정하는 방법으로, 내용고형제품의 시험액에 대한 봉해성 또는 저항성을 시험하는 방법이다. 따로 규정이 없는 한 정제제품, 적당한 제피제로 제피를 한 정제제품, 환제품, 캡슐제품, 과립제품, 장용성 제품은 각각 다음의 시험에 적합하여야 한다.

2. 장비와 재료

2.1 분석장비

이 시험에 쓰는 장치는 다음과 같으며 시험기, 안지름 약 110 mm이고 높이 약 155 mm인 비커, 적당한 가열기 및 전동기로 되어 있으며, 따로 조작법에 따라 보조판 또는 보조통을 쓴다.

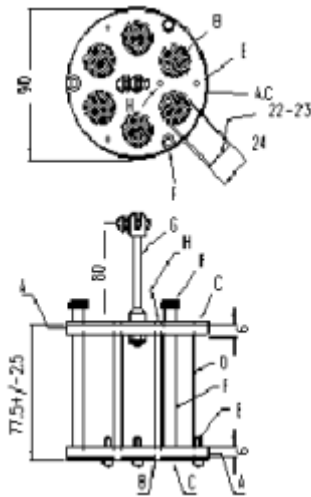
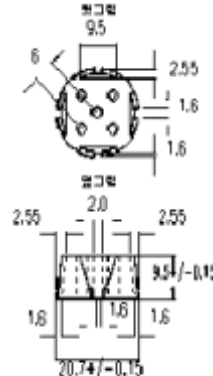


그림 1-1



숫자는 mm를 표시

그림 1-2



그림 1-3

A : 플라스틱판

B : 체 눈의 간격 2.0 mm,
선재의 지름 6.0 mm의 내산성 망

C : 내산성 금속판

D : 유리관

E : 나사

F : 지주 및 나사

G : 매다는 축

H : 온도계 삽입구

J 및 M : 플라스틱통

K : 체 눈의 간격 0.42 mm

선재의 지름 0.29 mm의 내산성 망

L : 내산성 철사 손잡이

2.1.1 시험기

시험기는 그림 1-1과 같이 지름 90 mm, 두께 6 mm의 상하 2장의 플라스틱판 A가 있고 여기에 각각 지름 24 mm의 구멍이 같은 간격으로 6개 뚫어져 있다. 아래의 플라스틱판의 아랫면에는 체 눈의 간격 2.0 mm, 선재(線材)의 지름 0.6 mm의 내산성 망 B를 달고 위의 플라스틱판의 윗면과 아래의 플라스틱판 망의 아랫면에는 각각의 구멍에 해당하는 부분에 지름 22~23 mm의 구멍을 6개 뚫은 지름 90 mm, 두께 1 mm의 내산성 금속판 C를 단다. 상하의 플라스틱판의 구멍에 안지름 21.5 ± 0.5 mm, 바깥지름 23.5 mm, 길이 77.5 ± 2.5 mm의 유리관 D 6개를 끼우고 지주(支柱) 3개를 써서 내산성 금속판 위에 나사로 유리관을 고정한다. 중심에 매단 축(軸) G는 길이 80 mm로 하고 그 위 끝은

전동기를 써서 부드럽게 상하운동을 할 수 있도록 한 수축(受軸)에 단다. 다만, 시험기는 유리관 및 망에 관한 규정을 제외하고는 그 구조를 다소 변경할 수도 있다.

2.1.2 보조판

보조판은 그림 1-2에 표시한 것과 같이 높이 9.50 ± 0.15 mm, 지름 20.70 ± 0.15 mm의 투명하고 매끄러운 플라스틱제의 원주로 비중은 1.18~1.20이다. 이 윗면에서 아랫면까지 지름 2 mm의 구멍이 5개가 뚫어져 있으며 그 1개는 중심을 통하고 다른 4개는 중심에서 6 mm의 거리에 같은 간격으로 위치하고 있다. 보조판의 측면에는 V자형으로 자른 것이 4개 같은 간격으로 있고 각각 자른 부분의 폭은 윗면이 9.5 mm, 아랫면이 1.6 mm, 깊이는 윗면 2.55 mm, 아랫면 1.6 mm이다.

2.1.3 보조통

보조통은 그림 1-3에 표시한 것과 같이 안지름 12 mm, 바깥지름 17 mm, 길이 20 mm의 플라스틱통 M의 양단 바깥쪽의 나사를 풀고 안지름 12 mm, 바깥지름 17 mm, 길이 2.5 mm의 플라스틱통 J의 안쪽나사를 풀고 체 눈 간격 0.42 mm, 선재의 지름 0.29 mm의 내산성의 망을 놓고 먼저의 원통의 양단에 밀착시킨 것이다. 보조통의 상하 망의 간격은 20 ± 1 mm로 하고 바깥쪽 중앙부에 지름 1 mm의 내산성 철사를 써서 높이 80 mm의 손잡이를 단다.

2.3 분석장비의 준비

시험기를 수축에 달고 비커 속에 넣어 1분간 29~32회 왕복, 진폭 53~57 mm로 부드럽게 상하운동을 하도록 조절한다. 시험기가 최대로 내려갔을 때 아래의 망 면이 비커의 바닥으로부터 25 mm가 되도록 하고 비커에 넣는 시험액의 양은 시험기가 최하로 내려갔을 때 시험기의 윗면의 액의 표면에 일치하도록 한다. 시험하는 동안 액의 온도는 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지한다.

과립제품 이외는 시료 6개를 취하여 시험기의 유리관에 1개씩 넣고 시험기를 미리 온도 및 액량을 조절한 비커중의 시험액에 담고, 일정시간 상하운동을 한 다음 시험기를 가만히 시험액에서 꺼내고 유리관 내의 시료상태를 관찰한다. 보조판을 쓰도록 지정되어 있을

경우에는 시험기의 유리관에 시료를 넣고 다음에 보조판 윗면을 위로 하여 1개씩 가만히 넣은 다음 앞에서와 같은 조작을 한다. 다만, 판정이 곤란할 때에는 보조판을 쓰지 않을 수 있다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

- 3.1.1 염화나트륨(Sodium chloride)
- 3.1.2 염산(Hydrochloric acid)
- 3.1.3 증류수(Distilled water)
- 3.1.4 제1인산칼륨(Monopotassium phosphate)
- 3.1.5 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2 시액의 조제

- 3.2.1 제1액 : 염화나트륨 2.0 g에 염산 7.0 mL 및 물을 넣어 녹여 1 L로 한다. 이 액은 무색투명하고 그 pH는 약 1.2이다.
- 3.2.2 제2액 : 0.2 mol/L 인산이수소칼륨시액 250 mL에 0.2 mol/L 수산화나트륨시액 118 mL 및 물을 넣어 1 L로 한다. 이 액은 무색 투명하고 그 pH는 약 6.8이다.

4. 시험과정

4.1 조작 방법

- 4.1.1 과립제품 이외에는 시료 6개를 취하여 시험기의 유리관에 1개씩 넣는다.
- 4.1.2 시험기를 미리 온도 및 액량을 조절한 비커 중의 시험액에 담그고, 일정시간 상하운동을 한다.
- 4.1.3 시험기를 가만히 시험액에서 꺼내고 유리관 내의 시료상태를 관찰한다.

4.2 시험 방법

4.2.1 정제제품

물을 시험액으로 하고 보조판을 넣어 30분간 상하운동을 시킨 다음 관찰할 때 시료의 잔류물이 유리관 내에 없거나 있더라도 해면상 (海綿狀, 잔구멍이 송송 배게 뚫리어 해면처럼 된 모양)의 물질이든가 또는 연질(부드러운 성질)의 물질 또는 니상(泥狀,

진흙과 같은 반죽상태)의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

시료 6개 중 시료가 원형상태로 머무르는 것이 1개 또는 파편상태로 있는 것이 1개가 있을 때에는 새로 시료 6개를 가지고 위의 시험을 되풀이하여 시료의 잔류물이 유리관 내에 없거나 있더라도 해면상의 물질이든가 또는 연질의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

4.2.2 적당한 제피제로 제피를 한 정제제품

물을 시험액으로 하고 보조판을 넣어 60분간 상하운동을 시킨 다음 관찰할 때 시료의 잔류물이 유리관 내에 없든가 있더라도 피막이든가 또는 연질의 물질 또는 해면상의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

시료 6개 중 원형상태로 머무르는 것이 1개 또는 피막이 용해, 구멍 또는 벗겨져 있더라도 내용물의 방출이 인정되지 않는 것 1개가 남았을 때에는 시료 6개를 다시 취하여 이 시험을 반복하여 시료의 잔류물이 유리관 내에 없든가 있더라도 피막이든가 또는 연질의 물질 또는 해면상의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

4.2.3 환제제품

정제제품의 시험법에 따른다. 다만, 시험은 제1액에서 60분간 하고 시료의 잔류물이 유리관 내에 남아 있을 때에는 계속하여 제2액에서 60분간 시험한다.

4.2.4 캡슐제품

물을 시험액으로 쓰고 보조판을 넣어 20분간 상하운동을 시킨 다음 관찰할 때 시료의 잔류물이 유리관 내에 없거나 있더라도 피막이든가 또는 연질의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

시료 6개 중 원형상태로 머무르는 것이 1개 또는 피막이 용해, 구멍 또는 벗겨져 있더라도 내용물의 방출이 되지 않은 것이 1개 남았을 때에는 새로 시료 6개를 가지고 이 시험을 되풀이하여 시료의 잔류물이 유리관 내에 없든가 있더라도 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로

한다.

4.2.5 과립제품

과립제품을 35호(500 μm) 체로 쳐서 35호 체 위에 잔류한 시료 0.1 g씩을 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기 유리관 속에 각각 1개씩 넣어 아래쪽에 고정시키고 따로 규정이 없는 한 시험액으로 물을 써서 30분간 상하운동을 시킨 다음, 보조통을 꺼내어 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없든가 있더라도 원형상태로 머무르는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다. 다만, 제피를 한 과립에 대하여는 시험액으로 물을 써서 60분간 상하 운동을 시킨다.

4.2.6 장용성제품

4.2.6.1 과립제품 또는 과립상의 형으로 충전한 캡슐제품

다음의 ① 제1액에 의한 시험 및 ② 제2액에 의한 시험의 두 시험을 한다.

① 제1액에 의한 시험

과립제품 또는 캡슐제품 속에서 빼낸 내용물을 35호(500 μm) 체로 쳐서 35호 체 위의 잔류물 0.10 g씩을 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기의 유리관에 1개씩 넣어 밑에 고정하고 제1액을 시험액으로 하여 60분간 상하운동을 시킨 다음 관찰할 때 시험기의 망목으로부터 떨어지는 입자가 15알갱이 이내일 때에는 적합한 것으로 한다.

② 제2액에 의한 시험

따로 제1액에 의한 시험과 동일한 방법에 따라 시료 0.1 g씩을 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기의 유리관에 1개씩 넣어 아래에 고정하고 제2액을 시험액으로 하여 30분간 상하운동을 한 다음 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없거나 있더라도 원형대로 있는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 있더라도 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

4.2.6.2 과립제품 또는 과립상의 형으로 충전한 캡슐제 이외의 장용성

제품 다음의 ① 제1액에 의한 시험 및 ② 제2액에 의한 시험의

두 시험을 한다.

① 제1액에 의한 시험

시험액으로 제1액을 써서 120분간 상하운동을 한 다음 관찰할 때 시료 6개 중 봉해, 장용성 피막의 구멍 또는 벗겨져 있거나 또는 파손 등으로 내용물이 방출되는 것이 1개 이하일 때에는 제1액에 의한 시험에 적합한 것으로 하고 2개일 때에는 새로 시료 6개를 가지고 이 시험을 되풀이한다. 이 때 6개 모두가 앞에서 말한 이상이 없을 때에는 적합한 것으로 한다.

② 제2액에 의한 시험

따로 시료 6개를 취하여 제2액을 시험액으로 하고 보조판을 넣어 60분간 상하운동을 시킨 다음 관찰할 때 시료의 잔류물이 유리관 내에 없든가 있더라도 피막이거나 해면상의 물질이든가 또는 연질의 물질 또는 니상의 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.

4.2.7 필름제품

물을 시험액으로 하고 보조판을 넣어 3분간 상하운동을 시킨 다음 관찰할 때 시료의 잔류물이 유리관 내에 없을 때 적합한 것으로 한다.

시료 6개 중 시료가 원형상태로 머무르는 것이 1개 또는 파편상태로 있는 것이 1개가 있을 때에는 새로 시료 6개를 가지고 위의 시험을 되풀이하여 시료의 잔류물이 유리관 내에 없을 때에는 적합한 것으로 한다.

2-2 내용량 시험법

1. 용량표시제품

- 1.1 시료의 내용물을 메스실린더에 완전히 옮겨 측정한다. 다만, 점성 등이 있어 내용물을 완전히 옮기기 어려운 시료에 대해서는 내용물이 들어 있는 용기에 물을 넣어 용기를 가득 채웠을 때의 양을 측정한다.
- 1.2 용기의 내용물을 제거하여 물 또는 적당한 용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 후 물을 넣어 용기를 가득 채웠을 때의 양을 측정하여 전후의 용량차로 계산한다(시료 3개를 가지고 시험하여 평균값을 내용량으로 한다).

2. 중량표시제품

- 2.1 내용물이 들어있는 용기 외면을 깨끗이 닦고 무게를 정밀히 측정한다.
- 2.2 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 용매 등으로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 후 용기의 무게를 달아 전후의 무게차로 계산한다(시료 3개를 가지고 시험하여 평균값 내용량으로 한다). 다만, 내용량에 포함된 흡습제 등 비가식 대상은 제외한다.

3. 소포장제품

- 3.1 내용물이 소포장으로 20개 이하일 경우에는 전체를, 20개 이상일 경우에는 20개를 무작위로 취해 위와 같이 실험하여 평균값을 구한 후 전체 개수를 곱하여 총량으로 계산한다.

4. 캡슐제품

4.1 경질캡슐제품

- 4.1.1 표시된 시료의 전체 개수를 확인한 후, 캡슐 20개를 취하여 무게를 측정한다.
- 4.1.2 캡슐을 열고 내용물을 작은 붓 등을 사용하여 제거하고 빈 캡슐의 무게를 측정한다.
- 4.1.3 전후의 무게차를 20으로 나눈 평균값을 캡슐 당 무게로 하여 캡슐별로 무게와 총 개수에 대하여 각각 판정한다.

4.2 연질캡슐제품

- 4.2.1 표시된 시료의 전체 개수를 확인한 후, 캡슐 20개를 취하여 무게를 측정하고, 캡슐을 절개하여 그 내용물을 에테르 등의 휘발성 용매로 씻는다.
- 4.2.2 여과지 등으로 빈 캡슐로부터 용매를 가볍게 제거하고 실온으로 30분 이상 방치하여 캡슐에 묻어 있는 용매를 제거한다.(이 때 캡슐이 흡습 또는 건조되는 것을 피한다)
- 4.2.3 빈 캡슐의 무게를 측정한 후, 전후의 무게차를 20으로 나눈 평균값을 캡슐 당 무게로 하여 캡슐별의 무게와 총 개수에 대하여 각각 판정 한다.

5. 정제제품

- 5.1 표시된 시료의 전체 개수를 확인한 후 20정을 취하여 무게를 측정하고, 20으로 나눈 평균값을 정 당 무게로 하여 정별로 무게와 총 개수에 대하여 각각 판정한다.

6. 통조림제품

- 6.1 내용물이 들어있는 관 외면을 깨끗이 닦고 무게(A)를 정밀히 단 후 뚜껑의 일부분이 관에 붙어있게 개관한다.
- 6.2 관(액즙이 응고한 경우에는 20℃로 가온하여 액을 용해한 관)을 비커에 2분간 비스듬히 올려놓아 액즙이 충분히 흘러내리게 한 후 내용물이 든 관의 무게(B)를 단다.
- 6.3 내용물을 완전히 제거하고 물 등으로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 후 무게(C)를 달아 (A)와 (C)의 무게 차 및 (B)와 (C)의 무게차를 각각 내용량 및 고형량으로 한다(시료 3개를 가지고 시험하여 평균값을 내용량 및 고형량으로 한다).
- 6.4 내용량이 관 용적을 기준(예 : 관용적의 90%이상)으로 하여 관 용적을 계산할 필요가 있을 때에는 원체부의 높이가 변하지 않도록 관의 뚜껑을 제거하여 내용물을 완전히 비운 후 4℃의 물을 관의 최상면에서 수직으로 4.76 mm(2중 관체 내면)까지 채운 양을 관용적으로 한다.
- 6.5 고형량의 계산(예 : 내용량의 70%이상 등)은 내용량 기준에 대한

계산을 말한다.

2-3 입도시험법

1. 과립제품

- 1.1 12호(1680 μm), 14호(1410 μm) 및 45호(350 μm) 체를 써서 시험한다. 다만 이 시험법에 쓰는 체 틀의 안지름은 75 mm로 한다.
- 1.2 시료 20 g을 정확하게 달아 앞에서 지정한 체 및 수기(受器)를 겹쳐놓은 용기의 상단 체에 넣고 뚜껑을 덮은 다음 3분간 수평으로 흔들며 주면서 때때로 가볍게 두드려준 다음 각 체 및 수기 내 잔류물의 질량을 단다.
- 1.3 12호(1680 μm) 체를 전량 통과하고 14호(1410 μm) 체에 남는 것은 전체량의 5%이하이고 또 45호 (350 μm) 체를 통과하는 것은 전체량의 15%이하일 때 적합하다.

2-4 산도시험법

2-4-1 산도

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 산의 총량측정을 이용한 분석법으로 pH 지시약(페놀프탈레인)을 사용하여 알칼리 규정액으로 적정함으로써 산의 함량을 구한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 삼각플라스크(250 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 pH 측정기

2.3 분석장비의 준비

2.3.1 pH 측정 전에 충분히 안정화 시키고, 기기보정을 해둔다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 시액의 조제

3.1.1 0.1 N 수산화나트륨 용액(Sodium hydroxide)

1 N 수산화나트륨 용액을 취하여 증류수로 10배 용량으로 희석하여 사용하거나 수산화나트륨 4.5 g을 취하여 일정량의 증류수에 녹이고 1000 mL 부피플라스크에 옮겨 담은 후 증류수를 표시까지 채운 다음 표정하여 사용한다.

3.1.2 페놀프탈레인 시액(Phenolphthalein)

페놀프탈레인 1 g을 에탄올 100 mL에 녹인다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 시료 0.5 g에 끓여서 식힌 증류수 50 mL를 가하여 페놀프탈레인 시액 0.5 mL를 가한다.

4.1.2 0.1 N 수산화나트륨용액으로 30초간 붉은색이 지속될 때까지 적정한다.

※ 단, 시험용액이 착색되어 있는 경우는 pH 측정기를 이용하여 pH 8.3 까지 적정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 계산

$$5.1.1 \text{ 산도}(1 \text{ N NaOH mL}/100\text{g}) = S \times \frac{f \times 10}{\text{시료채취량(g)}}$$

S : 0.1 N 수산화나트륨용액의 소비량(mL)

f : 0.1 N 수산화나트륨용액의 역가

2-4-2 유기산 산도

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 산의 총량측정에 의한 분석법으로 pH 지시약(페놀프탈레인)을 사용하여 알칼리 규정액으로 적정함으로써 유기산 함량을 구한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 삼각플라스크(250 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 pH 측정기

2.3 분석장비의 준비

2.3.1 pH 측정 전에 충분히 안정화 시키고, 기기보정을 해둔다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 시액의 조제

3.1.1 0.1 N 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

1 N 수산화나트륨 용액을 취하여 증류수로 10배 용량으로 희석하여 사용하거나 수산화나트륨 4.5 g을 취하여 일정량의 증류수에 녹이고 1000 mL 부피플라스크에 옮겨 담은 후 증류수를 표시까지 채운 다음 표정하여 사용한다.

3.1.2 페놀프탈레인 시액(Phenolphthalein)

페놀프탈레인 1 g을 에탄올 100 mL에 녹인다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 시료 10 g에 끓여서 식힌 증류수 100 mL를 가하여 페놀프탈레인 시액 0.5 mL를 가한다.

4.1.2 0.1 N 수산화나트륨용액으로 30초간 붉은색이 지속될 때까지 적정한다.

※ 단, 시험용액이 착색되어 있는 경우는 pH 측정기를 이용하여 pH

8.3까지 걱정한다.

5. 계산

5.1 계산

$$5.1.1 \text{ 유기산 산도(젖산으로서, \%)} = S \times \frac{f \times 0.009}{\text{시료채취량(g)}} \times 100$$

S : 0.1 N 수산화나트륨용액의 소비량(mL)

f : 0.1 N 수산화나트륨용액의 역가

2-5 유해물질 시험법

2-5-1 시안화합물

1. 시험방법의 요약

시료를 수기에 밀전하고 시료로부터 휘발되는 시안화합물에 의한 피크린산지의 색변화를 관찰하여 시안화합물을 정성분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 삼각플라스크(200 mL)

2.1.2 코르크 마개

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

3.1.1 탄산나트륨(Sodium carbonate)

3.1.2 구연산(Citric acid)

3.1.3 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.1.4 피크린산(Picric acid)

3.1.5 주석산(Tartaric acid)

3.2 시액의 조제

3.2.1 구연산 완충액

구연산 128.1 g, 수산화나트륨 64.4 g을 증류수에 용해시켜 1 L로 하고 pH 5.9로 조절한다.

3.2.2 피크린산지

여지를 포화 피크린산 용액에 담그고 실온에서 건조한 후 7×40 mm의 크기로 잘라서 사용 시 10% 탄산나트륨용액에 담근다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 시료 20 g을 200 mL 삼각플라스크에 취한다.

- 4.1.2 구연산 완충액 50 mL를 4.1.1에 가한다.
- 4.1.3 삼각플라스크를 피크린산지를 매달은 코르크 마개로 밀전한다.
- 4.1.4 25~35°C에서 때때로 흔들어 혼합시키면서 3시간 방치한다.
- 4.1.5 이후 주석산 2 g을 가한다.
- 4.1.6 코르크마개를 신속히 밀전하고 때때로 흔들어 혼합하면서 50~60°C에서 1시간 방치한다.

5. 분석 및 계산

5.1 결과 분석

5.1.1 피크린산지의 색변화를 관찰

(예) 공시험 : 노란연두, 시료 : 갈색)

2-5-2 카페인

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올과 초음파 처리를 이용하여 시료 중 카페인을 충분히 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 통해 분석하는 방법으로 카페인의 최대 흡수파장인 280 nm에서 정량분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

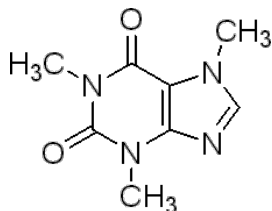
2.3 분석장비의 준비

이동상인 아세토니트릴과 0.1%인산용액을 이용하여 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 카페인(Caffeine, 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, 1,3,7-trimethylxanthine, trimethylxanthine, theine, methyltheobromine)
분자식 : $C_8H_{10}N_4O_2$, 분자량 : 194.19, CAS No. : 58-08-2



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.3 초산(Acetic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질을 메탄올에 녹여 1,000 µg/mL 되도록 표준원액을 만든다.

4.1.2 표준원액을 적당량 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료(카페인으로서 20~80 mg) 적당량을 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣은 후 메탄올을 가하여 초음파 추출을 한다.

4.2.2 위의 용액을 메탄올을 표선까지 채운 다음, 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 µL
검출기 파장	280 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	A : 0.1%초산용액, B : 100%아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	95	5
10	85	15
11	0	100
20	0	100
21	95	5
40	95	5

5.2. 계산

$$5.2.1 \text{ 카페인 함량 (mg/kg)} = S \times \frac{V}{\text{시료채취량 (g)}}$$

S : 시험용액 중 카페인의 농도($\mu\text{g/mL}$)

V : 시험용액의 전량(mL)

2-5-3 디에틸렌글리콜

2-5-3-1 디에틸렌글리콜(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 메탄올로 추출한 후 알루미나칼럼을 통해 부분 정제하고 가스크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법으로 표준물질과의 면적비를 이용하여 정성·정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 감압농축기

2.1.2 알루미나칼럼

2.1.3 환저플라스크(100 mL)

2.1.4 부피플라스크(100 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 100% dimethylpolysiloxane 칼럼 (길이 50 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.17 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

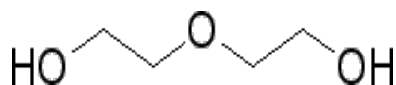
분석시작 전에 주입부 및 검출기 온도, 유량, 칼럼온도를 분석조건에 맞게 조작하고, 가스크로마토그래프를 충분히 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 디에틸렌글리콜(Diethylene glycol, (2-hydroxyethoxy)ethan-2-ol)

분자식 : $C_4H_{10}O_3$, 분자량 : 106.12, CAS No. : 111-46-6



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 디에틸렌글리콜 100 mg을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.2 메탄올을 표선까지 채운다.
- 4.1.3 위의 용액 5 mL을 취하여 다시 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.4 메탄올을 표선까지 채운 다음, 필요 농도로 희석하여 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

- 4.2.1 분말 또는 페이스트상의 시료는 1 g을 취하여 메탄올 10 mL를 가하여 녹인다. 단, 액상시료는 5 mL를 취하여 40°C에서 감압 농축 하여 수분을 제거한 후 잔사에 메탄올 10 mL를 가하여 녹인다.
- 4.2.2 위의 용액을 활성화된 알루미나칼럼에 가한다.
- 4.2.3 메탄올 30 mL로 용출한다.
- 4.2.4 용출액을 40°C에서 약 1 mL로 감압 농축시킨다.
- 4.2.5 메탄올을 가하여 5 mL로 한 후 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	140°C
칼럼 온도	40°C(3분) → 10°C/분 → 250°C(20분)
검출기 온도	250°C
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 디에틸렌글리콜 함량($\mu\text{g/g}$) = $C \times (a/S)$

C : 시험용액 중의 디에틸렌글리콜 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 최종희석액(mL)

S : 시료 채취량(g)

2-5-3-2 디에틸렌글리콜(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올로부터 시료를 추출하여 알루미나칼럼을 통해 부분 정제하여 가스크로마토그래프/질량검출기를 통해 분석하는 방법으로 표준물질과의 이온질량 비교로 정성·정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 감압농축기

2.1.2 알루미나칼럼

2.1.3 환저플라스크(100 mL)

2.1.4 부피플라스크(100 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 질량검출기(Mass Selective Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 100% dimethylpolysiloxane 칼럼(길이 50 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.17 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

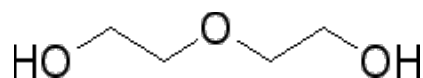
분석시작 전에 주입부 온도, 유량 및 칼럼 온도를 분석조건에 맞게 조작 하고, 가스크로마토그래프/질량검출기를 충분히 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 디에틸렌글리콜(Diethylene glycol, (2-hydroxyethoxy)ethan-2-ol)

분자식 : $C_4H_{10}O_3$, 분자량 : 106.12, CAS No. : 111-46-6



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 디에틸렌글리콜 100 mg을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.2 메탄올을 표선까지 채운다.
- 4.1.3 위의 용액 5 mL를 취하여 다시 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.4 메탄올을 표선까지 채운 다음, 필요 농도로 희석하여 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

- 4.2.1 분말 또는 페이스트상의 시료는 1 g을 취하여 메탄올 10 mL을 가하여 녹인다. 단, 액상시료는 5 mL을 40°C에서 감압농축시켜 수분을 제거한 후 잔사에 메탄올 10 mL을 가하여 녹인다.
- 4.2.2 위의 용액을 활성화된 알루미나칼럼에 가한다.
- 4.2.3 메탄올 30 mL로 용출한다.
- 4.2.4 용출액을 40°C에서 약 1 mL로 감압 농축시킨다.
- 4.2.5 메탄올을 가하여 5 mL로 한 후 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프-질량검출기(GC/MS) 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	280°C
칼럼 온도	280°C
주입량	1 µL
이온질량	m/z 45, m/z 75
캐리어 가스	헬륨 0.75 kg/cm ²
Split ratio	30 : 1

5.2 계산

5.2.1 디에틸렌글리콜 함량(µg/g) = $C \times (a / S)$

C : 시험용액 중의 디에틸렌글리콜 농도(µg/mL)

a : 최종희석액(mL)

S : 시료 채취량(g)

2-5-4 시트리닌

2-5-4-2 시트리닌(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 에탄올을 이용하여 시료 중 시트리닌을 충분히 추출하여 액체크로마토 그래프를 통해 분석하는 방법으로 형광검출기를 이용하여 정성 및 정량분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

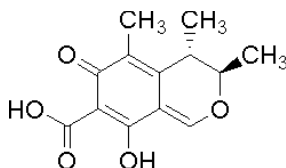
이동상인 0.1% 삼불화초산용액 : 아세토니트릴(60 : 40)을 이용하여 용매를 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 시트리닌(Citrinin)

분자식 : $C_{13}H_{14}O_5$, 분자량 : 250.25, CAS No. : 518-75-2



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 메탄올(Methanol)

3.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.4 삼불화초산(Trifluoroacetic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질을 10 mg을 정밀하게 달아 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 메탄올을 표선까지 채운다.

4.1.3 이를 메탄올로 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 2.5 g을 정밀하게 달아 원심관에 넣고 에탄올 20 mL를 첨가한다.

4.2.2 30분간 초음파 처리한다.

4.2.3 추출액을 원심분리(3,000×g, 10분)한 뒤 상등액을 취한다.

4.2.4 이를 감압농축 한다.

4.2.5 메탄올 1 mL에 녹여 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조 건
주입량	10 μL
검출기 파장	여기파장 : 335 nm, 측정파장 : 502 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	0.1% 삼불화초산용액 : 100% 아세토니트릴 (60 : 40)
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 시트린 함량(mg/kg) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중 시트린의 농도(μg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수(적용될 경우)

S : 시료 채취량(g)

2-5-4-2 시트리닌(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 시트리닌을 추출한 후, 액체크로마토그래프/질량 검출기/질량검출기 이용하여 정성 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 질량검출기(Mass Selective Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

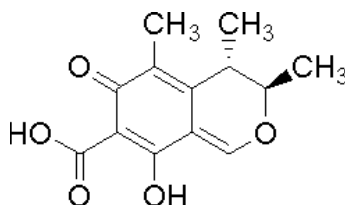
이동상을 충분히 흘려 액체크로마토그래프와 질량검출기를 안정화시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 시트리닌(Citrinin)

분자식 : $C_{13}H_{14}O_5$, 분자량 : 250.25, CAS No. : 518-75-2



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 메탄올(Methanol)

3.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.4 삼불화초산(Trifluoroacetic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준품을 10 mg을 정밀하게 달아 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 메탄올을 넣어 표선까지 채운다(100 µg/mL).

4.1.3 이를 메탄올로 희석하여 표준용액으로 한다(0.01 µg/mL).

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 검체 2.5 g을 정밀하게 달아 원심관에 넣고 에탄올 20 mL를 첨가한다.

4.2.2 30분간 초음파 처리한다.

4.2.3 추출액을 원심분리(3,000×g, 10min)한 뒤 상등액을 취한다.

4.2.4 이를 감압농축 한다.

4.2.5 메탄올 1 mL에 녹여 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항목	조건
주입량	5 μ L
칼럼온도	40°C
이동상	A : 0.1% 개미산, B : 0.1% 개미산이 포함된 아세트니트릴
유속	0.3 mL/분
이온화	ESI, Positive
분석모드	MRM
Capillary voltage	4.0 kV
Corn voltage	25 V
Source temperature	120°C
Desolvation temperature	350°C
Monitor ions(m/z)	251(precursor), 233(product)

표 2. 이동상 조건 (예)

시간	A용액(%)	B용액(%)
0	80	20
3.00	40	60
4.00	40	60
4.01	80	20

2-5-5 초산에틸

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 건강기능식품 중 휘발성물질을 추출하기 위하여 헤드스페이스법을 거친 후 GC 칼럼을 통하여 추출된 용매를 분리하는 방법이다. 분리된 성분은 가스크로마토그래프 불꽃이온화검출기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 GC용 유리병 (2 mL)

2.1.2 헤드스페이스샘플러용 스크류캡 유리병 (25 mL)

2.1.3 부피플라스크 (100 mL, 50 mL)

2.1.4 막자사발

2.1.5 가스타이트시린지 100, 50 μ L

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프/불꽃이온화검출기 혹은 질량분석기

2.2.2 헤드스페이스샘플러 (HeadSpaceSampler)

2.2.3 Wax 칼럼 (0.25 mm i.d. \times 30m \times 0.25 μ m film thickness),
FFAP 칼럼 (0.25 mm i.d. \times 30m \times 0.25 μ m film thickness)
혹은 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

가스크로마토그래프는 가스를 0.5 mL/min.으로 충분한 시간동안 흘려,
검출기 및 칼럼을 안정화시킨다.

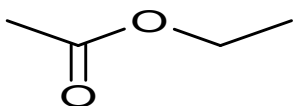
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 초산에틸

Ethyl acetate (EA)

분자식 : $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, 분자량 : 88.11, CAS No. : 141-78-6



3.2 일반시약

3.2.1 톨루엔(Toluene, HPLC grade)

3.2.2 증류수(Distilled water, HPLC grade)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 초산에틸 1 g을 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 부피플라스크에 톨루엔을 넣어 표선까지 채운 다음,¹⁾ 표준원액으로 사용한다.

4.1.3 4.1.2의 표준원액을 톨루엔으로 적절히 희석하여 1250, 2500, 5000 µg/mL 표준용액으로 사용한다.

4.1.4 상기용액은 휘발성이 있으므로 휘발성을 최소화한 바이알에 넣는다.

4.2 검량선 작성용액의 조제

4.2.1 균질화 한 공시험용²⁾ 시료 5 g을 정밀히 취한다.

4.2.2 위의 시료를 25 mL 헤드스페이스샘플러용 유리병에 넣는다.

4.2.3 여기에 가스타이트 시린지를 이용하여 표준원액 1250, 2500, 5000 ppm인 표준용액 100 µL를 각각 넣은 후 다음의 시험조작에서 검량선 작성용액으로 사용한다. 이 용액은 각각 5, 10, 20 µg/mL의 농도가 된다.

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 균질화 한 시료 5 g을 정밀히 취한다.

4.3.2 위의 시료를 25 mL 헤드스페이스샘플러용 유리병에 넣은 후 시험용액으로 사용한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

1) (1.00mL/100mL → 10,000ppm)

2) 초산에틸이 검출되지 않는 시료

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기나 칼럼에 따라 수정이 필요할 수 있다.

표 1. 가스크로마토그래프/헤드스페이스샘플러 조건(예)

구분	항목	조건
가스크로마토 그래프	고정상	FFAP 칼럼(0.25 mm i.d. × 30 m × 0.25 μm)
	칼럼온도	초기조건 : 40°C에서 5분 정체 승온 1단계 1) : 3°C/분으로 50°C 후 5분 정체 승온 2단계 2) : 50°C/분으로 150°C 후 3분 정체
	캐리어가스 및 유량	질소 또는 헬륨, 0.5 mL/분
	분할비율	40 : 1
헤드스페이스 샘플러	주입량	100 μL
	주입기 온도	120°C
	가열 온도 및 방법	80°C, 흔들면서 가열
	가열 시간	10분
	검출기 온도	250°C
	분석시간	20분

5.2 결과 분석

5.2.1 표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램 상의 피이크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피이크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

5.2.2 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램 상의 피이크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피이크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

5.2.3 정량시험

검량선 작성 혼합액을 가스크로마토그래프에 주입함으로써 용매들의 검출기 반응을 측정하여 각 성분에 대한 면적을 구하고

검량선을 작성하여 시료 중 초산에틸의 잔류량을 구한다.

5.3 계산

5.3.1 초산에틸 ($\mu\text{g/g}$) = $A \times (B/C) \times D$

A : 시험용액 중 초산에틸 농도($\mu\text{g/mL}$)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 시료 채취량(g)

D : 표준품 순도(%)

2-5-6 디시안디아미드(Dicyandiamide)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 디시안디아미드를 증류수에 용해한 후 초음파 추출하고 최대흡수파장인 212 nm와 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector)

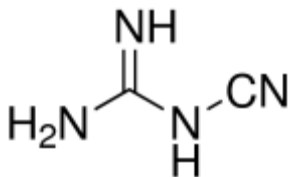
2.2.3 양이온 교환 컬럼 Nucleosil 100-5 SA (안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 디시안디아미드(Dicyandiamide)

분자식 : $C_2H_4N_4$, 분자량 : 84.08, Cas No. : 461-58-5



3.2 일반시약

3.2.1 인산이수소암모늄(Ammonium dihydrogen phosphate, HPLC grade)

3.2.2 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.3 증류수

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 100 mL 부피플라스크에 디시안디아미드 100 mg을 정밀하게 달아 증류수를 가하여 정용하여 이를 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 증류수로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 1 g을 정밀히 달아 10 mL 부피플라스크에 넣고, 증류수 7 mL을 넣는다.

4.2.2 시료를 잘 흔들어 녹인 후, 2분간 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 실온에서 냉각하여 증류수로 10 mL 정용한다.

4.2.4 위의 시험용액을 증류수로 적정농도($\mu\text{g/mL}$)로 희석한 후, 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μL
칼럼온도	35 $^{\circ}\text{C}$
이동상	2.3%(w/v) 인산이수소암모늄 (pH 5.5)
검출기 파장	212 nm
유속	0.5 mL/min

5.2 계산

5.2.1 표준용액 및 시험용액 10 μL 를 주입하여 앞의 조건에 따라 시험한다. 표준용액 중 디시안디아미드 면적에 의해 구한 검량선에 따라 시험용액 중 디시안디아미드 농도를 구하고 다음 식에 따라 디시안디아미드 함량을 구한다.

$$\text{디시안디아미드 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times b$$

C : 시험용액 중 디시안디아미드 함량($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 무게(g)

2-5-7 디하이드로트리아진(Dihydrotriazine)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 디하이드로트리아진을 증류수에 용해한 후 초음파 추출하고 최대흡수파장인 237 nm에서 액체크로마토그래프/자외부흡광광도 검출기를 이용하여 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector)

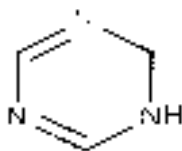
2.2.3 양이온 교환 컬럼 Nucleosil 100-5 SA (안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 µm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 디하이드로트리아진(Dihydro-1,3,5-triazine)

분자식 : $C_3H_5N_3$, 분자량 : 83.09, CAS No. : 45427-50-7



3.2 일반시약

3.2.1 인산이수소암모늄(Ammonium dihydrogen phosphate, HPLC grade)

3.2.2 수산화나트륨 (Sodium hydroxide)

3.2.2 증류수

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 100 mL 부피플라스크에 디하이드로트리아진 100 mg을 정밀하게 달아 증류수를 가하여 정용하여 이를 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 증류수로 희석하여 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 표준용액을 만들어 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 1 g을 정밀히 달아 10 mL 부피플라스크에 넣고, 증류수 7 mL을 넣는다.

4.2.2 시료를 잘 흔들어 녹인 후, 2분간 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 실온에서 냉각하여 증류수로 10 mL 정용한다.

4.2.4 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μL
칼럼온도	35 $^{\circ}\text{C}$
이동상	2.3%(w/v) 인산이수소암모늄(pH 5.5)
검출기 파장	237 nm
유속	0.5 mL/min

5.2 계산

5.2.1 표준용액 및 시험용액 10 μL 를 주입하여 앞의 조건에 따라 시험한다. 표준용액 중 디하이드로트리아진 면적에 의해 구한 검량선에 따라 시험용액 중 디하이드로트리아진 농도를 구하고 다음 식에 따라 디하이드로트리아진 함량을 구한다.

$$\text{디하이드로트리아진 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times b$$

C : 시험용액 중 디하이드로트리아진 함량($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 무게(g)

2-5-8 트레온산

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 트레온산을 1% 개미산 용액으로 추출한 후 액체크로마토 그래프/질량분석기/질량분석기를 이용하여 정량 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 시험관
- 2.1.2 부피플라스크
- 2.1.3 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.4 용매용 일회용 실린지
- 2.1.5 초음파진탕기

2.2 분석장비

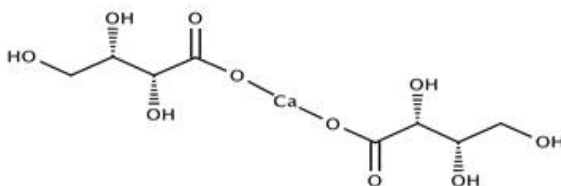
- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 질량분석기
- 2.2.3 C₁₈ 칼럼(안지름 2.0 mm, 길이 150 mm, 충전입자크기 3 µm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 트레온산칼슘(calcium L-threonate)

분자식 : C₈H₁₄CaO₁₀, 분자량 : 310.27, CAS No. : 70753-61-6



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.2 개미산(Formic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질인 트레온산칼슘 10 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 부피 플라스크에 넣고 1% 개미산 용액으로 정용한 것을 표준 원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 1% 개미산 용액으로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 균질화한 검체 1 g을 50 mL 원심분리관에 정밀히 칭량한다.

4.2.2 1% 개미산 용액 10 mL을 가한 후 5분간 초음파로 추출한다.

4.2.3 2,300 × g에서 5분간 원심분리한다.

4.2.4 상층액 1 mL를 취한 후 1% 개미산을 가하여 적절히 희석한다.

4.2.5 위의 용액을 0.22 μm의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 고속액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기

표 1. 고속액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기 조건

항목	조건
이동상	A용액 : 0.1% 개미산 수용액 B용액 : 0.1% 개미산이 첨가된 아세토니트릴
칼럼온도	30°C
유속	0.2 mL/분
주입량	10 μL
이온화	ESI, Negative
Capillary voltage	4.0 kV
Collision gas	N ₂ (질소 또는 비활성기체)
Collision Energy	10 eV
Desolvation temperature	350°C
Monitor ions(m/z)	135(precursor ion), 75(fragment ion)

표 2. 고속액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기 이동상 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A 용액(%)	B 용액(%)
0	100	0
4.0	100	0
5.0	0	100
7.0	0	100
7.1	100	0
10	100	0

5.2 계산

5.2.1 트레온산 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 0.88$

C : 시험용액 중 트레온산칼슘의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

0.88 : 트레온산의 분자량(136)×2 / 트레온산칼슘의 분자량(310)

2-6 화학적 시험법

2-6-1 아니시딘가

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 차광조건에서 유지 중 2차 산화물인 알데히드(aldehyde)류와 케톤(ketone)류가 p-아니시딘과 반응하여 생성된 황색 발색단을 분광광도계로 분석하는 방법으로, 최대 흡수파장인 350 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색부피플라스크(25 mL, 1 L)

2.1.2 시험관

2.2 분석장비

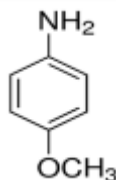
2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 p-아니시딘(p-Anisidine)

분자식: C_7H_9NO , 분자량: 123.15, CAS No: 104-94-9



3.2 일반시약

3.2.1 이소옥탄(Isooctane)

3.2.2 초산(Acetic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

4.1.1 p-아니시딘 2.5 g을 정밀하게 칭량하여 1 L 갈색부피플라스크에 취한 후 초산으로 정용하여 표준원액으로 한다.

4.1.2 표준원액 1 mL을 이소옥탄 5 mL와 혼합하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 0.5 g을 정밀하게 칭량하여 25 mL 갈색부피플라스크에 취한 후 이소옥탄으로 정용하여 시험원액으로 한다.

4.2.2 이소옥탄을 대조액으로 하여 시험원액의 흡광도(AB)를 측정한다.

4.2.3 시험원액 5 mL을 표준원액 1 mL와 혼합하여 10분간 정치한 후 시험용액으로 사용한다.

4.2.4 표준용액을 대조액으로 하여 시험용액의 흡광도(AS)를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 분석

5.1.1 파장 350 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

5.2.1 아니시딘가 = $25 \times (1.2 \times AS - AB) / S$

AS : 시험용액의 흡광도

AB : 시험원액의 흡광도

S : 시료 채취량(g)

2-7 성상시험법

1. 시험방법

본 시험은 품목제조신고하거나 수입신고한 원료 또는 제품의 성상과 동일 또는 유사한지 육안으로 검사한다. 다만, 수입제품은 수입식품등 수입판매업자로부터 제조회사에서 발행한 성상 자료를 제출받아 검사한다.

2. 판정방법

성상시험 판정서의 해당 항목 판정이 모두 '예'인 경우에만 적합으로 판정한다.

3. 성상시험 판정서

시험 항목	시 험 내 용		판정		비고
			예	아니오	
맛/향	고유의 향미가 있고 이미·이취가 없는가? * 맛과 향에 대한 판단이 어려우므로 판정에서는 제외하나, 이미·이취가 있을 경우에는 비교란에 작성함		-	-	
색상	채도/명도	채도(선명한, 흐린, 탁한, 투명한)와 명도(밝은, 어두운, 진한, 연한)가 기재한 내용과 동일한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	광택	광택(광택이 있는, 광택이 없는)이 기재한 내용과 동일한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	색이름	유채색(12종), 무채색(3종) 등 계통색 이름 203색채의 색상과 유사한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
형태	모양	모양(원형, 타원형, 반원형, 장방형/장타원형, 삼각형, 정사각형, 직사각형, 마름모형, 오각형, 육각형, 팔각형 등)이 기재한 내용과 동일한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	기계적 특성	탄성(가소성의, 전성의, 탄력성이 있는), 점도(유동성의, 묽은, 미끈미끈한, 점성의), 접착성(끈끈한, 끈적끈적한, 들러붙는)이 기재한 내용과 동일한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	기하학적 특성	입자성(매끄러운, 모래같은, 낱알이 많은, 거친)이 기재한 내용과 동일한가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
제형	제형(정제, 캡슐(경질/연질), 환, 과립, 액체·액상, 분말, 편상, 페이스트, 시럽, 젤리, 겔, 바, 필름)이 기재한 내용과 동일한가?		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
외관	파손 또는 변형된 부분이 없는가?		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	내용물이 흘러나온 흔적이 없는가?		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	표면에 이물질이 묻어있지 않는가?		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

2-8 용출시험법

1. 시험방법의 요약

용출시험법은 수용성 비타민 성분의 방출 및 용출 또는 가용화 상태를 조사하는 시험으로서 지속성 제품은 따로 규정이 없는 한 「대한민국약전」 제2조제6호 일반정보 중 “경구용약품의 용출규격 설정 가이드라인”에 따라 용출규격을 설정한 자사시험법에 준하여 다음의 시험법에 적합하여야 한다.

2. 장비와 재료

2.1 분석장비

2.1.1 제 1 법 (회전검체통법, 장치 1)

장치는 뚜껑이 있는 유리 또는 투명한 화학적으로 불활성인 재질¹⁾의 용기, 모터, 회전축 및 원통형의 검체통으로 되어 있다. 용기는 적당한 크기의 항온수조에 설치하거나 항온덮개(자켓) 등에 넣고 가온한다. 항온수조 또는 항온덮개는 시험할 때 용기안의 온도가 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 가 되도록 하고 또한 항온수조 안의 액체가 부드럽게 움직이도록 조정한다. 교반부의 부드러운 회전 외에 장치가 설치된 주변 환경과 장치에 기인하는 요동이나 진동이 생기지 않도록 한다. 조작 중에는 검체 및 교반상태를 관찰할 수 있도록 한다. 용기는 아래부위가 반원구인 원통형으로 내용량 1000 mL, 높이 160 ~ 210 mm, 안지름 98 ~ 106 mm 이며 용기의 상부에는 가장자리가 튀어나와 있다. 시험액의 증발을 방지하기 위하여 용기에 뚜껑을 한다²⁾. 회전축은 어느 부분에서도 용기 수직방향의 중심축으로부터의 거리를 2 mm 이내로 하여 부드럽게 회전시켜 결과에 영향을 미치는 요동 또는 진동이 발생하지 않도록 한다. 회전수는 규정된 회전수의 $\pm 4\%$ 이내의 범위로 회전하도록 조절한다.

그림 1에서와 같이 회전축과 검체통은 스테인레스강 (SUS316)제 또는 이와 동등한 불활성의 재질을 쓴다. 또한 금으로 $2.5\ \mu\text{m}$ 의 두께로 피복한 검체통을 쓸 수 있다. 시험을 시작할 때 검체를 건조한 검체통에 넣는다. 조작 중에는 용기의 안쪽 아래와 검체통의 아래쪽 끝과의 거리를 25 ± 2

mm로 고정한다.

2.1.2 제 2 법 (패들법, 장치2)

장치는 장치1과 같은 것을 쓰지만 교반부에는 교반날개와 회전축으로 되어 있는 패들을 쓴다. 회전축은 어느 부분에서도 용기의 수직방향의 중심축으로부터의 거리를 2 mm 이내로 하여 부드럽게 회전시켜 결과에 영향을 미치는 요동 또는 진동이 발생하지 않도록 한다. 패들의 사양은 그림 2에서와 같이 교반날개의 수직방향 축이 회전축의 중심을 관통하고 교반날개의 아래 부위는 회전축의 아래쪽 끝과 동일평면이 되도록 한다. 조작 중에는 용기의 안쪽 아래와 교반날개의 아래쪽 끝과의 거리를 25 ± 2 mm로 고정한다. 교반날개와 축은 금속 또는 화학적으로 불활성인 견고한 재질로 일체화된 것을 쓴다. 조작 중에 교반날개와 회전축을 단단하게 고정할 수 있으면 양자가 분리되는 패들을 쓸 수 있다. 교반날개와 회전축은 화학적으로 불활성으로 하기 위하여 적당한 피복제로 피복할 수 있다. 검체는 교반날개를 회전시키기 전에 용기의 아래부위로 가라앉히고 검체를 넣었을 때 혹은 조작 중에 검체가 뜨는 경우에는 싱커를 쓸 수 있다. 싱커는 화학적으로 불활성 재질로 된 나선상으로 여러 번 감아진 형태이며 그림 2a 형태의 것을 쓸 수 있다. 또한 다른 밸리데이션 된 싱커를 쓸 수 있다. 싱커를 쓰도록 규정되어 있을 때, 싱커는 따로 규정한 것 외에는 그림 2a에서와 같은 것을 쓴다.

2.1.3 제 3 법 (Flow-Through Cell법, 장치3)

장치는 시험액저장조와 송액용펌프, Flow-through cell, 시험액을 37 ± 0.5 °C로 유지하기 위한 항온수조로 되어 있다. Flow-through cell은 인정 당시 규정한 크기의 것을 쓴다.

송액용펌프는 Flow-through cell 안에서 시험액을 위쪽으로 송액한다. 매분 4, 8, 16 mL 의 표준송액속도를 가지는 것을 쓴다. 송액용펌프는 일정유량(표시유량의 ± 5 %)으로 송액하고 맥류의 파형은 120 ± 10 펄스의 정현형이다. 다만 맥류가 생기지 않는 송액용펌프를 쓰는 것도 좋다. Flow-through cell법에 따른 용출시험에서는 송액속도와 맥류의 유무를 규정해야 한다.

투명하며 화학적으로 불활성인 재질로 된 Flow-through cell (그림 3 및 4 참조)을 수직으로 설치하고 셀의 상부에는 용해되지 않은 입자가 유실되는

것을 방지하기 위하여 (인정 당시 규정되어 있는) 필터시스템을 장착한다. 표준 셀의 지름은 12 및 22.6 mm이며 셀의 아래 부분인 원추의 선단에 시험액 도입튜브를 보호하기 위하여 지름 약 5 mm의 유리구슬을 놓고 그 위에 지름 약 1 mm의 유리구슬을 넣어 원추 안을 채운다. 특수한 제형에서는 폴더 (그림 3 및 4 참조)를 써서 검체를 유지할 수 있다. Flow-through cell은 항온수조에 담가 온도를 37 ± 0.5 °C로 유지한다. 새지 않도록 2개의 O-링으로 Flow-through cell을 단단히 조인다. 송액용펌프에서 발생하는 진동을 차단하기 위하여 송액용펌프는 용출장치와 분리하여 설치한다. 송액용펌프는 저장조보다 높은 곳에 놓아서는 안된다. 접속튜브는 될 수 있는 대로 짧으며, 테프론과 같은 화학적 불활성인 것을 쓰고 안지름은 약 1.6 mm이며 양쪽 끝에는 화학적으로 불활성인 접속용 테두리가 붙어있다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

- 3.1.1 염화나트륨(Sodium chloride)
- 3.1.2 염산(Hydrochloric acid)
- 3.1.3 증류수(Distilled water)
- 3.1.4 제1인산칼륨(Monopotassium phosphate)
- 3.1.5 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2 시액의 조제

- 3.2.1 물
- 3.2.2 pH 1.2 시험액 : 염화나트륨 2.0 g에 염산 7.0 mL 및 물을 넣어 녹여 1 L로 한다. 이 액은 무색투명하고 그 pH는 약 1.2이다.
- 3.2.3 pH 4.0/4.5 시험액
 - 3.2.3.1 pH 4.0 시험액 : 0.05 mol/L 초산나트륨완충액[0.05 mol/L 초산·0.05 mol/L 초산나트륨혼합액(82 : 18)을 사용한다.
 - 3.2.3.2 pH 4.5 시험액 : 초산나트륨삼수화물 2.99 g과 빙초산 1.66 g을 물에 녹여 1 L로 한 완충액을 사용한다.
- 3.2.4 pH 6.0 시험액 : 대한민국약전 인산이수소나트륨·구연산 완충액(pH

6.0)을 사용한다.

3.2.5 pH 6.8 시험액 : 0.2 mol/L 인산이수소칼륨시액 250 mL에 0.2 mol/L 수산화나트륨시액 118 mL 및 물을 넣어 1 L로 한다. 이 액은 무색투명하고 그 pH는 약 6.8이다.

3.2.6 인공위액 : 미국약전 Test Solutions의 인공위액(simulated gastric fluid TS)을 사용한다.

3.2.7 인공장액 : 미국약전 Test Solutions의 인공장액(simulated intestinal fluid TS)을 사용한다.

4. 시험과정

4.1 조작 방법

4.1.1 제1법 및 제2법

4.1.1.1 규정한 용기에 규정한 용량 ($\pm 1\%$)의 시험액을 넣고 장치에 연결한다. 시험액을 $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지하고 온도계를 제거하고 검체의 표면에 기포가 생기지 않도록 주의하면서 용기에 검체를 넣고 바로 규정한 회전속도로 장치를 작동한다. 규정한 간격 또는 규정한 시간에 시험액의 표면과 회전검체통 또는 패들의 교반날개 윗면과의 중간이면서 용기 벽에서 10 mm이상 떨어진 곳에서 시험액을 채취한다. (2 시험 이상의 시험액 채취가 규정되어 있는 시험에서는 채취한 양과 같은 용량의 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 시험액을 보충하거나 시험액의 보충이 필요하지 않을 때는 계산할 때 용량 변화를 보정한다. 조작 중에는 용기에 뚜껑을 덮고 적당한 간격으로 용기 안의 시험액의 온도를 확인한다) 지시된 분석법을 써서 용출된 주성분의 양을 측정한다³⁾. 다른 검체에 대해서도 같은 방법으로 조작한다. 시험액의 채취가 자동화된 장치를 쓰거나 장치에 조작을 하여 변경할 때는 이들 장치가 「대한민국약전」의 일반시험법에 표시되어 있는 표준 장치를 써서 얻은 결과와 동등한 결과를 얻는다는 것을 확인한다.

4.1.1.2 규정한 시험액을 쓴다. 규정한 시험액의 양은 $20 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서

측정한다. 시험액이 완충액일 때 pH를 규정값의 ± 0.05 이내가 되도록 조정한다. (시험액에 녹아 있는 기체는 기포의 원인이 되고 시험결과에 영향을 줄 수 있다. 녹아 있는 기체가 용출시험 결과에 영향을 줄 때는 시험하기 전에 탈기한다.4))

4.1.1.3 보통 3시점에서 측정하고 단위는 시간으로 표시한다.

4.1.2 제3법

4.1.2.1 규정한 크기의 셀에 유리구슬을 채운다. 검체를 유리구슬위에 올려 놓거나 검체 폴더의 사용이 규정되어 있을 때는 검체 폴더로 검체를 고정한다. 위쪽의 필터 부분을 나사 등으로 붙인다. 37 ± 0.5 °C로 가온한 시험액을 펌프를 써서 규정한 값의 ± 5 % 이내의 오차의 유량으로 Flow-through cell 아래로부터 셀 안으로 도입한다. 규정한 시간에서 시험액을 채취한다. 규정한 분석법으로 용출된 주성분의 양을 측정한다. 다른 검체에 대해서도 같은 방법으로 조작한다.

4.1.2.2 규정한 시험액을 쓴다. 규정한 시험액의 양은 20 ~ 25 °C에서 측정한다. 시험액이 완충액일 때 pH를 규정값의 ± 0.05 이내가 되도록 조정한다. (시험액에 녹아 있는 기체는 기포의 원인이 되고 시험결과에 영향을 줄 수 있다. 녹아 있는 기체가 용출시험 결과에 영향을 줄 때는 시험하기 전에 탈기한다.4))

4.1.2.3 보통 3시점에서 측정하고 단위는 시간으로 표시한다.

4.2 판정 방법

4.2.1 판정법 1

따로 규정이 없는 한 검체로부터의 용출된 성분의 용출률이 판정기준표를 만족할 때 적합하다. L1 또는 L2를 만족하지 않을 때는 L3까지 시험한다. 각 시점의 용출율의 한도는 표시량에 대한 백분율로 표시한다. 한도 값은 규정한 (경우에 따라서는 투여간격을 구분한) 각

시험액 채취 시간에서의 개개의 용출률 Q_i 값이다. 각조에 2개 이상의 범위가 설정되어 있을 때는 각각의 범위로 판정기준을 적용한다.

4.2.2 판정법 2

따로 규정이 없는 한 검체 6개에 대하여 시험하고 개개의 검체로부터의 용출률이 모두 의약품각조에 규정한 값일 때 적합하다. 규정한 값을 벗어나는 검체가 1개 또는 2개일 때 새로운 검체 6개를 가지고 시험을 반복한다. 12개 중 10개 이상의 검체 개개의 용출률이 규정한 값일 때 적합하다. 2개 이상의 범위가 설정되어 있을 때는 각각의 범위로 판정기준을 적용한다.

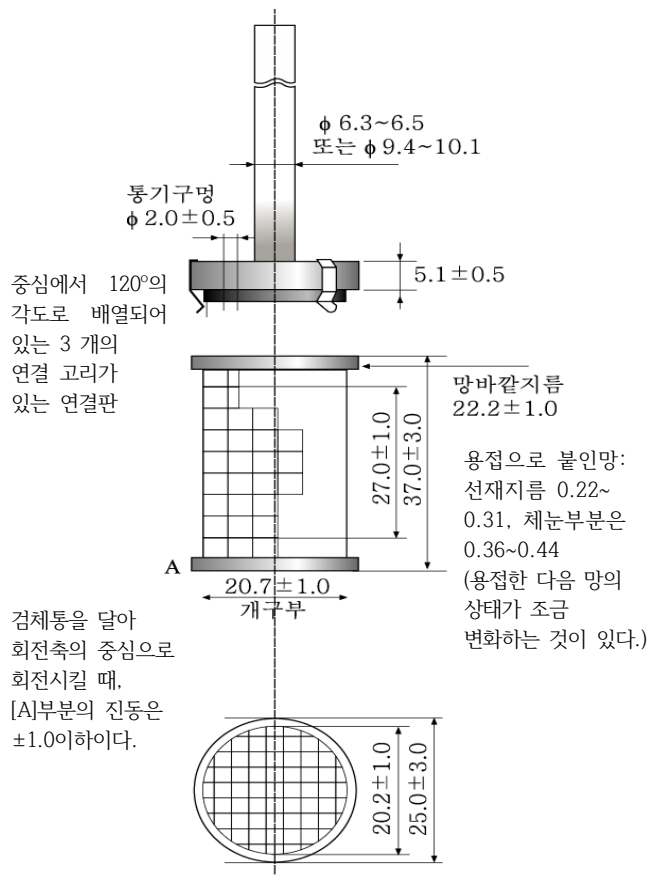
표. 판정기준표

수준	시험개수	판정기준
L1	6	모든 개개의 용출률이 각각의 규정한 범위 내(한도값도 포함)에 있고 최종시험시간에서는 모든 개개의 용출률이 규정한 값 이상이다.
L2	6	12개 (L1 + L2)의 검체의 평균용출률이 규정한 범위 내(한도값도 포함)에 있고 시험을 종료할 때의 12개 (L1 + L2)의 검체의 평균용출률이 규정한 값 이상이다. 또한 개개의 용출률은 규정한 범위에서 표시량의 $\pm 10\%$ 를 벗어나는 것이 없고 시험을 종료할 때에 규정한 값보다 표시량의 10% 보다 낮은 것이 없다.
L3	12	24개 (L1 + L2 + L3)의 검체의 평균용출률이 규정한 범위 내(한도값도 포함)에 있고 동시에 시험을 종료할 때의 24개 (L1 + L2 + L3)의 검체의 평균용출률이 규정한 값 이상이다. 규정한 범위에서 표시량의 10% 를 넘게 벗어나는 것이 24개 중 2개 이하이고 시험을 종료할 때에 규정한 값보다도 표시량의 10% 보다 떨어지는 것이 24개 중 2개 이하이다. 또한 규정한 범위에서 표시량의 20% 를 벗어나는 것이 없고 시험을 종료할 때에 규정한 값보다도 표시량의 20% 를 넘게 낮은 것이 없다.

1) 검체를 흡착하거나, 검체와 반응하거나 검체의 측정을 방해하는 재질이 아닌

것

- 2) 뚜껑을 쓸 때는 온도계 및 시험액을 채취할 기구를 삽입할 수 있도록 삽입구를 미리 열어 둔다.
- 3) 채취한 시험액은 여과가 불필요한 때를 제외하고 채취한 다음 곧 바로 여과한다. 주성분을 흡착하지 않고 또한 분석을 방해하는 물질이 용출하지 않는 필터를 쓴다.
- 4) 탈기법의 예로 시험액을 교반하면서 41 °C로 가온하고 곧 바로 흡인 및 교반하면서 공경 0.45 μm 이하의 필터를 써서 여과하고 다시 5 분간 감압하에 교반한다. 따로 밸리데이션된 탈기법을 써도 된다.



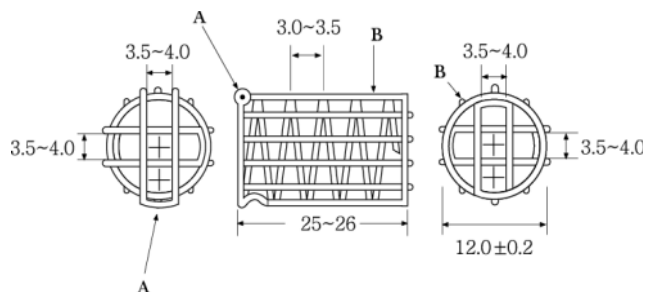
숫자는 mm를 나타낸다.

그림 1. 장치 1, 회전축 및 검체통 부분

- (1) A 및 B의 크기는 회전축의 중심으로 회전시킬 때 0.5 이상 변동하지 않는다.
- (2) 규정되어 있는 것을 제외하고 허용 폭은 ± 1.0 이다.

숫자는 mm를 나타낸다.

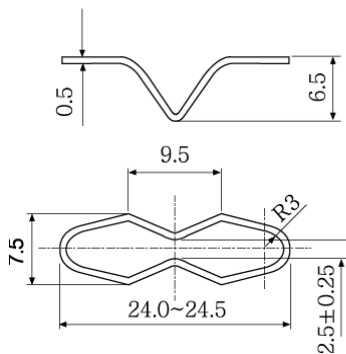
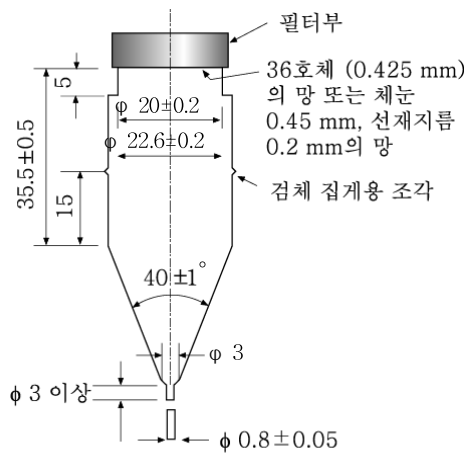
그림 2. 장치 2, 회전축 및 패들의 교반날개 부분



A: 내산성철사로 만든 잠금쇠, B: 내산성철사로 만든 지주

숫자는 mm를 나타낸다.

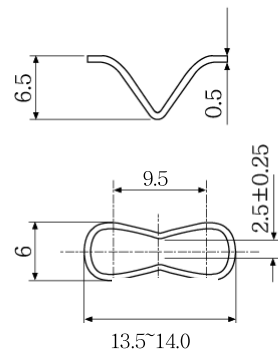
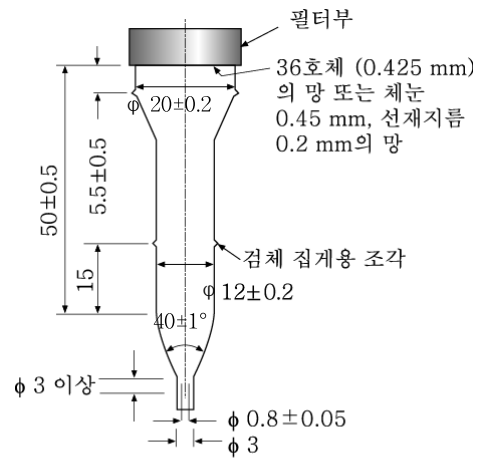
그림 2a. 싱커의 규격예



숫자는 mm를 나타낸다.
φ는 지름을 나타낸다.

그림 3. 장치 3

(위) 정제 및 캡슐용 대형 Flow Through Cell
(아래) 대형 Flow Through Cell 용 정제 집게
(달리 기재하지 아니할 때는 길이는 mm로 나타낸다).



숫자는 mm를 나타낸다.
φ는 지름을 나타낸다.

그림 4. 장치 3

(위) 정제 및 캡슐용 소형 Flow Through Cell
(아래) 소형 Flow Through Cell 용 정제 집게
(달리 기재하지 아니할 때는 길이는 mm로 나타낸다).

3 개별 성분별 시험



3. 개별 성분별 시험법

3-1 비타민 A

3-1-1 비타민 A(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중에 존재하는 비타민A를 비누화시킨 후 벤젠으로 추출하여 감압 건조시키고 잔류물을 클로로포름으로 희석을 시킨 것으로 정색용액에 의해서 변색이 일어남으로써 대조액과 비교하여 분광광도계를 통하여 파장 620 nm에서 흡광도를 측정한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색둥근바닥플라스크

2.1.2 갈색분액깔때기

2.1.3 질소가스

2.1.4 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

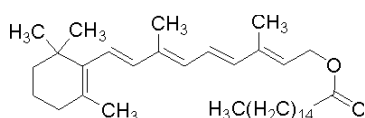
두 개의 셀에 클로로포름 0.6 mL과 정색용액 3 mL을 가하여 분광광도계의 영점을 맞춘다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

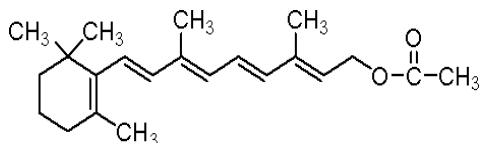
3.1.1 Retinyl Palmitate(all-trans-Retinol palmitate; Vitamin A palmitate)

분자식 : $C_{36}H_{60}O_2$, 분자량 : 524.86, CAS No. : 201-228-5



3.1.2 Retinyl Acetate(Retinol acetate; Vitamin A acetate)

분자식 : $C_{22}H_{32}O_2$, 분자량 : 328.49, CAS No. : 127-47-9



3.2 일반시약

3.2.1 에테르(Ether)

3.2.2 벤젠(Benzene)

3.2.3 에탄올(Ethanol)

3.2.4 빙초산(Glacial acetic acid)

3.2.5 클로로포름(Chloroform)

3.2.6 무수초산(Acetic anhydride)

3.2.7 삼염화안티몬(Antimony trichloride)

3.2.8 황산(Sulfuric acid)

3.2.9 증류수(Distilled water)

3.2.10 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.11 산화크롬(Chromium oxide)

3.2.12 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydride)

3.2.13 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

3.2.14 아연(Zinc)

3.2.15 피로갈롤(Pyrogallol)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 무알데히드에탄올

에탄올 1 L에 50% 수산화칼륨용액 5 mL 및 아연분말 5 g을 가해 약 2시간 환류냉각기를 달아 가온한 후 증류한다. 단, 처음 및 마지막 증류액 각각 10%를 버린다.

4.1.2 초산

빙초산 1 L에 대해서 산화크롬 10 g을 가해 2회 증류한다. 116°C 이상의 증류액을 취한다.

4.1.3 클로로포름

클로로포름 1 L를 황산 20~30 mL씩으로 황산층이 착색되지 않을 때까지 수 회 씻는다. 수세하여 황산을 제거하고, 15~20% 수산화 나트륨용액 20~30 mL로 2~3회 씻은 후 수세한다. 여기에 탄산 칼륨을 가하여 혼합한 후 냉암소에 약 12시간 이상 방치하고 탈수시켜 증류한다. 정제한 클로로포름은 갈색병에 넣어 냉동에 보존한다. 보존 중 흡습하지 않도록 주의한다. 이 클로로포름은 적어도 1주간은 사용이 가능하다.

4.1.4 정색용액

삼염화안티몬 20 g을 상기의 클로로포름 100 mL에 녹여 하룻밤 방치한 후 무수초산 2 mL를 가해 콜크마개나 폴리에틸렌마개를 하여 차광하여 상온으로 보존한다. 이 용액은 흡습성이 강하고 변질이 쉬우므로 조제 후 1주간 내에 사용한다.

4.1.5 표준비타민 A

비타민 A유[1 g 중 비타민 A 10,000국제단위(IU) 함유]를 사용한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 표준비타민 A를 약 100~150단위로 정밀히 측정한다.

4.2.2 측정된 표준비타민 A를 갈색등근바닥플라스크에 취한다.

4.2.3 피로갈롤 100 mg, 하이드로퀴논 100 mg을 가한다.

4.2.4 최소한 3 mL 또는 동량의 50% 수산화칼륨용액 및 그 8배량의 무알데히드에탄올을 가한다.

4.2.5 환류냉각기를 부착하고 95°C 수욕 중에서 갈색등근바닥플라스크를 2/3 잠기게 하여 흔들어주면서 30분간 비누화한다.

4.2.6 비누화한 후 냉각시키고 벤젠 100 mL을 가한다.

4.2.7 15초간 격렬히 흔든다. 침전이 있으면 그것이 침전될 때까지 방치한다.

4.2.8 위의 용액 250~300 mL 갈색분액깔때기에 옮긴다. 이 때 침전물이 발생한 경우 침전물을 씻어 옮길 필요는 없다.

4.2.9 갈색분액깔때기에 1 N 수산화칼륨액 100 mL을 가하여 15초간 흔들어준 후 방치한다.

4.2.10 혼탁된 물층은 버리고 벤젠층에 0.5 N 수산화칼륨액 40 mL을

가하여 격렬히 진탕한다.

4.2.11 벤젠층을 증류수 40 mL로 최소한 4회 가하여 15초간 격렬하게 진탕 혼합하여 수세를 반복한다. 이 때 수세액에 페놀프탈레인시액으로 알칼리의 반응이 나타내지 않을 때까지 수세한다.

4.2.12 갈색분액갈때기를 정치하여 벤젠층과 물층을 완전히 분리한다.

4.2.13 벤젠층에 산화방지제로서 소량의 디부틸히드록시톨루엔을 가한다.

4.2.14 위의 용액의 벤젠층 50 mL을 100 mL 갈색등근바닥플라스크에 정확히 취한다.

4.2.15 45°C 수욕 상에서 짧은 시간 내에 감압 농축시킨다.

4.2.16 불활성 가스로 갈색등근바닥플라스크 내부를 건조시킨다.

4.2.17 잔류물에 직접 클로로포름으로 녹여서 1 mL 중 비타민A가 2, 4, 6, 10 µg을 함유하는 용액을 조제한다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 시료 약 100~150 unit에 상당하는 양을 취한다.

4.3.2 표준용액 제조 방법 4.2.2~4.2.16 까지의 방법과 동일하다.

4.3.3 상기 방법 결과 나온 잔류물에 클로로포름을 가하여 10~20 unit/mL이 되게 희석한다.

4.4 시험조작

4.4.1 시험용액 0.3 mL과 클로로포름 0.3 mL을 정확히 셀에 취한다.

4.4.2 정색용액 3 mL을 가한다.

4.4.3 대조셀에 클로로포름 0.6 mL을 정확히 취한 후 정색용액 3 mL을 가한다.

4.4.4 파장 620 nm에서 흡광도를 측정한다.

4.4.5 표준용액도 4.4.1~4.4.4 방법대로 하여 검량선을 작성한다.

5. 분석 및 계산

5.1 계산

5.1.1 비타민 A 함량(µg/100g) = $A \times B \times (100/C) \times 2$

A : 시험용액 중 비타민 A 농도(µg/mL)

B : 시험용액의 전량(mL)

C : 시료 채취량(g)

3-1-2 비타민 A(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 비타민 A를 에탄올과 피로갈톨에탄올용액을 이용하여 비누화시키고 석유에테르를 이용하여 추출 후 감압건조시켜 이소프로판올로 녹인 것을 옥타데실실릴화한 칼럼을 통하여 비타민 A를 분리하는 방법으로 형광검출기로 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 갈색등근바닥플라스크(100 mL)

2.1.5 갈색분액깔때기

2.1.6 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)

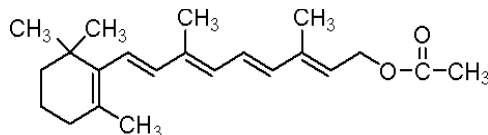
2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Retinyl Acetate(Retinol acetate; Vitamin A acetate)

분자식 : $C_{22}H_{32}O_2$, 분자량 : 328.49, CAS No. : 127-47-9



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

- 3.2.2 증류수(Distilled water)
- 3.2.3 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- 3.2.4 석유에테르(Petroleum ether)
- 3.2.5 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydride)
- 3.2.6 이소프로판올(Isopropanol)
- 3.2.7 피로갈롤(Pyrogallol)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 무알데히드에탄올

에탄올 1 L에 50% 수산화칼륨용액 5 mL 및 아연분말 5 g을 가해 약 2시간 환류 후 증류한다. 단, 처음 및 마지막 증류액 각각 10%는 버린다.

4.1.2 무수황산나트륨

무수황산나트륨을 2시간 이상 120°C에서 가열한 후 데시케이터 방냉한 후 보관한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 비타민 A 아세테이트 결정을 비누화 시켜 비타민 A 알코올로 하여 국제단위(IU) 또는 μg 단위로 환산한다.

4.2.2 이소프로판올로 희석하여 각각 1 mL 중 5, 25, 50 IU가 함유되도록 한다. 사용 시 마다 제조한다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 비타민 A 약 20~30 IU($6\sim9\ \mu\text{g}$)에 상당하는 시료를 정밀히 취하여 갈색등근바닥플라스크에 넣는다.

4.3.2 에탄올 30 mL, 피로갈롤에탄올용액(1→10) 1 mL, 90% 수산화칼륨 용액 3 mL을 넣고 환류냉각기를 부착한 후 95°C 수욕 중에 갈색등근바닥플라스크를 2/3 잠기게 하여 30분간 비누화 시킨다.

4.3.3 신속히 냉각하여 물 30 mL을 가하여 200 mL 갈색분액깔때기에 옮긴다.

4.3.4 갈색등근바닥플라스크를 물 10 mL로 씻어 갈색분액깔때기에 합친다.

- 4.3.5 갈색등근바닥플라스크를 석유에테르 30 mL로 씻은 후 갈색분액깔때기에 합한다.
- 4.3.6 물층은 석유에테르 30 mL씩 2회 추출한다.
- 4.3.7 위의 용액을 물 10 mL 1회, 이어 50 mL씩으로 씻는다. 이 때 수세액에 페놀프탈레인시액으로 알칼리의 반응이 나타내지 않을 때까지 수세한다.
- 4.3.8 갈색분액깔때기에서 물층을 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산나트륨을 통과하며 탈수시켜 갈색등근바닥플라스크에 옮긴다.
- 4.3.9 황산나트륨을 석유에테르 10 mL씩으로 2회 씻은 후 [4.3.8]의 갈색등근바닥플라스크에 가한다.
- 4.3.10 석유에테르층을 40~50°C에서 감압 농축한다.
- 4.3.11 위의 잔류물을 이소프로판올로 녹여 1.0 mL로 한 것을 시험용액 으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	20 μ L
칼럼온도	35°C
이동상	에탄올 : 물 (95 : 5)
검출기 파장	여기파장 340 nm, 측정파장 460 nm
유량	0.5 mL/분

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 비타민 A 함량(IU*/g)} = A \times ((B \times C)/D)$$

A : 시험용액 중 비타민 A의 농도(IU/mL)

B : 시험용액의 전량(mL)

C : 시험용액의 희석배수

D : 시료 채취량(g)

* : 비타민 A의 단위환산 : 1 μg = 3.333 IU

3-2 베타카로틴

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 검화과정을 거쳐 시료로부터 베타카로틴을 추출한 후 액체크로마토 그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 450 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 원심분리기

2.1.2 갈색원심분리관(50 mL)

2.1.3 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.4 갈색부피플라스크(50, 100 mL)

2.1.5 갈색플라스크(100 mL 또는 250 mL)

2.1.6 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.7 용매용 일회용 실린지

2.1.8 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

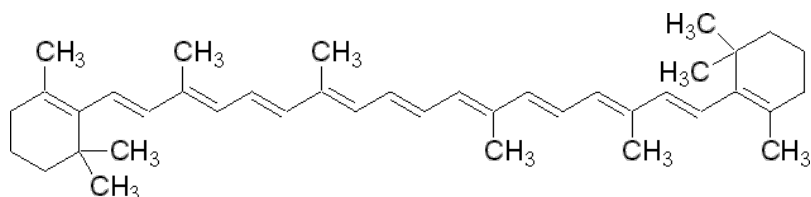
이동상인 아세토니트릴 : 메탄올(85 : 15)과 디클로로메탄을 사용하여 용매를 분당 1.0 mL를 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 베타카로틴(β -carotene)

분자식 : $C_{40}H_{56}$, 분자량 : 536.87, CAS No. : 7235-40-7



3.2 일반시약

- 3.2.1 에탄올(Ethanol)
- 3.2.2 피로갈롤(Pyrogallol)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 초산에틸(Ethyl acetate)
- 3.2.5 헥산(*n*-Hexane)
- 3.2.6 사이클로헥산(Cyclohexane)
- 3.2.7 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 60% 수산화칼륨 용액

수산화칼륨 60 g을 증류수에 녹여 100 mL로 조제한다.

4.1.2 1% 염화나트륨 용액

염화나트륨 1 g을 증류수에 녹여 100 mL로 조제한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 베타카로틴을 20 mg을 정밀히 취하여 100 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 사이클로헥산을 이용하여 완전히 녹인다(200 µg/mL).

4.2.3 에탄올로 적당히 희석하여 표준용액으로 한다(예. 0.5, 1, 2, 4, 8 µg/mL).

4.3 시험용액 제조

4.3.1 베타카로틴 약 100~200 µg에 해당하는 시료를 취하여 갈색 원심 분리관에 넣는다.

4.3.2 3% 피로갈롤 에탄올 용액 10 mL과 60% 수산화칼륨 용액 1 mL을 가하여 70°C 수욕 중에 30분 간 진탕하며 비누화한다.

4.3.3 이를 흐르는 물에 냉각하고 1% 염화나트륨 용액 22.5 mL을 가한 후 헥산·초산에틸(9 : 1) 혼합용액을 15 mL가하여 10분간

진탕한다.

4.3.4 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층을 갈색플라스크로 옮긴다.

4.3.5 하층에 헥산·초산에틸(9 : 1) 15 mL을 가하여 2회 반복 추출하여 상층액을 합한다.

4.3.6 감압농축 후, 에탄올 50 mL에 녹여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
검출기 파장	450 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	A용매 : 아세토니트릴 : 메탄올 (85 : 15), B용매 : 디클로로메탄
용매 조건	A용매(70%), B용매(30%)
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 베타카로틴(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중의 베타카로틴 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 양(mL)

b : 희석배수(적용될 경우)

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-3 비타민 D

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 비타민 D를 에탄올과 피로갈톨에탄올용액을 이용하여 비누화시키고 헥산으로 추출한 후 감압건조시켜 아세토니트릴:메탄올(1:1) 용액으로 녹인 것을 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기(264 nm) 또는 액체크로마토그래프/질량분석기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 용매용 일회용 실린지
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.4 증류플라스크(100 mL)
- 2.1.5 분액깔때기
- 2.1.6 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

- 2.2.1.1 액체크로마토그래프
- 2.2.1.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.1.3 육방전환밸브시스템
- 2.2.1.4 칼럼
 - 2.2.1.4.1 전처리칼럼 : Capcellpak MF C8 SG80(안지름 4.6 mm, 길이 150 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
 - 2.2.1.4.2 농축칼럼 : Capcellpak C₁₈ UG 120V(안지름 2.0 mm, 길이 35 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
 - 2.2.1.4.3 분석칼럼 : Cadenza CD-C₁₈(안지름 1.5 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 3 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량분석기

- 2.2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2.2 질량분석기

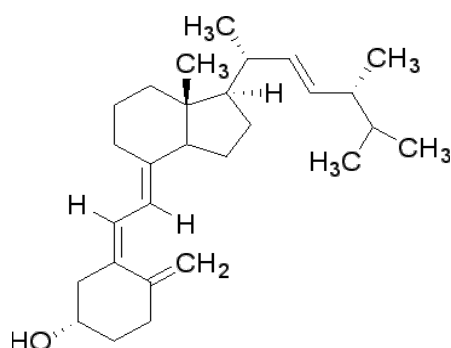
2.2.2.3 칼럼 : ACQUITY UPLC®BEH(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전입자크기 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

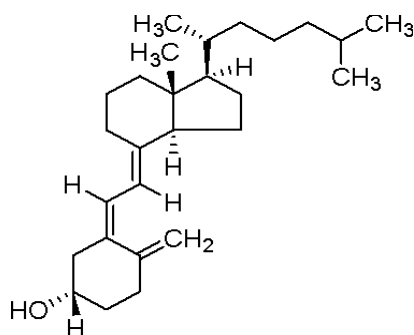
3.1.1 Ergocalciferol(Calciferol; Ercalcinol; Ergocalciferol; Ergosterol irradiated; Irradiated ergosterol; Vitamin D₂)

분자식 : C₂₈H₄₄O, 분자량 : 396.65, CAS No. : 50-14-6



3.1.2 Cholecalciferol((+)-Vitamin D₃; 7-Dehydrocholesterol activated; Calcinol; Activated 7-dehydrocholesterol; Cholecalciferol)

분자식 : C₂₇H₄₄O, 분자량 : 384.64, CAS No. : 67-97-0



3.2 일반시약

- 3.2.1 초산암모늄(Ammonium acetate)
- 3.2.2 증류수
- 3.2.3 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- 3.2.4 헥산(n-Hexane)
- 3.2.5 메탄올(Methanol)
- 3.2.6 피로갈롤(Pyrogallol)
- 3.2.7 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)
- 3.2.8 페놀프탈레인시액(Phenolphthalein solution)

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

- 4.1.1 비타민 D₂ 또는 D₃ 100 mg을 메탄올 100 mL에 녹여 조제하고 (1,000 µg/mL) 메탄올로 적절하게 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액 제조

- 4.2.1 시료가 고체인 경우 초고속마쇄기로 잘게 마쇄한다.
- 4.2.2 0.1~1 g의 검체를 등근바닥 플라스크에 정밀히 취한다.
- 4.2.3 피로갈롤:에탄올(1→10)용액 40 mL를 가하여 약하게 진탕 혼합한다 (고체시료의 경우, 물 3 mL로 충분히 녹인 후 혼합).
- 4.2.4 90% 수산화칼륨 10 mL를 가하고 환류냉각기에 부착하여 수욕중에서 30분간 가열 비누화한다.
- 4.2.5 냉각 후 헥산 50 mL를 가하여 10분간 강하게 진탕 혼합한다. 침전이 생기면 이것이 가라앉을 때까지 방치한다(3회 추출)
- 4.2.6 헥산층을 250 mL 분액깔때기에 옮겨 1 N 수산화칼륨 100 mL를 가하여 15초간 강하게 진탕 혼합한다.
- 4.2.7 이를 방치하여 층분리 한 후(헥산층은 투명하지 않아도 됨) 혼탁한 물층을 버린다.
- 4.2.8 헥산층에 0.5 N 수산화칼륨 40 mL를 넣어 진탕 혼합한 후 물층을 다시 버린다.
- 4.2.9 헥산층에 적어도 4회(매회 15초씩) 물 40 mL로 세척한다. 세척액이 페놀프탈레인시액으로 알칼리반응을 나타내지 않을 때까지 세척한다.

4.2.10 수세한 헥산층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 갈색 플라스크로 옮기고 무수황산나트륨을 헥산 10 mL로 2회 세척한 후 탈수한 헥산용매와 합하고 이를 40°C이하에서 감압 농축한다.

4.2.11 잔류물에 메탄올 5 mL를 가한 후 이를 membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	100 μ L
칼럼온도	35°C
이동상	전처리칼럼 : 80%(v/v) 메탄올 분석칼럼 : 96%(v/v) 메탄올
검출기 파장	264 nm
유량	전처리칼럼 : 300 μ L/분 분석칼럼 : 90 μ L/분

표 2. 액체크로마토그래프/질량분석기 조건(예)

항목	조건
주입량	1 μ L
유량	0.45 mL/분
칼럼온도	40°C
이동상	5 mM 초산암모늄:메탄올(5:95)
이온화	ESI, positive
Monitoring ion	비타민 D ₂ : 397 → 107, 105, 91 비타민 D ₃ : 385 → 107, 105, 79
Capillary Voltage	3.5 kV
Source Temp.	120°C
Desolvation Temp.	350°C

5.2 계산

5.2.1 계산식

$$\text{비타민 D}_2 \text{ 또는 D}_3 \text{ 함량 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times (a \times b) / S \times 100$$

C : 검량곡선에서 얻은 시험용액의 비타민 D 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

※ 비타민 D 함량은 비타민 D₂ 또는 비타민 D₃를 구분하여 계산

$$\text{비타민 D } 1 \mu\text{g} = 40 \text{ IU}$$

3-4 비타민 E

3-4-1 비타민 E(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 비타민 E를 에탄올과 피로갈롤에탄올용액을 이용하여 비누화시키고 석유에테르용액을 이용하여 추출 후 감압건조시켜 에탄올로 녹인 후 염화 제이철에탄올용액과 디피리딜에탄올용액으로 정색반응을 시킨 후 대조액을 에탄올로 하여 분광광도계를 이용하여 파장 520 nm에서 흡광도를 측정한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색등근바닥플라스크(100 mL)

2.1.2 갈색분액깔때기

2.1.3 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

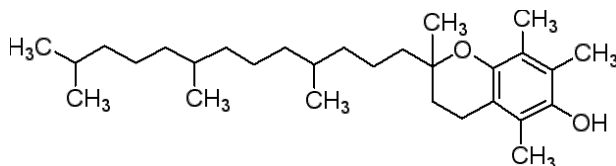
분광광도계의 0점을 맞추기 위해 에탄올을 두개의 셀에 담아 0점을 맞춘다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 α -Tocopherol((\pm)- α -Tocopherol; DL-all-*rac*- α -Tocopherol; Vitamin E)

분자식 : $C_{29}H_{50}O_2$, 분자량 : 430.71, CAS No. : 10191-41-0



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 피로갈롤(Pyrogallol)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

3.2.5 석유에테르(Petroleum ether)

3.2.6 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydride)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 정색용액 : 0.5%, α , α' -디피리딜에탄올용액

4.1.2 염화제이철에탄올용액

염화제이철 0.2 g을 에탄올에 녹여 100 mL로 한다.

4.1.3 석유에테르

석유에테르에 1/10량의 황산을 가하고 황산층이 착색되지 않을 때까지 세척하고 1회 수세한 다음, 순차로 10% NaOH 용액 및 물로 수세한다. 세정한 석유에테르층에 무수황산나트륨을 가하여 탈수한 다음 증류하여 30~60°C에서 유분을 취한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 α -토코페롤 약 20 mg을 정밀히 측정한다.

4.2.2 100 mL 갈색부피플라스크에 취하고 에탄올을 가하여 표선까지 맞춘다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 토코페롤 약 0.5~1 mg에 상당하는 시료를 정밀히 취하여 갈색등근 바닥플라스크에 넣는다.

4.3.2 에탄올 30 mL, 피로갈롤에탄올용액(1→10) 1 mL, 90% 수산화칼륨 용액 3 mL을 넣고 환류냉각기를 부착한 후 95°C 수욕에 갈색등근바닥 플라스크를 2/3 잠기게 하여 30분간 비누화 시킨다.

4.3.3 신속히 냉각하여 물 30 mL을 가하여 200 mL 갈색분액깔때기에 옮긴다.

4.3.4 갈색등근바닥플라스크를 물 10 mL로 씻어 분액깔때기에 합친다.

4.3.5 갈색등근바닥플라스크를 석유에테르 30 mL로 씻은 후

분액깔때기에 합한다.

4.3.6 물층은 석유에테르 30 mL씩 2회 추출한다.

4.3.7 위의 용액을 물 10 mL 1회, 이어 50 mL씩으로 씻는다.
페놀프탈레인 시액으로 정색이 되지 않을 때까지 씻는다.

4.3.8 분액깔때기에서 물층을 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수
황산나트륨에 통과시켜 탈수한 후 갈색등근바닥플라스크에 옮긴다.

4.3.9 황산나트륨을 석유에테르 10 mL씩으로 2회 씻은 후 [4.3.8]의
갈색등근바닥플라스크에 가한다.

4.3.10 석유에테르층을 60°C에서 감압 농축한다.

4.3.11 위의 잔류물을 에탄올 5 mL 녹여 25 mL부피
갈색부피플라스크에 옮긴다. (2회반복)

4.3.12 위의 갈색부피플라스크에 에탄올을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.4 시험조작

4.4.1 시험용액 5 mL과 α-토코페롤용액 1 mL을 25 mL
갈색부피플라스크에 취한다.

4.4.2 각각에 염화제이철에탄올용액 1 mL과 0.5% α, α'-디피리딜에탄올
용액 1 mL을 취한다.

4.4.3 에탄올을 가하여 표선까지 맞춘다.

4.4.4 대조액은 시험용액과 표준용액 대신에 에탄올 1 mL을 취하여 위
방법으로 조작한 것으로 한다.

5. 계산

5.1 계산

5.1.1 총토코페롤 함량(mg/100g) = $A \times (B / C) \times (25 / 5) \times (1/D)$

A : 시험용액 중 토코페롤의 농도(mg/mL)

B : 시험용액의 흡광도

C : 표준용액의 흡광도

D : 시료 채취량(g)

3-4-2 비타민 E(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 일반 식품인 경우 시료 중 비타민 E를 에탄올과 피로갈롤에탄올 용액을 이용하여 비누화시키고 석유에테르용액을 이용하여 추출 후 감압 건조시켜 헥산을 가하여 녹여 형광검출기를 이용하는 방법과 유지식품의 경우 비누화조작을 생략하고 헥산으로 추출한 후 형광검출기를 이용하여 여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm에서 검출하고 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 용매용 일회용 실린지
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.4 갈색등근바닥플라스크(100 mL)
- 2.1.5 갈색분액깔때기
- 2.1.6 감압농축기

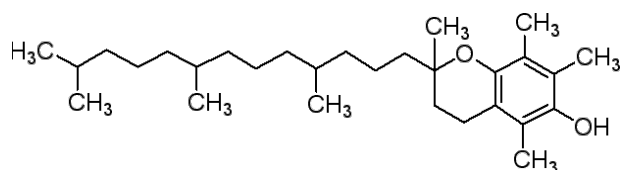
2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 순상형 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Silica gel)
또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 α -Tocopherol((\pm)- α -Tocopherol; DL-all-*rac*- α -Tocopherol; Vitamin E)
분자식 : $C_{29}H_{50}O_2$, 분자량 : 430.71, CAS No. : 10191-41-0



3.2 일반시약

- 3.2.1 에탄올(Ethanol)
- 3.2.2 피로갈롤(Pyrogallol)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- 3.2.5 석유에테르(Petroleum ether)
- 3.2.6 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydride)
- 3.2.7 헥산(n-Hexane)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 에탄올

에탄올 1 L에 50% 수산화나트륨용액 5 mL 및 아연분말 5 g을 가해 약 2시간 환류 후 증류한다.

4.1.2 무수황산나트륨

무수황산나트륨을 120°C에서 2시간 이상 가열시킨 후 데시케이터(실리카겔)에서 방냉하고 밀전하여 보존한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 토코페롤동족체 표준용액

4.2.1.1 토코페롤 동족체(α -, β -, γ -, δ -토코페롤)를 각각 100 mg씩 정밀히 취해 100 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.

4.2.1.2 헥산을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.2.1.3 각각 5 mL씩 취하여 25 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.

4.2.1.4 헥산을 넣어 표선까지 맞춘다. 갈색유리병에 넣어 질소로 치환하여 밀전한 후 냉암소에 보관하면 1개월간 사용할 수 있다.

4.2.2 토클표준용액

4.2.2.1 토클 약 100 mg을 정밀히 취해 100 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.

4.2.2.2 헥산을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.2.2.3 5 mL을 취하여 25 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.

4.2.2.4 헥산을 넣어 표선까지 맞춘다. 갈색유리병에 넣어 질소로 치환하여 밀전한 후 냉암소에 보관하면 1개월간 사용할 수 있다.

4.3 시험용액 제조(일반식품)

4.3.1 토코페롤로서 약 0.2 mg에 상당하는 시료를 정밀히 취하여 갈색 등근바닥플라스크에 넣는다.

4.3.2 에탄올 30 mL, 피로갈롤에탄올용액(1→10) 1 mL, 90% 수산화칼륨 용액 3 mL을 넣고 환류냉각기를 부착한 후 95°C 수욕 중에 갈색등근바닥플라스크를 2/3 잠기게 하여 30분간 비누화 시킨다.

4.3.3 신속히 냉각하여 물 30 mL을 가하여 200 mL 갈색분액깔때기에 옮긴다.

4.3.4 갈색등근바닥플라스크를 물 10 mL로 씻어 분액깔때기에 합친다.

4.3.5 갈색등근바닥플라스크를 석유에테르 30 mL로 씻은 후 분액깔때기에 합한다.

4.3.6 물층은 석유에테르 30 mL씩 2회 추출한다.

4.3.7 위의 용액을 물 10 mL 1회, 이어 50 mL씩으로 씻는다. 페놀프탈레인 시액으로 정색이 되지 않을 때까지 씻는다.

4.3.8 갈색분액깔때기에서 물층을 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수한 후 갈색등근바닥플라스크에 옮긴다.

4.3.9 황산나트륨을 석유에테르 10 mL씩으로 2회 씻은 후 [4.3.8]의 갈색 등근바닥플라스크에 가한다.

4.3.10 석유에테르층을 40~45°C에서 감압 농축한다.

4.3.11 위의 잔류물에 헥산 1 mL을 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

4.4 시험용액 제조(유지식품)

시료가 유지인 경우에는 비누화 조작을 생략하고, 고속액체크로마토 그래프에 직접 주입할 수 있다.

4.4.1 유지 약 1 g을 정밀히 취해 50 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.

4.4.2 hexan을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.4.3 위 용액의 일정량을 취해 hexan으로 희석한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	35°C
이동상	hexan : 이소프로판올(98 : 2)
검출기 파장	여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm
유량	0.5 mL/분

※ 정량시험을 위해 시험용액 1.0 mL에 토크표준용액 1.0 mL를 가해(S) 이 용액의 10 μ L를 분석한다. 또한 토크페롤동족체 각각에 대하여 각각 토크페롤 표준용액 1.0 mL를 취해 이에 토크표준용액 1.0 mL를 가해 이 용액의 10 μ L를 분석한다.
S : 시험용액에 함유된 토크의 함량(mg)

5.2 계산

5.2.1. 일반식품

$$\text{토크페롤동족체의 양(mg/100g)} = S \times (P_{\text{toc}} / P_{\text{int}}) \times F \times (100 / W)$$

S : 시험용액에 함유된 토크의 함량(mg)

$$S = V \times C$$

V : 시료에 첨가된 토크표준용액의 양(mL)

C : 시료에 첨가한 토크표준용액의 농도(mg/mL)

P_{toc} : 시험용액 중 토크페롤동족체 피크의 넓이 또는 높이

P_{int} : 시험용액 중 토크 피크의 넓이 또는 높이

W : 시료 채취량(g)

F : 환산계수

$$F_{\alpha-\delta} = (C_{\text{st-toc}} / C_{\text{st-int}}) \times (P_{\text{st-int}} / P_{\text{st-toc}})$$

C_{st-toc} : 표준용액 토크페롤 동족체의 농도

C_{st-int} : 표준용액 토크의 농도

P_{st-int} : 표준용액 토콜의 피크의 높이 또는 넓이

P_{st-toc} : 표준용액 토코페롤동족체 피크의 높이 또는 넓이

5.2.2. 유지식품

토코페롤동족체의 양(mg/100g) = $S \times (50 / D) \times (P_{\text{toc}} / P_{\text{int}}) \times F \times (100 / W)$

S : 시험용액에 함유된 토콜의 함량(mg)

$S = V \times C$

V : 시료에 첨가된 토콜표준용액의 양(mL)

C : 시료에 첨가한 토콜표준용액의 농도(mg/mL)

D : 시험용액 취한 양(mL)

P_{toc} : 시험용액 중 토코페롤동족체 피크의 넓이 또는 높이

P_{int} : 시험용액 중 토콜 피크의 넓이 또는 높이

W : 시료 채취량(g)

F : 환산계수

$F_{\alpha-\delta} = (C_{\text{st-toc}} / C_{\text{st-int}}) \times (P_{\text{st-int}} / P_{\text{st-toc}})$

$C_{\text{st-toc}}$: 표준용액 토코페롤 동족체의 농도

$C_{\text{st-int}}$: 표준용액 토콜의 농도

$P_{\text{st-int}}$: 표준용액 토콜의 피크의 넓이 또는 높이

$P_{\text{st-toc}}$: 표준용액 토코페롤동족체 피크의 넓이 또는 높이

3-4-2 비타민 E(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 일반 식품인 경우 시료 중 비타민 E를 수산화칼륨용액과 피로갈롤·에탄올용액을 이용하여 비누화시키고 헥산/초산에틸(9:1)혼합용액 으로 추출 후 감압 건조시켜 헥산을 가하여 녹여 형광검출기를 이용하는 방법과 유지식품의 경우 비누화조작을 생략하고 헥산으로 추출한 후 형광 검출기를 이용하여 여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm에서 검출하고 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 용매용 일회용 실린지
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.4 갈색등근바닥플라스크(100 mL)
- 2.1.5 갈색부피플라스크(25, 100 mL)
- 2.1.6 원심분리기
- 2.1.7 갈색원심분리관(50 mL)
- 2.1.8 감압농축기

2.2 분석장비

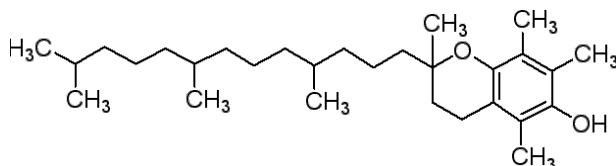
- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 순상형 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 NH₂) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 α -Tocopherol((\pm)- α -Tocopherol; DL-all-*rac*- α -Tocopherol; Vitamin E)

분자식 : $C_{29}H_{50}O_2$, 분자량 : 430.71, CAS No. : 10191-41-0



3.2 일반시약

- 3.2.1 에탄올(Ethanol)
- 3.2.2 피로갈롤(Pyrogallol)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- 3.2.5 초산에틸(Ethyl acetate)
- 3.2.6 헥산(n-Hexane)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

- 4.1.1 60% 수산화칼륨 용액
수산화칼륨 60 g을 증류수에 녹여 100 mL로 조제한다.
- 4.1.2 1% 염화나트륨 용액
염화나트륨 1 g을 증류수에 녹여 100 mL로 조제한다.

4.2 표준용액 제조

- 4.2.1 토크페롤동족체 표준용액
- 4.2.1.1 표준원액 : 토크페롤 동족체(α -, β -, γ -, δ -토크페롤)을 각각 50 mg씩 정밀히 취해 50 mL 갈색부피플라스크에 넣고 헥산으로 표선까지 채워 조제한다.
- 4.2.1.2 표준용액 : 각각 토크페롤 동족체 표준원액 5 mL씩 취하여 50 mL 갈색부피플라스크에 넣고 헥산으로 표선까지 채워 조제한 후 갈색유리병에 넣어 질소로 치환하여 밀전한 후 냉암소에 보관한다.
- 4.2.1.3 검량곡선표준용액 : 각각 표준원액을 적당량 취하여 갈색부피플라스크에 넣고 헥산으로 희석하여 1~10 ug/mL이 되도록 조제한다. 보관 시에는 질소로 치환하여 밀전한 후 냉암소에 보관한다.

4.3 시험용액 제조(일반식품)

- 4.3.1 토코페롤로서 약 0.2 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취하여 갈색 원심분리관에 넣는다.
- 4.3.2 1% 염화나트륨 용액 0.5 mL을 넣고 3% 피로갈롤 에탄올 용액 10 mL과 60% 수산화칼륨 용액 1 mL을 가하여 70℃ 수욕 중에 30분간 진탕하며 비누화한다.
- 4.3.3 이를 흐르는 물에 냉각하고 1% 염화나트륨 용액 22.5 mL을 가한 후 헥산·초산에틸(9 : 1) 혼합용액을 15 mL가하여 10분간 진탕한다.
- 4.3.4 1,600 × g에서 5분간 원심분리하여 상층을 갈색등근바닥플라스크로 옮긴다.
- 4.3.5 하층에 헥산·초산에틸(9 : 1) 15 mL을 가하여 2회 반복 추출하여 상층액을 합한다.
- 4.3.6 회수한 상층액을 감압 농축한다.
- 4.3.7 위의 잔류물에 일정량의 헥산을 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

4.4 시험용액 제조(유지식품)

시료가 유지인 경우에는 비누화 조작을 생략하고, 고속액체크로마토 그래프에 직접 주입할 수 있다.

- 4.4.1 유지 약 1 g을 정밀히 취해 50 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.
- 4.4.2 헥산을 넣어 표선까지 맞춘다.
- 4.4.3 위 용액의 일정량을 취해 헥산으로 희석한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 µL
칼럼온도	35°C
이동상	헥산 : 초산에틸(80 : 20)
검출기 파장	여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm
유량	1.0 mL/분

5.2 계산

$$\alpha, \beta, \gamma, \delta\text{-토코페롤의 함량(mg/100 g)} = C \times \frac{(a \times b)}{S} \times \frac{100}{1,000}$$

C : 시험용액 중의 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -토코페롤의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-5 비타민 K

3-5-1 비타민 K₁(제1법) <삭제>

3-5-2 비타민 K₁(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 지방을 효소적으로 분해하여 지방산으로 침전시킨 후
핵산으로 비타민 K₁을 추출하여 역상칼럼으로 분리하고 포스트 칼럼으로
환원시켜 형광을 이용하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 용매용 일회용 실린지
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.4 갈색부피플라스크(50 mL, 100 mL)
- 2.1.5 원심분리관
- 2.1.6 원심분리기
- 2.1.7 질소농축기
- 2.1.8 항온수조진탕기

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)
- 2.2.3 칼럼
 - 2.2.3.1 분석칼럼 : 옥타데실실릴화한 칼럼으로 carbon loading량이
10% 이상인 것(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Silica
gel) 또는 이와 동등한 것
 - 2.2.3.2 포스트 칼럼 : 안지름 4.0 mm, 길이 20 mm 또는 이와 동등한
것 혹은 내경 2.0~4.0 mm 및 길이 30~50 mm의
액체크로마토그래피 칼럼관에 아연분말을 채워 제작한 것으로

분석 칼럼과 형광검출기 사이에 장착한다.

- ※ 포스트 칼럼 제작 시 빈 공간이 생기지 않도록 주의하여
아연분말을 채우고 장착하기 전 30분간 이동상을 약 1
mL/min의 유속으로 흘려 평형이 이루어지는지 확인하고 장착
후 30~60분 이상 시스템을 안정화하여 분석한다.

2.3 분석 장비의 준비

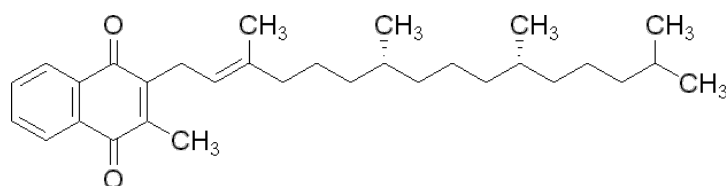
이동상 용매를 분당 0.8 mL씩 흘려줌으로써 기기와 칼럼을 안정화
시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Vitamin K₁ (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone; 3-Phytylmenadione;
Phylloquinone; Vitamin K₁)

분자식 : C₃₁H₄₆O₂, 분자량 : 450.70, CAS No. : 84-80-0



3.2 일반시약

- 3.2.1 증류수(Distilled water)
- 3.2.2 리파아제(Lipase)
- 3.2.3 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- 3.2.4 인산이수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate)
- 3.2.5 에탄올(Ethanol)
- 3.2.6 메탄올(Methanol)
- 3.2.7 헥산(Hexane)
- 3.2.8 디클로로메탄(Dichloromethane)
- 3.2.9 이소프로판올(Isopropanol)
- 3.2.10 염화아연(Zinc chloride)
- 3.2.11 무수초산나트륨(Sodium acetate)
- 3.2.12 무수탄산칼륨(Potassium carbonate)

3.2.13 초산(Acetic acid)

3.2.14 아연분말(Zinc powder)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 증류수

3차 증류수로 18 MΩ 이상인 것

4.1.2 Lipase

Candida rugosa 를 기원으로 하는 것으로서 약 1,000 unit/mg (Type VII)의 활성이 있는 것 또는 동등한 효소 활성을 가진 것으로서 *Pseudomonas* 와 *Rhizopus* 를 기원으로 하는 것

4.1.3 40% 수산화칼륨용액

40 g KOH를 증류수로 녹여 100 mL로 하여 조제한다.

4.1.4 0.8 M 인산완충용액

54.0 g KH_2PO_4 를 물 350 mL에 녹여 40% 수산화칼륨용액으로 pH를 7.9~8.0으로 조정하여 증류수로 희석하여 500 mL로 하여 조제한다.

4.1.5 알콜혼합용매

에탄올과 메탄올을 95 : 5의 부피비로 혼합하여 조제한다.

4.1.6 아연분말

입자 60 μm 이하인 것 또는 이와 동등한 것으로 개봉 후 즉시 사용한다.

4.1.7 이동상

메탄올 900 mL에 디클로메탄 100 mL을 혼합한 용매에 염화아연 1.37 g과 무수초산나트륨 0.41 g 및 초산 0.30 g을 메탄올 5 mL에 녹여 첨가하고 0.45 μm 여지로 여과하고 탈기하여 조제한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 비타민 K_1 표준물질 100 mg을 100 mL 이소프로판올에 녹인 후 표준원액으로 한다.

4.2.2 위의 용액을 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.3 시험용액 제조

※ 시험용액 조제시 직접적인 태양광에 노출되지 않도록 실험을 진행한다.

4.3.1 고체 시료는 약 1 g, 액체시료는 약 10 g을 시험관에 정밀하게 취한다.

4.3.2 40°C 이하의 증류수 15 mL을 가한 후 혼합한다(액체시료의 경우 미지근한 물 5 mL를 첨가한다).

4.3.3 인산완충용액 5 mL을 첨가하여 혼합한다.

4.3.4 위의 용액에 1 g의 lipase 분말을 넣고 혼합한다.

4.3.5 시험관 마개를 막고 고르게 균질화 될 수 있도록 30~60초간 진탕한다.

4.3.6 위의 용액을 37±2°C에서 20분 간격으로 15초간 진탕하며 총 2시간 분해한다.

4.3.7 분해 후 수욕상에서 냉각한다.

4.3.8 위의 용액에 10 mL 알콜혼합용액을 가한 후 혼합한다.

4.3.9 위의 용액에 1.0 g의 무수탄산칼륨을 첨가하여 혼합한다.

4.3.10 분해가 완료된 시험관에 30 mL 헥산을 첨가하여 마개를 막고 10분간 격렬히 진탕한다(냉암소에 보관하여 층이 분리되도록 하며, 층분리가 잘 되지 않을 때에는 약 1,000 rpm(200 G)로 10분간 원심분리 함).

4.3.11 헥산 상층액을 시료의 특성에 따라 1~5 mL 취하여 바이얼로 옮기고 질소 농축한다.

4.3.12 농축 후 메탄올 1 mL으로 용해하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	30°C
이동상	Methanol : Dichloromethane (900 : 100)에 ZnCl ₂ 1.37 g, CH ₃ COONa 0.41 g, Glacial acetic acid 0.3 g / Methanol 5 mL를 합하여 이동상으로 함
검출기 파장	여기파장 243 nm, 측정파장 430 nm
유량	0.8 mL/분

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 비타민 K}_1 \text{ 함량}(\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times \frac{30}{V} \times \frac{1}{S} \times \frac{100}{1000}$$

C : 시험용액의 농도(μ g/L)

V : 시료특성에 따라 취한 핵산의 부피(mL)

S : 시료 채취량(g)

3-5-3 비타민 K₂(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 디메틸설폭사이드와 에탄올을 이용하여 시료 중 비타민 K₂를 추출하고 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색부피플라스크(50 mL)

2.1.2 갈색원심분리 튜브

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터

2.1.5 초음파 진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

2.2.3 칼럼오븐

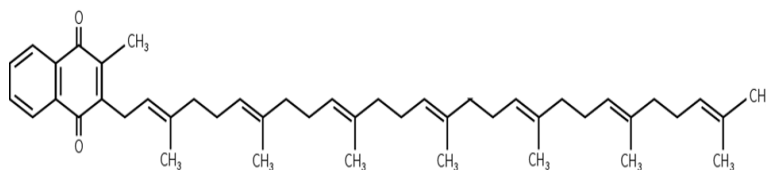
2.2.4 C₃₀ 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 trans MK-7 (Menaquinone-7)

분자식 : C₄₆H₆₄NO₂, 분자량 : 649.0, CAS No. : 2124-57-4



3.2 일반시약

- 3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- 3.2.2 에탄올(Ethanol, HPLC grade)
- 3.2.3 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)
- 3.2.4 디메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide)
- 3.2.5 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 표준물질 25 mg을 정밀히 칭량하여 50 mL 갈색부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.2 테트라하이드로퓨란 1 mL을 첨가하고 에탄올로 정용한다.
- 4.1.3 위의 표준원액을 에탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

- 4.2.1 시료 0.25 ~ 2 g을 정밀하게 취하여 칭량한다.
- 4.2.2 디메틸설폭사이드 10 mL 넣고 용해 후 70°C에서 5분간 초음파 추출한다.
- 4.2.3 에탄올 20 mL을 첨가한 후 70°C에서 15분간 초음파 추출한다. (5분 간격으로 교반한다.)
- 4.2.4 위의 시험용액을 원심분리(7,800 rpm, 2분)하고 상등액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과 후 에탄올로 적당량 희석하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기 파장	268 nm
칼럼 온도	25°C
이동상	증류수:에탄올:메탄올:테트라하이드로퓨란 (1:15:80:10, v/v)
유속	0.8 mL/분

5.2 계산

5.2.1 비타민 K₂(MK-7)함량(μ g/100g) = $C \times (a \times b) / S \times 100$

C : 시험용액 중의 trans MK-7의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-6 비타민 B₁

3-6-1 비타민 B₁(제1법)

1. 시험방법의 요약

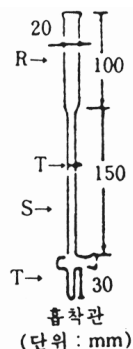
본 시험법은 시료 중 비타민 B₁을 황산이나 염산으로 추출하여 다카디아스타제로 효소분해를 하고 칼럼관을 통하여 정제 한 용액을 페리시안에 의한 산화 및 티오크롬의 추출방법이나 브롬시안에 의한 산화 및 티오크롬의 추출 방법을 사용하여 비타민 B₁의 함량을 구한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 칼럼관

경질 유리제 흡착관의 S부의 밑에 소량의 유리솜을 채워 넣어 물을 가득 넣고 별도로 퍼무티트 1.3~1.5 g을 비커에 취한다. 물 약 20 mL를 가해 약하게 진탕해서 퍼무티트에 부착하고 있는 기포를 제거한 다음 물과 함께 전부를 흡착관에 유입, 계속해서 3% 초산 10 mL 및 물 20 mL를 각각 1분간에 1 mL의 유속으로 통해서 조절을 해 놓는다.



2.1.2 원심분리기

2.1.3 메스플라스크(100 mL)

2.1.4 원심분리관(50 mL)

2.1.5 시험관(50 mL)

2.1.6 추출병

50~150 mL까지 10 mL마다 표선을 그려놓은 것이 쓰기에 편리하다.

2.2 분석장비

2.2.1 형광광도계

분광식의 여기파장을 375 nm, 수광부의 형광선택파장을 420

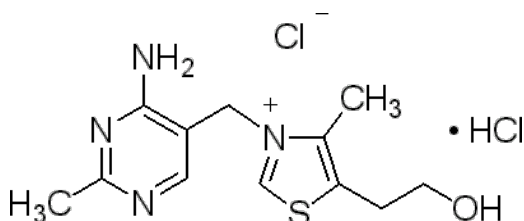
nm에 조정해 쓴다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Thiamine hydrochloride(Aneurine hydrochloride; Vitamin B₁ hydrochloride)

분자식 : C₁₂H₁₇ClN₄OS·HCl, 분자량 : 337.27, CAS No. : 67-03-8



3.2 일반시약

3.2.1 염산(Hydrochloric acid)

3.2.2 염화칼륨(Potassium chloride)

3.2.3 초산(Acetic acid)

3.2.4 질산은(Silver nitrate)

3.2.5 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.6 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydride, 형광이 없는 것)

3.2.7 이소부탄올(Isobutanol, 형광이 없는 것)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 효소용액

사용 시 다카디아스타제 0.5 g에 0.1 N 염산 0.5 mL 및 물 10 mL를 가하여 용해한 후 여기에다 산성백토 0.2 g을 첨가하여 30초간 진탕 혼합하여 이것을 여과 또는 원심분리해서 그 상등액을 사용한다.

4.1.2 25% 염화칼륨 염산용액

0.1 N 염산에 염화칼륨을 25%의 비율로 녹인다. 결정이 석출하면 가온하여 완전히 녹여 사용한다.

4.1.3 퍼무티트

50~80 메쉬의 퍼무티트를 플라스크에 취해 약 4배의 열탕을 가해서 혼합, 정치한다. 상등액을 경사하여 버린다. 이 조작을 수 회 반복 하여 상등액이 거의 깨끗해질 때까지 행한다. 다음에 3%의 초산 약 4배량으로 전과 동일하게 2회 씻는다. 다시 25% 염화칼륨 염산 용액을 약 3배량 가해서 비등 수욕 중 약 25분간 저어주면서 처리한다. 또 다시 3% 초산으로 2회 씻어내고 수세의 조작을 반복한다. 이 세액에 5% 질산은용액 2~3방울을 가해서 백탁되지 않을 때까지 행한다. 이것을 약 60°C에서 건조해서 보존한다. 다만, 퍼무티트 외에 엠버라이트 IRC 50을 사용할 수 있다.

4.1.4 페리시안·수산화나트륨용액(제1법)

1% 페리시안용액 4 mL를 15% 수산화나트륨으로 녹여 100 mL로 한다. 사용 전 4시간 이내에 제조한다.

4.1.5 브롬시안용액(제2법)

특급의 브롬시안 4% 용액, 본액을 냉장고에 보존하여 그날 사용한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 Thiamine hydrochloride를 염산산성의 물에 녹여 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 한다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 시료 1~10 g을 정밀히 취하여 추출병 또는 100 mL 메스플라스크에 넣는다.

4.3.2 증류수 약 20 mL을 가하여 혼한 후 0.1 N 염산 또는 0.1 N 황산 약 50 mL을 가하여 잘 섞은 후 끓는 수욕 상에서 30분간 가열 추출한다.

4.3.3 추출액은 약 50°C에 냉각시키고 4 M 초산나트륨액을 적가해 pH를 약 4.5로 조정한다.

4.3.4 효소용액 2 mL을 가하여 40~50°C에 2~3시간 보온하거나 또는 톨루엔 5~6방울을 가해 37~40°C의 항온기에 넣어서 하룻밤을 방치한다.

4.3.5 15분간 비등수욕에서 온침한 후 냉각하여 물을 가한 후 100 mL로 하고 원심분리 또는 여과하여 상등액을 취한 것을 시료용액으로 한다.

- 4.3.6 시료용액(pH 4.5)의 일정량(비타민B₁으로서 약 5 µg 함유)을 칼럼에 조심스럽게 주입하여 1 mL/분의 유속으로 흡착시킨다.
- 4.3.7 pH 4.5의 염산 5 mL로 칼럼 R부 내면을 씻어낸다.
- 4.3.8 흡착이 끝났다고 판단되면 공존되는 형광물질을 제거하기 위해 끓는 물을 칼럼에 주입하여 3~4 mL/분의 유속으로 흡착층을 씻는다. 세액을 형광이 나타나지 않을 때까지 물로 계속 씻어준다.
- 4.3.9 칼럼이 따뜻할 동안에 비등 25% 염화칼륨염산용액 10 mL을 가하여 1초에 1방울의 속도로 25 mL 부피플라스크에 용출시킨다.
- 4.3.10 탈착액을 받아서 용출액이 퍼무티드 상단까지 달하면 다시 25% 염화칼륨염산용액을 재차 주입하여 25 mL로 한다.
- 4.3.11 냉각 후 물을 가하여 정확히 25 mL 표선에 맞춘다.
- 4.4 시험조작(페리시안에 의한 산화 및 티오크롬의 추출)
- 4.4.1 시험용액 5 mL씩 T1, T2, T3 3개의 50 mL 원심분리관에 나누어 취한다.
- (※ T1 : 첨가시험용, T2 : 주시험용, T3 : 공시험용)
- 4.4.2 T1에는 표준용액 1 mL, T2, T3에는 물 1 mL을 가한다.
- 4.4.3 T1, T2에 페리시안·수산화나트륨용액 3 mL, T3에는 30% 수산화나트륨 용액 3 mL을 가한 후 혼합한다.
- 4.4.4 T1, T2, T3에 이소부탄올 15 mL을 가하여 1분간 격렬히 진탕 혼합한다.
- 4.4.5 T1, T2, T3를 원심분리하여 상등액의 이소부탄올을 별도의 시험관에 취한다.
- 4.4.6 계속해서 무수황산나트륨 1~2 g을 소량씩 첨가하여 진탕 혼합 후 정치해서 깨끗한 이소부탄올을 얻는다.
- 4.5 시험조작(브롬시안에 의한 산화 및 티오크롬의 추출)
- 4.5.1 시험용액 5 mL씩 T1, T2, T3 3개의 50 mL 원심분리관에 나누어 취한다.
- 4.5.2 T1에는 표준용액 1 mL, T2, T3에는 물 1 mL을 가한다.
- 4.5.3 T1, T2에 브롬시안용액 3 mL, T3에는 30%수산화나트륨용액 3 mL을 가한 후 혼합한다.
- 4.5.4 T1, T2, T3에 이소부탄올 15 mL을 가하여 1분간 격렬히 진탕 혼합한다.

4.5.5 T1, T2, T3를 원심분리하여 상등액의 이소부탄올을 별도의 시험관에 취한다.

4.5.6 계속해서 무수황산나트륨 1~2 g을 소량씩 첨가하여 진탕 혼합 후 정치해서 깨끗한 이소부탄올을 얻는다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

전향의 이소부탄올액을 형광셀에 넣어 형광도를 측정한다.

5.2 계산

5.2.1 비타민 B₁ 함량(mg/100 g)

$$= D \times \frac{T_2 - T_3}{T_1 - T_2} \times \frac{25}{5} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1000}$$

D : 첨가 비타민 B₁(μg)

V₁ : 시료용액의 채취량(mL)

V₂ : 시료용액 전량(mL)

3-6-2 비타민 B₁(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 비타민 B₁을 삼염화초산용액으로 균질화 시킨 후 원심분리를 하여 상등액 채취하여 다카디아스타제 용액으로 효소분해를 한 용액을 옥타데실실릴화한 칼럼을 이용하여 비타민 B₁을 분리하는 방법으로 페리시안과 반응하여 티오크롬으로 환원된 비타민 B₁을 형광검출기를 이용하여 여기파장인 375 nm와 측정파장 450 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 원심분리기

2.1.2 부피플라스크

2.1.3 원심분리관(50 mL, 15 mL)

2.1.4 시험관(15 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)

2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Octadecylsilica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

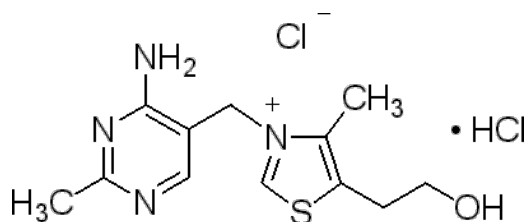
이동상을 분당 0.7 mL씩 흘려줌으로써 기기와 칼럼을 안정화시키고 분석 시 분리된 비타민 B₁이 페리시안·수산화나트륨용액과 반응할 수 있도록 장치하여 0.7 mL로 흘려준다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Thiamine hydrochloride(Aneurine hydrochloride; Vitamin B₁ hydrochloride)

분자식 : C₁₂H₁₇ClN₄OS·HCl, 분자량 : 337.27, CAS No. : 67-03-8



3.2 일반시약

- 3.2.1 초산나트륨(Sodium acetate)
- 3.2.2 다카디아스타제(Takadiastase)
- 3.2.3 삼염화초산(Trichloroacetic acid)
- 3.2.4 제1인산나트륨(Sodium phosphate, monobasic)
- 3.2.5 페리시안화칼륨(Potassium ferricyanide)
- 3.2.6 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

4. 시험과정

4.1 시약 조제

4.1.1 4 M 초산나트륨용액

16.4 g의 초산나트륨을 물에 녹여 50 mL로 한다.

4.1.2 효소용액

다카디아스타제를 물에 녹여 2%로 하고 원심분리한 후 상층액을 사용한다.

4.1.3 10% 삼염화초산 용액

4.1.4 0.1 M 제1인산나트륨수용액 11.9 g의 제1인산나트륨을 물에 녹여 1 L로 한다.

4.1.5 0.01% 페리시안화칼륨· 15%(w/v)수산화나트륨용액

수산화나트륨 150 g을 물에 녹여 1 L로 하고 이에 페리시안화칼륨 (Potassium ferricyanide, $K_3[Fe(CN)_6]$) 100 mg을 녹인다. 사용 시 조제한다.

4.2 표준용액 조제

- 4.2.1 Thiamine hydrochloride를 비타민 B1으로서 100 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 10% 삼염화초산용액에 녹여 표준원액을 만든다. 표준원액을 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 희석한다.

- 4.2.2 4.2.1 용액, 4 M 초산나트륨용액, 2% 다카디아스타제용액을 20 : 3 : 1의 비율로 혼합한 용액을 표준용액으로 한다.
- 4.3 시험용액 조제(일반 시료)
- 4.3.1 시료 1 g(액상의 경우 5 g)을 정밀히 취하여 15 mL 원심분리관에 넣는다.
- 4.3.2 10% 삼염화초산용액 5 mL를 넣고 2분간 균질화 시킨 후 다시 10% 삼염화초산용액을 넣어 10 mL로 한다.
- 4.3.3 $2,000 \times g$ 이상에서 30분간 원심분리 한다.
- 4.3.4 이 상층액 1 mL에 10% 삼염화초산용액을 넣어 100 mL로 정용한 후 적정 농도로 희석한다.
- 4.3.5 4.3.4 용액, 4 M 초산나트륨용액, 2% 다카디아스타제용액을 각각 20 : 3 : 1의 비율로 혼합한다.
- 4.3.6 1시간 초음파 추출한 후 상등액을 취하여 0.45 μm 의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용한다.
- 4.4 시험용액 조제(난용성 비타민 B₁ 염류 및 비타민 B₁ 유도체 강화시료)
- 4.4.1 시험용액 5 mL씩 T1, T2, T3 3개의 50 mL 원심분리관에 나누어 취한다.
(※ T1 : 첨가시험용 , T2 : 주시험용 , T3 : 공시험용)
- 4.4.2 T1에는 표준용액 1 mL, T2, T3에는 물 1 mL을 가한다.
- 4.4.3 T1, T2에 브롬시안용액 3 mL, T3에는 30%수산화나트륨용액 3 mL을 가한 후 혼합한다.
- 4.4.4 T1, T2, T3에 이소부탄올 15 mL을 가하여 1분간 격렬히 진탕 혼합한다.
- 4.4.5 T1, T2, T3를 원심분리하여 상등액의 이소부탄올을 별도의 시험관에 취한다.
- 4.4.6 계속해서 무수황산나트륨 1~2 g을 소량씩 첨가하여 진탕 혼합 후 정치해서 깨끗한 이소부탄올을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	40°C
이동상	0.1 M 제1인산나트륨 수용액
검출기 파장	여기파장 : 375 nm, 측정파장 : 450 nm
유량	0.7 mL/분
반응액※	0.01%페리시안화칼륨·15%(w/v)수산화나트륨용액 (유속 : 0.7 mL/분)

※ 반응액은 컬럼 통과 후 이동상 Line과 T자관으로 연결하고 티오크롬 환원을 위해 반응코일(규격 : 0.8 mm I.D \times 1 m)을 컬럼오븐에 장치한다. 이때 반응액의 역류 방지를 위해 반응액 펌프에 0.25 mm I.D의 코일을 5~10 m 길이가 되도록 설치하여 사용한다.

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 비타민 B}_1 \text{의 함량(mg/100g)} = C \times \frac{(a \times b)}{S} \times \frac{100}{1,000}$$

C : 시험용액 중의 비타민 B₁의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-7 비타민 B₂

3-7-1 비타민 B₂(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 비타민 B₂를 물로 추출하여 광분해를 하고 이것을 산화 및 추출하는 방법이 있다. 또한 처음 시료를 물로 추출하는 대신 3-6-1 비타민 B₁(제1법)의 4.3 시험용액의 제조 중 4.3.1~4.3.5 까지의 시험용액을 그대로 사용할 수 있다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 광분해장치

2.1.2 막자사발

2.1.3 균질기

2.1.4 부피플라스크(100 mL)

2.1.5 원심분리기

2.1.6 원심분리관(50 mL)

2.1.7 시험관(15 mL)

(사용되는 초자는 갈색의 유리기구를 사용한다.)

2.2 분석장비

2.2.1 형광광도계

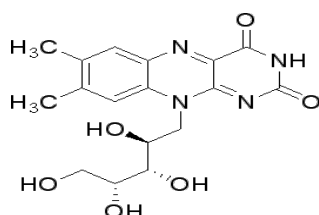
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Riboflavin

Riboflavin(Lactoflavin; Vitamin B₂; Vitamin G)

분자식 : C₁₇H₂₀N₄O₆, 분자량 : 376.36, CAS No. : 83-88-5



3.2 일반시약

- 3.2.1 클로로포름(Chloroform)
- 3.2.2 증류수(Distilled water)
- 3.2.3 수산화나트륨(Sodium hydroxide)
- 3.2.4 초산(Acetic acid)
- 3.2.5 과망간산칼륨(Potassium permanganate)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 클로로포름

형광이 없는 것, 형광이 있는 것은 유리제의 증류장치를 써서 재증류 한다. 갈색병에 넣어 물을 포화시켜 냉암소에 보존한다.

4.2 표준용액 제조

- 4.2.1 Riboflavin을 4 mg을 정밀히 취한다
- 4.2.2 100 mL 부피플라스크에 물을 넣는다.
- 4.2.3 초산 수 방울을 가하여 표선에 맞춘다.
- 4.2.4 사용 시에는 물로 희석을 하여 사용한다.(또한, 밝은 곳에 내놓지 않도록 주의한다.)

4.3 시험용액 제조

- 4.3.1 시료 일정량을 취해 소량의 물을 가해서 균질기나 막자사발에 넣어 마쇄한다. 지방이 많은 것은 미리 탈지과정을 거쳐 사용한다.
- 4.3.2 물 수 mL~수십 mL을 가해 수욕 중에서 15~20분간 추출한다.
- 4.3.3 위의 용액을 비타민 B₂가 0.2~1 µg함유하게 희석한다.
- 4.3.4 T1, T2, T3 시험관중 T1에 시험용액을 가하고 나머지 두개의 시험관에는 물을 가하여 세 개의 시험관이 동량이 되게 한다.
- 4.3.5 이 시험관에 1 N 수산화나트륨액 같은 양을 가해 혼합한다.
- 4.3.6 광분해가 끝나면 세 개의 시험관에 초산 0.5 mL씩 가한다.

4.3.7 세 개의 시험관에 4% 과망간산칼륨용액 0.5 mL을 가해서 1분간 방치한다. 필요하면 초산을 소량 가한다.

4.3.8 계속해서 3% 과산화수소용액을 적가해 탈색하고 클로로포름 10 mL을 가하여 2분간 진탕 혼합한다.

4.3.9 원심분리 후 클로로포름층을 분취한다.

5. 분석 및 계산

5.1 측정

클로로포름층을 측정셀에 옮기고 T1(첨가시험), T2(주시험), T3(공시험)의 형광광도를 읽어 T1, T2, T3로 한다. 시료 중의 비타민 B₂의 함량을 다음 식에 따라 구한다.

5.2 계산

5.2.1 비타민 B₂ 함량(mg/100g)

$$= D \times \frac{T_2 - T_3}{T_1 - T_2} \times \frac{25}{5} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1000}$$

D : 첨가 비타민 B₁(μ g)

V₁ : 시료용액의 채취량(mL)

V₂ : 시료용액 전량(mL)

3-7-2 비타민 B₂(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료에 증류수를 가하여 70~80℃ 수욕 상에서 비타민 B₂를 충분히 추출한 후 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법으로 형광검출기를 이용하여 표준물질과 시료의 면적을 비교함으로써 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 갈색공전병
- 2.1.2 균질기 또는 막자사발
- 2.1.3 항온수조
- 2.1.4 용매용 일회용 실린지
- 2.1.5 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

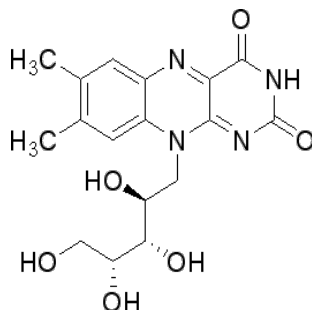
- 2.2.1 액체크로마토그래프
- 2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica, 충전입자크기 5 µm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

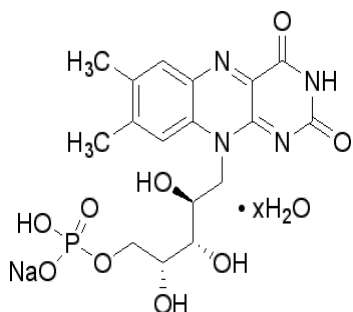
3.1.1 리보플라빈(Riboflavin)

분자식 : C₁₇H₂₀N₄O₆, 분자량 : 376.36, CAS No. : 83-88-5



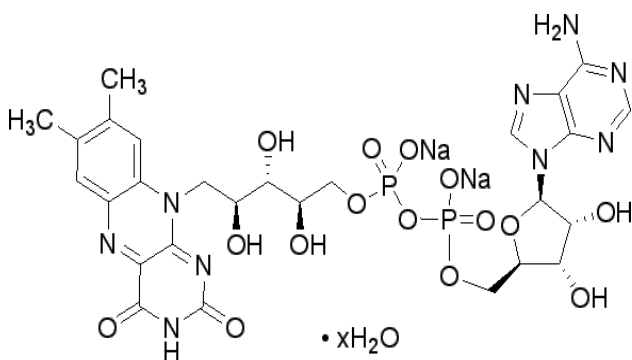
3.1.2 FMN(Flavin mononucleotide)

분자식 : $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P \cdot 2H_2O$, 분자량 : 514.36, CAS No. : 6184-17-4 또는 분자식 : $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$, 분자량 : 478.33 (anhydrous basis), CAS No. : 130-40-5



3.1.3 FAD(Flavin adenine dinucleotide)

분자식 : $C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2 \cdot xH_2O$, 분자량 : 829.51(anhydrous basis), CAS No. : 84366-81-4



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 NaH_2PO_4 (Monosodium phosphate)

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

4.1.1 리보플라빈

4.1.1.1 리보플라빈 4 mg을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.1.2 증류수를 가하여 온탕에서 완전히 녹인다(40 µg/mL).

4.1.1.3 초산 수방울을 가해서 갈색 공전병에 넣어 냉장고에 보존한다.

4.1.1.4 사용 시 증류수로 희석하여 0.2 µg/mL의 용액으로 만든다.

4.1.2 FMN

4.1.2.1 증류수에 녹여 0.2 µg/mL(리보플라빈으로 환산, $\times 0.7868^*$ 또는 $\times 0.7317^{**}$)의 용액을 만든다.

* 376.36(리보플라빈 분자량)/478.33(FMN 무수물 분자량)

** 376.36(리보플라빈 분자량)/514.36(FMN 이수화물 분자량)

4.1.3 FAD

4.1.3.1 증류수에 녹여 0.5 µg/mL(리보플라빈으로 환산, $\times 0.4537^*$)의 용액으로 만든다.

* 376.36(리보플라빈 분자량)/829.51(FAD 무수물 분자량)

4.2 시험용액 제조

4.2.1 시료 일정량을 달아 소량의 증류수를 가해 균질기 또는 막자사발에 미세하게 분쇄하고 지방이 많을 경우 탈지한다.

4.2.2 이에 증류수를 가해 70~80°C의 수욕 상에서 잘 혼합하여 12~20 분간 추출한다.

4.2.3 추출액을 식힌 후 1 mL 중 비타민 B₂가 0.05~0.5 µg이 되도록 일정용량으로 만들어 시험용액으로 사용한다.

※ 연질캡슐제품의 경우

[4.2.2]의 과정 후 원심분리하여 상등액을 취하고 잔류물에 대해 [4.2.2]의 과정을 1회 반복한다. 원심분리 후 상등액을 합하여 1 mL 중 비타민 B₂가 0.05~0.5 µg이 되도록 일정용량으로 만들어 시험용액으로 사용한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기 파장	여기파장 : 445 nm, 측정파장 : 530 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	메탄올:10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 5.5)(35:65) (1 N 수산화나트륨용액으로 pH 조정)
유속	0.8 mL/분

5.2 계산

5.2.1 비타민 B₂(리보플라빈, FMN, FAD)(mg/100 g)

$$= C \times (a \times b) / S \times (100 / 1,000)$$

C : 시험용액중의 비타민 B₂의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 양(mL)

b : 시험용액의 희석배수

S : 시료 채취량(g)

100/1,000 : 단위 환산 계수

3-8 나이아신

3-8-1 나이아신(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 니코틴산을 가수분해 하여 중화시킨 후 탈색을 한 후에 다시 이것을 브롬시안용액과 파라아미노 아세토페논용액으로 발색을 시킨 후 분광광도계로 흡광도를 측정하는 방법으로 파장 420 nm에서 흡광도를 측정한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(1000 mL, 100 mL)

2.1.2 원심분리관(100 mL)

2.1.3 시험관(15 mL)

2.1.4 원심분리기

2.1.5 비커(100 mL)

2.1.6 진공감압장치(Vacuum manifold)

2.1.7 여지(filter paper)

2.1.8 진공펌프(Vacuum pump)

2.2 분석장비

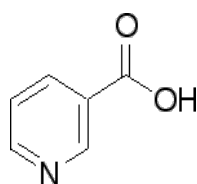
2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Nicotinic acid(3-Picolinic acid; Niacin; Pellagra preventive factor; Pyridine-3-carboxylic acid; Vitamin B₃)

분자식 : C₆H₅NO₂, 분자량 : 123.11, CAS No. : 59-67-6



3.2 일반시약

- 3.2.1 황산아연(Zinc sulfate)
- 3.2.2 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 황산(Sulfuric acid)
- 3.2.5 염산(Hydrochloric acid)
- 3.2.6 아밀알콜(Amyl Alcohol)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 포화황산아연용액

황산아연($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 800 g을 물에 녹여서 1 L로 한다.

4.1.2 브롬시안용액

특급 브롬시안을 물에 녹여 10%로 한다.

4.1.3 파라아미노 아세토페논용액

파라아미노 아세토페논 2 g을 소량의 염산에 녹여서 물을 가하여 100 mL로 한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 니코틴산 표준물질을 약 100 mg을 정밀히 취한다.

4.2.2 100 mL 부피플라스크에 넣고 10 N 황산액 1 mL을 가한다.

4.2.3 물을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.2.4 사용 시에는 위의 원액을 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mL씩 취하여 물을 가해 100 mL로 맞추어 사용한다.

4.2.5 각 농도의 니코틴산 표준액의 1 mL을 취해 물 4 mL을 가해서 검량선을 작성한다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 니코틴산 400 μg 상당의 시료를 100 mL 비커에 취한다.

4.3.2 6 N 염산액 20 mL을 가해 비등 수욕 중에 60분간 침출하여 가수 분해한다.

4.3.3 이것을 냉각 후 100 mL 부피플라스크에 옮기고 물로 100 mL이 되게 한다.

4.3.4 이것을 여과 혹은 원심분리하여 여액 또는 상등액을 시료용액으로 한다.

4.3.5 시료용액 25 mL을 원심분리관에 취한다.

4.3.6 페놀프탈레인시액 2방울을 가해서 6 N 수산화나트륨액 20 mL로 미산성이 될 때까지 중화한다.

4.3.7 중화액에 포화 황산아연용액 2 mL을 가한다.

4.3.8 소포제로서 아밀알콜 수 방울을 가한다.

4.3.9 수산화아연의 침전이 생길 때까지 잘 진탕 혼합한다.

4.3.10 3 M 수산화나트륨액과 1 N 수산화나트륨액을 가하여 중화한다.

4.3.11 2 N 황산액을 가하여 pH 6.5가 되게 하고 물을 가하여 50 mL로 한다.

4.3.12 진탕 혼합 후 10분간 방치하여 원심분리 또는 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4.4 시험조작

4.4.1 시험용액 5 mL씩 2개의 시험관에 취하고 여기에 브롬시안용액 2 mL씩을 가하여 60~70°C의 수욕에서 10~15분간 반응시킨다.

4.4.2 얼음물에 냉각 시키면서 한쪽에 파라아미노 아세토페논용액 1 mL을 가한다.

4.4.3 두개의 시험관에 물을 넣어 10 mL로 한다.

4.4.4 위의 발색액을 얼음물 중에 냉각한 채로 암실에서 10~15분간 방치한다.

4.4.5 파장 420 nm에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 계산

5.1.1 계산식

$$\text{총 니코틴산 함량(mg/100g)} = X \times 40 \times \frac{100}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

X : 니코틴산의 농도($\mu\text{g/mL}$)

3-8-2 나이아신(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 나이아신을 미생물학적으로 함량을 구하는 방법으로 시료를 황산으로 추출 후 접종액을 넣어 배양하여 나온 측정치를 가지고 시료중의 나이아신의 함량을 측정하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 데시케이터

2.1.2 가온기(Heating Block)

2.1.3 pH 적정기

2.1.4 시험관(15 mL)

2.1.5 멸균기

2.1.6 무균대

2.1.7 용매용 일회용 실린지

2.1.8 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.2 분석장비

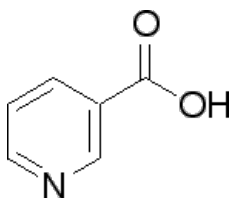
2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Nicotinic acid(3-Picolinic acid; Niacin; Pellagra preventive factor; Pyridine-3-carboxylic acid; Vitamin B₃)

분자식 : C₆H₅NO₂, 분자량 : 123.11, CAS No. : 59-67-6



3.2 일반시약

- 3.2.1 증류수(Distilled water)
- 3.2.2 염산(Hydrochloric acid)
- 3.2.3 수산화나트륨(Sodium hydroxide)
- 3.2.4 톨루엔(Toluene)
- 3.2.5 제1인산칼륨(Monopotassium Phosphate)
- 3.2.6 황산마그네슘(Magnesium sulfate)
- 3.2.7 염화나트륨(Sodium chloride)
- 3.2.8 황산제1철(Ferrous sulfate)
- 3.2.9 황산망간(Magnesium sulfate)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 카제인 산분해용액

배지작성에 대하여 각 비타민, 무기염류, 카제인 산분해물 등은 적당한 농도의 액을 만들어 냉장고 중에 보존하여 두면 편리하다. 이 보존액에 잡균이 혼합되지 않게 하고, 보존액에서 배지를 작성함에 있어 각 비타민의 보존액에 다른 비타민이 혼입되지 않게 특히 주의한다. 배지를 만들 때에는 일반적으로 각 성분을 혼합, 용해한 다음에 10% 염산용액 또는 수산화나트륨용액을 사용하여 pH 3.5로 조정하고 약 20분간 비등 수욕 상에서 가온하고, 냉각 후 여과하여 물을 가해서 배양시의 2배 농도의 배지를 작성한다. 다음에 공통 성분의 염류용액과 카제인 산분해용액의 제법을 참고한다.

4.1.2 아데닌, 구아닌, 우라실 용액

아데닌황산염, 구아닌염산염 및 우라실 각 0.1 g을 20% 염산용액 5 mL에 가열하면서 용해하고 냉각 후 물을 가하여 100 mL로 하고 톨루엔 소량을 가하여 약 10°C에서 보존한다.

4.1.3 시스틴, 트립토판용액

L-시스틴 2 g 및 L-트립토판 0.5 g(또는 DL-트립토판 1 g)을 물 350~400 mL에 현탁하고 70~80°C에 가열하여 고형물이 용해할 때까지 20% 염산용액을 적가한다. 냉각 후 물을 가하여 전량을

500 mL로 하고 톨루엔 소량을 가하여 약 10°C에서 보존한다.

4.1.4 비타민 B₁, 비타민 B₂, 비오틴용액

비타민 B₁염산염, 비타민 B₂ 및 비오틴을 0.02 N 초산에 녹이고, 그 1 mL가 비타민 B₁염산염 10 µg, 비타민 B₂ 20 µg 및 비오틴 0.04 µg을 함유하게 한다. 이 용액은 톨루엔 소량을 가하여 광을 피해서 냉소에 보존한다.

4.1.5 파라아미노 안식향산, 판토텐산칼슘, 비타민 B₆ 용액

이 용액의 1 mL가 파라아미노 안식향산 10 µg, 판토텐산칼슘 20 µg 및 피리독신 염산염 40 µg을 함유하게 25% 에탄올에 녹인다.

4.1.6 염류용액 A 및 염류용액 B

(가) 염류용액 A

제1인산칼륨(KH₂PO₄) 및 제2인산칼륨(K₂HPO₄) 각 5 g을 물에 용해하여 전량을 100 mL로 하고 염산 1방울 및 톨루엔 소량을 가하여 보존한다.

(나) 염류용액 B

황산마그네슘(MgSO₄·7H₂O) 2 g, 염화나트륨(NaCl) 0.1 g, 황산제1철(FeSO₄·7H₂O) 0.1 g 및 황산망간(MnSO₄·4H₂O) 0.1 g을 물에 용해하여 전량을 100 mL로 하고 염산 1방울 및 톨루엔 소량을 가하여 보존한다.

4.2 기초배지의 조제

카제인 산분해용액 10 mL, 시스틴, 트립토판용액 10 mL, 아데닌, 구아닌, 우라실용액 2 mL, 비타민 B₁, 비타민 B₂, 비오틴용액 2 mL, P-아미노안식향산, 판토텐산칼슘, 비타민 B₆ 용액 2 mL, 염류용액 A 2 mL 및 염류용액 B 2 mL를 혼합하고 여기에 포도당 4 g 및 무수초산 나트륨 2 g을 가하여 용해하고, 10% 수산화나트륨용액으로 pH를 6~8로 조정한다. 다음 물을 가하여 전량을 100 mL로 한다. 필요하면 여과한다 (또는 Niacin Assay Medium, DIFCO사 제품을 사용할 수 있다).

4.3 접종용액의 조제

(1) *Lactobacillus plantarum*의 보존균주

(2) 물 100 mL에 효모엑기스 2 g을 녹이고 여기에 포도당 0.5 g, 무수초산나트륨 0.5 g을 가하여 pH 6.8로 조정한 다음, 수욕 상에서

10~20분간 가열하고, 여과 후 한천 1.5 g을 가하고 한천이 용해될 때까지 수욕 상에서 흔들어 혼합하면서 가열한다. 가열시 이 용액 약 10 mL씩을 시험관에 분주하고, 솜마개를 하고, 1 kg/cm²에서 10분간 가압 멸균하고 시험관을 수직의 위치에 보존하여 냉각한다. *Lactobacillus plantarum* ATCC, No8014의 보존균주로부터 멸균한 배지 10 mL에 접종하고 37°C에서 16~24시간 배양하고, 냉소에 보존한다. 보존균주는 매주 새로 조제한다. 1주 지난 것은 사용하지해서는 아니 된다(또는 Lactobacilli agar, DIFCO사 제품을 사용할 수 있다).

4.4 배지

기초 배지 5 mL를 함유하는 시험관에 니코틴산 1 µg을 함유하게 하고 물을 가하여 솜마개를 하고 1 kg/cm²에서 10분간 가압 멸균하여 방냉한다(또는 Lactobacilli broth AOAC, DIFCO사 제품을 사용할 수 있다).

4.5 접종균액

*Lactobacillus plantarum*의 보존균주를 멸균한 배지 10 mL에 접종하고 37°C에서 16~24시간 배양한다. 여기에서 얻은 배양액을 잘 진탕 혼합한 다음 그대로 접종균액으로 하여 사용한다.

4.6 표준용액 제조

4.6.1 미리 건조시킨 니코틴산 표준물질 10 mg을 정밀히 측정한다.

4.6.2 정밀히 측정한 표준물질을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.6.3 에탄올을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.6.4 사용 시에는 물로 희석하여 사용한다.

4.7 시험용액 제조

4.7.1 염기성물질 함량이 적은 고체 또는 반고체시료

4.7.1.1 시료의 적어도 10배량의 1 N 황산을 가하여 잘 혼합한다. 이 용액 1 mL에는 니코틴산 5 mg이상 함유하여서는 안된다.

4.7.1.2 1 N 황산으로 플라스크의 벽에 부착한 시료를 세척한다.

4.7.1.3 1 kg/cm²에서 30분 동안 가압 추출한다.

4.7.1.4 냉각 후 1 N 수산화나트륨액을 가하여 pH 6.5로 조정한다.

4.7.1.5 물을 가하여 1 mL에 니코틴산이 약 0.1 µg함유하게 희석한다. 여과가 필요할 시에는 여과를 한다.

4.7.2 염기성물질 함량이 많은 고체 또는 반고체시료

4.7.2.1 시료에 물을 가하여 잘 혼합한다.

4.7.2.2 1 N 황산을 가하여 pH 6으로 맞춘 다음 위 (1)의 방법에 따라 조제한다.

4.7.3 액체시료

4.7.3.1 시료에 1 N 황산 또는 1 N 수산화나트륨액을 가하여 pH 6으로 맞춘 다음 위 (2)의 방법에 따라 조제한다.

4.8 시험조작(산도적정법에 의한 적정법)

4.8.1 니코틴산 표준용액 계열을 만들기 위해 시험관 2개씩에 니코틴산 표준용액 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2 mL을 취한다.

4.8.2 시험용액의 계열을 만들기 위하여 시험관 3개씩에 시험용액 0.3, 0.6 0.9 mL을 취한다.

4.8.3 각 시험관에 기초배지 5 mL을 넣고 물을 넣어 전량을 10 mL로 한다.

4.8.4 각 시험관 뚜껑을 닫고 혼합한다.

4.8.5 1 kg/cm²에서 10분간 가압 멸균한다.

4.8.6 냉각 후 각 시험관에 접종액 7 μ L씩 무균 접종한다.

4.8.7 37°C에서 72시간 배양기에 넣어 배양한다.

4.8.8 배양 후 각 시험관에 생긴 산을 0.1 N 수산화나트륨액으로 적정 한다.(지시약 : 0.1% 페놀프탈레인시액)

4.9 시험조작(측정에 의한 정량법)

탁도 측정에 의한 정량법은 산도측정에 비하여 정밀도는 약간 낮지만 결과를 신속히 알게 되는 이점이 있다. 니코틴산의 검량선을 0~0.1 μ g/4 mL로 하고, 시험용액 계열의 니코틴산 함량도 거기에 따라서 감해지면 좋다. 그러나, 균의 배양시간은 20~40시간으로 한다. 탁도는 570~650 nm에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 정량시험(산도적정법에 의한 적정법)

니코틴산 표준계열의 각 단계에 따른 측정치의 평균치를 각 시험관에 가한 니코틴산의 μ g수에 대한 검량선을 작성한다. 다음에 이 검량선을 사용하여 내삽법에 따라서 시료 계열의 각관 중의 니코틴산 함량을 구한다. 이 때의 측정치가 0.15 μ g 이상 및 0.025 μ g 이하의 것이

있으면 제외하고 남은 각 시험관에 대해서 시험용액 1 mL에 대한 니코틴산의 함량을 구한다. 6개 이상의 관으로부터 얻어진 각각의 수치가 그의 평균치보다 $\pm 10\%$ 를 초과하는 것이 없는 것을 확인한 다음에 다시 이것만의 평균치를 구하고, 다음에 시료 중의 니코틴산 함량을 산출한다.

3-8-3 나이아신(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 나이아신(니코틴산과 니코틴산아미드)을 이동상으로 추출, 정제한 후 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석 하는 방법으로 최대 흡수 파장인 260 nm에서 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 HLB 카트리지 : N-vinylpyrrolidone과 divinylbenzene이 copolymer 형태로 결합된 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지(용량 3mL) 또는 이와 동등한 것

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.5 부피플라스크(100 mL)

2.1.6 원심분리기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

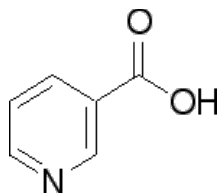
이동상은 A용액(5 mM Sodium hexanesulfonate/0.1% 초산 용액), B용액(5 mM Sodium hexanesulfonate/0.1% 초산 용액 : 메탄올 (35 : 65))을 이용하여 용매를 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

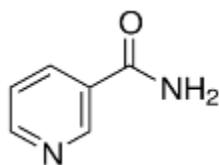
3.1.1 Nicotinic acid(3-Picolinic acid; Niacin; Pellagra preventive factor; Pyridine-3-carboxylic acid; Vitamin B₃)

분자식 : C₆H₅NO₂, 분자량 : 123.11, CAS No. : 59-67-6



3.1.2 Nicotinamide(Pyridine-3-carboxamide)

분자식 : C₆H₆N₂O, 분자량 : 122.13, CAS No. : 98-92-0



3.2 일반시약

3.2.1 초산(Acetic acid)

3.2.2 헥산설폰산나트륨(Sodium hexanesulfonate)

3.2.3 메탄올(Methanol)

3.2.4 헥산(n-Hexane)

3.2.5 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시약제조

4.1.1 5 mM sodium hexanesulfonate 용액

Sodium hexanesulfonate 911.1 mg을 증류수 500 mL에 녹여 증류수로 1 L가 되게 한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 니코틴산 및 니코틴산아미드를 각각 증류수로 녹여 100 mg/L 로 제조하여 표준원액으로 한다

4.2.2 표준원액을 증류수로 적당히 희석하여 표준용액으로 만든다.

4.3 시험용액의 조제

- 4.3.1 시료를 취하여 균일하게 잘게 부순 후 적당량(1~10 g)을 취한다.
- 4.3.2 100 mL 부피플라스크에 넣고 5 mM Sodium hexanesulfonate 용액을 넣는다.
- 4.3.3 30분간 초음파 추출한다.
- 4.3.4 5 mM Sodium hexanesulfonate 용액을 넣어 표선까지 맞춘다
- 4.3.5 0°C, 15,000 G로 30분간 원심분리하여 상등액을 취해 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과한다.
- 4.3.6 HLB 카트리지를 준비하고 메탄올 5 mL과 증류수 5 mL을 연속으로 통과시킨 후 카트리지에 여과액 10 mL를 통과시켜 니코틴산 및 니코틴산아미드가 카트리지에 흡착되도록 한다. 4.3.7 카트리지는 5 mL의 n-헥산으로 세척한 후 80% 메탄올용액 5 mL로 용출한다. 4.3.8 용출액은 10 mL 부피플라스크에 모으고 증류수를 가하여 10 mL로 정용한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 µL
칼럼온도	40°C
이동상	A : 5 mM Sodium hexanesulfonate/0.1% 초산 용액 B : 5 mM Sodium hexanesulfonate/0.1% 초산 용액 : 메탄올 (35 : 65)
검출기 파장	260 nm
유량	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	100	0
3	100	0
13	70	30
20	70	30

5.2 계산

5.2.1 나이아신(mg/100g) = $C \times (a \times b) / S \times 100 / 1,000$

C : 시험용액 중의 니코틴산 및 니코틴산아미드 농도의 합($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-9 판토텐산

3-9-1 판토텐산(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 판토텐산을 미생물학적으로 함량을 구하는 방법으로 시료를 황산으로 추출 후 접종액을 넣어 배양하여 나온 측정치를 가지고 시료중의 판토텐산의 함량을 측정한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 항온기

2.1.2 건조기

2.1.3 멸균기

2.1.4 무균대

2.1.5 시험관

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

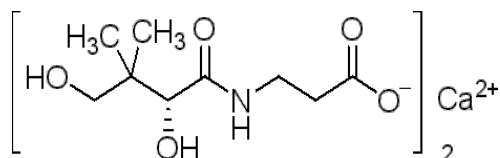
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-Pantothenic acid(Calcium D-pantothenate; Vitamin B₅)

분자식 : $\text{HOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{OH})\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2 \cdot 1/2\text{Ca}$

분자량 : 238.27, CAS No. : 137-08-6



3.2 일반시약

3.2.1 증류수(Distilled water)

- 3.2.2 염산(Hydrochloric acid)
- 3.2.3 수산화나트륨(Sodium hydroxide)
- 3.2.4 톨루엔(Toluene)
- 3.2.5 제1인산칼륨(Monopotassium phosphate)
- 3.2.6 황산마그네슘(Magnesium sulfate)
- 3.2.7 염화나트륨(Sodium chloride)
- 3.2.8 황산제1철(Ferrous sulfate)
- 3.2.9 황산망간(Magnesium sulfate)

4. 시험과정

4.1 일반정량조작법

4.1.1 시약

사용 시약류는 가능한 한 순수한 시판품을 이용하고 검량선 작성을 위한 표준물질은 표준비타민을 이용한다.

4.1.2 시험균의 보존

유산균류는 고충한천배지에, 효모류는 사면한천배지에 보존하며, 유산균과 효모용 보존배지의 조성은 다음과 같다. 유산균은 효모엑기스 분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, KH_2PO_4 0.2%, 한천 1.5%의 조성으로 하고, 효모용은 맥아엑기스분말 3%, 한천 1.5%로 한다. 한천을 가하기 전에 각 성분을 잘 녹이고 pH를 6.8~7.0으로 조정하여 여과한 후, 한천을 가하여 가온 상태에서 10 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한다. 균은 접종하여 유산균은 37°C, 효모는 30°C에서 약 20시간 배양한다. 배양 후 5°C에 보존하면서 1~3주 간격으로 새로 배양한다. 사용하지 않을 때에는 동결건조법에 의해 보존한다.

4.1.3 접종균액

유산균 접종배지는 효모엑기스분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, 염류용액 A와 B는 기초배지의 1/2 양으로 사용한다. 이 액체배지에 보존균을 접종한다. 필요하면 16~24시간 정도 같은 배지에 2~3회 배양한다. 증식된 균체는 3,000 rpm에서 원심분리하여 0.9% NaCl용액으로 3회 세정한 후, 적당한 농도의 균액(배지의 5~100배 용량의 0.9% NaCl용액을 가한다)이 될

때까지 희석하여 접종균액으로 한다. 이 균액을 접종하는 모든 실험 조작은 무균적으로 행해야 한다.

4.1.4 정량용 기초배지

(가) 염류용액 A

KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 각 5 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

(나) 염류용액 B

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g 및 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

(다) 카제인 산분해용액

비타민이 포함되어 있지 않은 카제인 100 g을 95% 알코올로 2회 세정하여, 5배 양의 20% HCl을 가해서 8~12시간 동안 가열 환류하거나 또는 멸균기에서 121°C로 8~12시간 가열한다. 계속해서 점액의 형태가 될 때까지 감압하여 HCl을 제거하고, 여기에 물 200 mL를 가해 감압 하에서 HCl을 제거한다. 잔류물을 물에 녹이고 10% NaOH를 가하여 pH를 3.5 ± 0.1 로 조정하고 여기에 물을 가하여 1 L로 만든다. 계속해서 활성탄 20 g을 가해 1시간 정도 혼합한 후 여과한다. 여액이 담황색 또는 무색이 될 때까지 이 조작을 되풀이한 후, 소량의 톨루엔을 가하여 냉암소에 보관한다. 보관 중 침전이 생기면 여과해서 사용한다.

4.1.5 시험조작

특별한 기준이 없을 경우, 배양액은 5 mL 또는 10 mL로 한다. 정량하고자 하는 비타민의 표준계열은 동질, 동형의 시험관을 사용하고, 각 농도에 관해서 2~3개씩 4~8단계로 하며, 비타민표준 용액을 포함하지 않는 시험관을 공시험용으로 하여 4~6개 준비한다. 총량이 5 mL일 경우 기초배지는 2.5 mL를 사용하고, 10 mL일 경우 기초배지는 5 mL를 가한 후, 물을 가해서 각각 5 mL 또는 10 mL로 만든다. 시험용액의 계열은 각 시험법에 규정된 방법으로 제조한 시험용액에 관해서 각 농도별로 시험관을 각각 2~3개씩 보통 4단계로 하고 표준계열과 같은 방법으로 동량의 기초배지를 가한 후 물을 가해서 표준계열과 동량으로 한다.

분주가 끝나면 면전하여 121°C의 조건에서 5분간 가압 살균한다. 표준용액을 포함하지 않은 시험관은 1조(2~3개)를 제거하고, 각 시험관에 접종액 1방울씩을 무균적으로 가한 후, 30~37°C에서 16~24시간 배양 후 탁도법에 의하여 증식도를 측정한다. 증식도를 탁도법으로 측정할 때는 각 시험관의 내용물을 10 mm 직경의 흡수 cell에 옮기고 비타민 표준용액을 포함하지 않고 또한 균액을 접종하지 않는 시험관의 투과도를 100%로 하여, 분광광도기에서 540~610 nm의 파장으로 투과도 또는 흡광도를 구한다. 잡균이 혼입된 것이 밝혀진 경우나 기초배지 또는 접종균액 중에 정량하고자 하는 비타민이 혼재해서 표준용액을 넣지 않은 대조 시험관에서의 증식이 느린 경우(투과율 90% 이하) 및 표준계열에 의한 최고의 증식이 소정의 증식도에 달하지 않을 때(투과율 40% 이상)는 다시 시험한다.

4.1.6 탁도법에 의한 계산

검량선을 작성할 때는 횡축에는 표준용액의 농도 또는 mL 수의 대수를, 종축에는 투과도 또는 흡광도를 취한다. 표준용액의 각 농도단계에 관해서 얻어진 투과도 또는 흡광도의 평균치를 구해, 그 값(y)을 정점으로 해서 직선을 그린다. 계속해서 시험용액의 각 농도단계에 관해서 투과도 또는 흡광도를 구해, 횡축에 시료의 g 수 또는 시료용액 mL 수의 대수를 임의로 취하여 실험치 y를 정점으로 하여 직선을 그린다.

이 때 적어도 3점 이상이 직선을 구성하여야 한다. 표준용액 및 시험용액은 직선으로 평행하는 부분에 관해서 시험용액 1 mL 또는 시료 1 g당의 함유량을 구해 다음의 계산법에 따라 시료의 비타민 함량을 산출한다.

4.1.7 계산식

$$\text{비타민함량} = \text{시험용액의 비타민함량} \times \frac{\text{희석농도}}{\text{시료채취량}}$$

4.2 시약 제조

4.2.1 카제인 산분해용액

3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량용 기초배지에 따른다.

4.2.2 시스틴-트립토판 용액

L-시스틴 2 g 및 L-트립토판 0.5 g을 350~400 mL의 물로 녹이고 70~80°C로 가열하여 고형물이 완전히 녹을 때까지 20% HCl을 떨어뜨린다. 식힌 후 물을 가해서 전량을 500 mL로 만들고 톨루엔 소량을 가하여 약 10°C에서 보존한다.

4.2.3 아데닌-구아닌-우라실용액

아데닌황산염, 구아닌염산염 및 우라실 각 0.1 g을 20% HCl 5 mL로 가열하면서 녹이고 식힌 후 물을 가하여 100 mL로 만든다. 톨루엔 소량을 가해서 약 10°C로 보존한다.

4.2.4 비타민 B₁-비타민 B₂-비오틴용액

비타민 B₁염산염, 비타민 B₂ 및 비오틴을 0.02 N 초산에 용해하여, 그 1 mL에 비타민 B₁염산염 10 µg, 비타민 B₂ 20 µg 및 비오틴 0.04 µg을 포함하도록 한다. 톨루엔을 소량 가하여 빛을 차단하고 냉소에 보관한다.

4.2.5 염류용액 A

3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량용 기초배지에 따른다.

4.2.6 염류용액 B

3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량용 기초배지에 따른다.

4.2.7 파라아미노안식향산-니코틴산-비타민 B₆ 용액

보존용액 1 mL에 파라아미노안식향산 10 µg, 니코틴산 20 µg 및 피리독신염산염 40 µg을 포함하도록 25% 에탄올로 용해하여 냉소에 보관한다.

4.3 기초배지의 조제

카제인 산분해용액 10 mL, 시스틴-트립토판용액 10 mL, 아데닌-구아닌-우라실용액 2 mL, 비타민 B₁-비타민 B₂-비오틴용액 2 mL, 파라아미노안식향산-니코틴산-비타민 B₆ 용액 2 mL, 염류용액 A 2 mL 및 염류용액 B 2 mL를 혼합하여 여기에 포도당 4 g 및 무수초산나트륨 2 g을 가해서 녹이고, 10% NaOH용액으로 pH를 6.8로 조정 후 물을 가해서 전량을 100 mL로 만든다. 불용물질이 있으면 여과한다. Pantothenate medium(Difco)을 사용할 수 있다.

4.4 접종용액의 조제

(1) *Lactobacillus plantarum*의 보존균주

물 100 mL에 효모엑기스 2 g을 녹이고, 여기에 포도당 0.5 g, 무수초산나트륨 0.5 g을 가해 pH를 6.8로 조정한 후 수욕 상에서 10~20분간 가열하여 여과한다. 한천 1.5 g을 가해 한천이 녹을 때까지 수욕 상에서 세게 진탕하면서 가열한다. 뜨거운 상태에서 10 mL씩 시험관에 분주하여 면전하고, 121°C에서 10분간 가압멸균한 후 시험관을 똑바로 놓고 식힌다. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014의 보존균주로부터 멸균된 배지에 접종한 후 37°C에 16~24시간 배양하여 냉소에 보관한다. 보존균주는 매주 새로 조제하고 1주가 넘은 것은 사용하지 않는다.

(2) 배지

기초배지 5 mL를 넣은 시험관에 판토텐산칼륨 0.2 µg을 포함한 물 5 mL를 가하고 면전을 하여, 121°C에서 10분간 가압멸균한 후 식힌다. Bacto micro inoculum broth(Difco)를 사용할 수 있다.

(3) 접종균액

*Lactobacillus plantarum*의 보존균주를 멸균된 배지 10 mL에 접종하여 37°C에서 16~24시간 배양한다. 배양액을 잘 진탕 혼합한 후 그대로 접종균액으로 사용한다.

4.5 표준용액 제조

4.5.1 판토텐산칼륨 50 mg을 정밀하게 취하여 1 L 부피플라스크에 넣는다.

4.5.2 물을 가하여 용해시킨다.

4.5.3 0.2 N 초산 10 mL, 2% 초산나트륨 100 mL, 물을 넣어 표선 근처까지 맞춘다.

4.5.4 톨루엔을 소량 가하여 표선에 맞춘다.

4.5.5 사용 시에는 0.5 µg/mL이 되게 희석하여 사용한다.

4.6 시험용액 제조

4.6.1 시료의 적어도 10배량의 물을 가하여 잘 혼합한다.

4.6.2 초산 및 초산나트륨용액으로 pH를 5.6~5.7로 조정한다.

4.6.3 가압멸균기에 넣고 121°C에서 약 5분간 가열 후 식힌다. 필요하면 10% HCl을 가해 pH를 4.0~4.5로 조정하여 단백질 등을 침전,

제거시키고 투명한 액으로 만든다.

4.6.4 수산화나트륨용액을 가해서 pH 6.8로 조정한다.

4.6.5 물을 가하여 1 mL에 판토텐산이 약 0.05 μg 함유하게 희석한다.

4.7 시험조작

4.7.1 판토텐산 표준용액 계열을 만들기 위해 시험관 2개씩에 니코틴산 표준용액 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2 mL을 취한다.

4.7.2 시험용액의 계열을 만들기 위하여 시험관 3개씩에 시험용액 0.5, 1.0, 1.5 mL을 취한다.

4.7.3 각 시험관에 기초배지 2 mL을 넣고 물을 넣어 전량을 4 mL로 한다.

4.7.4 각 시험관 뚜껑을 닫고 혼합한다.

4.7.5 121°C에서 5분간 가압 멸균한다.

4.7.6 냉각 후 각 시험관에 접종균액 한방울씩 무균 접종한다.

4.7.7 37°C에서 20~24시간 배양기에 넣어 배양한다.

4.7.8 배양 후 각 시험관의 내용물이 잘 진탕·혼합하여 균일한 부유액으로 만든 후 540~660 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 정량시험

판토텐산칼륨 표준계열에 의한 흡광도의 평균치로부터 검량선을 작성한다. 이 검량선을 이용하여 시료계열의 각 시험관의 판토텐산칼륨 함량을 구한다. 이 때 값이 0.09 μg 이상 또는 0.01 μg 이하의 것이 있으면 제외하고, 남은 각 관에 대하여 시험용액 1 mL에 대한 판토텐산칼륨의 함량을 계산한다. 6개 이상의 시험관으로부터 얻어진 각각의 값이 그들의 평균치보다 10% 이상 벗어나지 않는 것을 확인한 다음에 이 값만의 평균치를 구하여 시료 중의 판토텐산칼륨의 함량을 산출한다. 그 다음에 여기에서 얻은 값으로 환산계수 0.916을 곱해서 판토텐산 함량을 구한다.

3-9-2 판토텐산(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 판토텐산을 20 mM 인산이수소칼륨용액으로 추출 하여 옥타데실실릴화한 칼럼으로 판토텐산을 분리하는 방법으로 자외부흡광 광도검출기를 이용하여 판토텐산의 최대 흡수 파장인 200 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 부피플라스크(50 mL)

2.1.5 원심분리기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 1.5 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

이동상 A용액(20 mM 인산이수소칼륨용액(pH 2.1): 아세토니트릴(99.5 : 0.5, v/v) 으로 분당 120 μ L씩 충분한 시간동안 흘려 칼럼과 기기를 안정화시킨다.

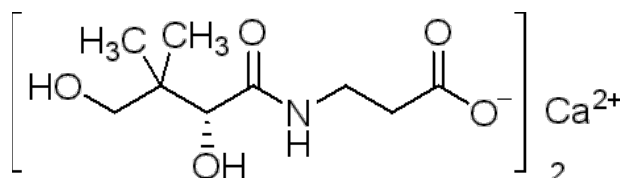
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-Pantothenic acid(Calcium D-pantothenate; D-pantothenic acid hemicalcium salt; Vitamin B₅)

분자식 : $\text{HOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{OH})\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2 \cdot 1/2\text{Ca}$

분자량 : 238.27, CAS No. : 137-08-6



3.2 일반시약

3.2.1 인산(Phosphoric acid)

3.2.2 인산이수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile)

4. 시험과정

4.1 시약 조제

4.1.1 20 mM 인산이수소칼륨용액

인산이수소칼륨 2.7 g을 증류수에 녹이고 인산으로 pH 2.1로 조절한 후 전량을 1 L가 되게 한다.

4.2 표준용액 조제

4.2.1 판토텐산 표준물질 5 mg을 정밀히 취해 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 표준용액을 증류수로 적당히 희석하여 사용한다.

4.3 시험용액 조제

4.3.1 판토텐산으로서 1 ~ 5 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 칭량한다.

4.3.2 50 mL 부피플라스크에 넣고 20 mM 인산이수소칼륨을 넣는다.

4.3.3 30분 동안 초음파 추출한다.

4.3.4 20 mM 인산이수소칼륨을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.3.5 3,000 rpm에서 원심분리를 하여 상등액을 취해 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	35°C
이동상	A: 20 mM 인산이수소칼륨용액 : ACN (99.5 : 0.5, v/v) B: 20 mM 인산이수소칼륨용액 : ACN (80 : 20, v/v)
검출기 파장	200 nm
유량	120 μ L/분

표 2. 이동상 조건

시간(분)	이 동 상 (%)	
	A 용액	B 용액
0	100	0
37	100	0
37.1	0	100
47	0	100
47.1	100	0
70	100	0

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 판토텐산(mg/g)} = C \times (a \times b) / S \times 1/1,000 \times 219.23/238.27$$

C : 시험용액 중 판토텐산의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000: 단위 환산 계수

219.23 : 판토텐산의 분자량

238.27 : 판토텐산 칼슘의 분자량

3-10 비타민 B₆

3-10-1 비타민 B₆(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 피리독신염산염을 증류수에 녹여 추출하여 옥타데실실릴화한 칼럼으로 피리독신염산염을 분리하는 방법으로 형광검출기를 이용하여 피리독신염산염의 여기파장인 290 nm, 측정파장 396 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 부피플라스크(50 mL)

2.1.5 원심분리기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2 형광검출기(Fluorescence Detector, FLD)

2.2.3 칼럼오븐

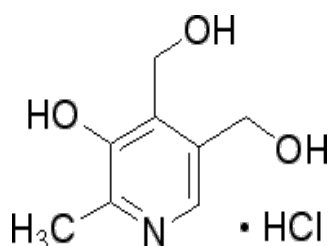
2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 1.5 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica, 충전입자크기 5 µm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Pyridoxine hydrochloride(Adermine hydrochloride; PN HCl; Pyridoxol hydrochloride; Vitamin B₆ hydrochloride)

분자식 : C₈H₁₁NO₃·HCl, 분자량 : 205.64, CAS No. : 58-56-0



3.2 일반시약

3.2.1 염산(Hydrochloric acid)

3.2.2 인산나트륨(Sodium phosphate)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 50 mM 인산나트륨용액

인산나트륨 6.0 g을 증류수에 녹이고 염산으로 pH 2.5로 조절한 후 전량을 1 L가 되게 한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 피리독신염산염 표준물질 5 mg을 정밀히 취해 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 표준용액을 증류수로 적당히 희석하여 사용한다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 시료 0.1~1 g을 취하여 마쇄기를 이용하여 잘게 부순 후 적당량을 취한다.

4.3.2 테스트튜브에 넣고 증류수 25 mL를 넣는다.

4.3.3 30분 동안 초음파 추출한다.

4.3.4 원심분리후 상등액을 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.3.5 [4.3.2]~[4.3.4]의 방법을 1회 반복한다.

4.3.6 증류수를 넣어 표선까지 맞춘다.

4.3.7 이 액을 0.45 μm 멤브레인필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	35°C
이동상	50 mM 인산나트륨용액(pH 2.5)
검출기 파장	여기파장 : 290 nm, 측정파장 : 396 nm
유량	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 계산식

$$\text{비타민 B}_6 \text{ 함량(피리독신, mg/100g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{100}{1,000}$$

S : 시험용액 중의 비타민 B₆(피리독신)의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

3-10-2 비타민 B₆(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 피리독신염산염을 미생물학적으로 함량을 구하는 방법으로 시료를 염산과 물로 추출 후 접종액을 넣어 배양하여 나온 측정치를 가지고 시료중의 피리독신염산염의 함량을 측정한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 항온기

2.1.2 건조기

2.1.3 멸균기

2.1.4 무균대

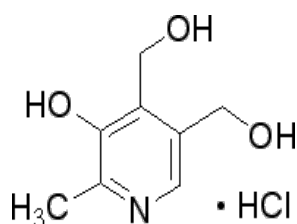
2.1.5 시험관

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Pyridoxine hydrochloride(Adermine hydrochloride; PN HCl;
Pyridoxol hydrochloride; Vitamin B₆ hydrochloride)

분자식 : C₈H₁₁NO₃·HCl, 분자량 : 205.64, CAS No. : 58-56-0



3.2 일반시약

3.2.1 증류수(Distilled water)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.4 톨루엔(Toluene)

3.2.5 제1인산칼륨(Monopotassium phosphate)

3.2.6 황산마그네슘(Magnesium sulfate)

3.2.7 염화나트륨(Sodium chloride)

3.2.8 황산제1철(Ferrous sulfate)

3.2.9 황산망간(Magnesium sulfate)

4. 시험과정

4.1 일반정량조작법

4.1.1 시약

사용 시약류는 가능한 한 순수한 시판품을 이용하고 검량선 작성을 위한 표준물질은 표준비타민을 이용한다.

4.1.2 시험균의 보존

유산균류는 고층한천배지에, 효모류는 사면한천배지에 보존하며, 유산균과 효모용 보존배지의 조성은 다음과 같다. 유산균은 효모 엑기스 분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, KH_2PO_4 0.2%, 한천 1.5%의 조성으로 하고, 효모용은 맥아엑기스분말 3%, 한천 1.5%로 한다. 한천을 가하기 전에 각 성분을 잘 녹이고 pH를 6.8~7.0으로 조정하여 여과한 후, 한천을 가하여 가온 상태에서 10 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한다. 균은 접종하여 유산균은 37°C, 효모는 30°C에서 약 20시간 배양한다. 배양 후 5°C에 보존하면서 1~3주 간격으로 새로 배양한다. 사용하지 않을 때에는 동결건조법에 의해 보존한다.

4.1.3 접종균액

유산균 접종배지는 효모엑기스분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, 염류용액 A와 B는 기초배지의 1/2 양으로 사용한다. 이 액체배지에 보존균을 접종한다. 필요하면 16~24시간 정도 같은 배지에 2~3회 배양한다. 증식된 균체는 3,000 rpm에서 원심분리하여 0.9% NaCl용액으로 3회 세정한 후, 적당한 농도의 균액(배지의 5~100배 용량의 0.9% NaCl용액을 가한다)이 될 때까지 희석하여 접종균액으로 한다. 이 균액을 접종하는 모든 실험 조작은 무균적으로 행해야 한다.

4.1.4 정량용 기초배지

(가) 염류용액 A

KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 각 5 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

(나) 염류용액 B

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g 및 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

(다) 카제인 산분해용액

비타민이 포함되어 있지 않은 카제인 100 g을 95% 알코올로 2회 세정하여, 5배 양의 20% HCl을 가해서 8~12시간 동안 가열 환류하거나 또는 멸균기에서 121°C로 8~12시간 가열한다. 계속해서 점액의 형태가 될 때까지 감압하여 HCl을 제거하고, 여기에 물 200 mL를 가해 감압 하에서 HCl을 제거한다. 잔류물을 물에 녹이고 10% NaOH를 가하여 pH를 3.5 ± 0.1 로 조정하고 여기에 물을 가하여 1 L로 만든다. 계속해서 활성탄 20 g을 가해 1시간 정도 혼합한 후 여과한다. 여액이 담황색 또는 무색이 될 때까지 이 조작을 되풀이한 후, 소량의 톨루엔을 가하여 냉암소에 보관한다. 보관 중 침전이 생기면 여과해서 사용한다.

4.1.5 시험조작

특별한 기준이 없을 경우, 배양액은 5 mL 또는 10 mL로 한다. 정량하고자 하는 비타민의 표준계열은 동질, 동형의 시험관을 사용하고, 각 농도에 관해서 2~3개씩 4~8단계로 하며, 비타민 표준용액을 포함하지 않는 시험관을 공시험용으로 하여 4~6개 준비한다. 총량이 5 mL일 경우 기초배지는 2.5 mL를 사용하고, 10 mL일 경우 기초배지는 5 mL를 가한 후, 물을 가해서 각각 5 mL 또는 10 mL로 만든다. 시험용액의 계열은 각 시험법에 규정된 방법으로 제조한 시험용액에 관해서 각 농도별로 시험관을 각각 2~3개씩 보통 4단계로 하고 표준계열과 같은 방법으로 동량의 기초배지를 가한 후 물을 가해서 표준계열과 동량으로 한다. 분주가 끝나면 면전하여 121°C의 조건에서 5분간 가압 살균한다. 표준 용액을 포함하지 않는 시험관은 1조(2~3개)를 제거하고, 각 시험관에 접종액 1방울씩을 무균적으로 가한 후, 30~37°C에서 16~24시간 배양 후 탁도법에 의하여 증식도를 측정한다. 증식도를

탁도법으로 측정할 때는 각 시험관의 내용물을 10 mm 직경의 흡수 cell에 옮기고 비타민 표준용액을 포함하지 않고 또한 균액을 접종하지 않는 시험관의 투과도를 100%로 하여, 분광광도기에서 540~610 nm의 파장으로 투과도 또는 흡광도를 구한다. 잡균이 혼입된 것이 밝혀진 경우나 기초배지 또는 접종균액 중에 정량하고자 하는 비타민이 혼재해서 표준용액을 넣지 않은 대조 시험관에서의 증식이 느린 경우(투과율 90% 이하) 및 표준계열에 의한 최고의 증식이 소정의 증식도에 달하지 않을 때(투과율 40% 이상)는 다시 시험한다.

4.1.6 탁도법에 의한 계산

검량선을 작성할 때는 횡축에는 표준용액의 농도 또는 mL 수의 대수를, 종축에는 투과도 또는 흡광도를 취한다. 표준용액의 각 농도단계에 관해서 얻어진 투과도 또는 흡광도의 평균치를 구해, 그 값(y)을 정점으로 해서 직선을 그린다. 계속해서 시험용액의 각 농도단계에 관해서 투과도 또는 흡광도를 구해, 횡축에 시료의 g 수 또는 시료용액 mL 수의 대수를 임의로 취하여 실험치 y를 정점으로 하여 직선을 그린다.

이 때 적어도 3점 이상이 직선을 구성하여야 한다. 표준용액 및 시험용액은 직선으로 평행하는 부분에 관해서 시험용액 1 mL 또는 시료 1 g당의 함유량을 구해 다음의 계산법에 따라 시료의 비타민 함량을 산출한다.

4.1.7 계산식

$$\text{비타민함량} = \text{시험용액의 비타민함량} \times \frac{\text{희석농도}}{\text{시료채취량}}$$

4.2 시약 제조

4.2.1 카제인 산분해용액

4.1.4 정량용 기초배지에 따른다.

4.2.2 비타민 B₁ 용액

비타민 B₁염산염 10 mg을 물에 용해해서 1,000 mL로 만든다. 이 용액 1 mL는 비타민 B₁염산염 10 µg을 포함한다.

4.2.3 이노시톨용액

이노시톨 100 mg을 물에 용해해서 100 mL로 만든다. 이 용액 1

mL는 이노시톨 1 mg을 포함한다.

4.2.4 비오틴용액

비오틴 25 mg을 물에 용해해서 1,000 mL로 만든 후 이 중 40 mL를 취해 물을 가하여 1,000 mL로 만든다. 이 용액 1 mL는 비오틴 1 µg을 포함한다.

4.2.5 판토텐산칼륨용액

판토텐산칼륨 20 mg을 물에 용해해서 100 mL로 만든다. 이 용액 1 mL는 판토텐산칼륨 0.2 mg을 포함한다.

4.2.6 니코틴산용액

니코틴산 100 mg을 물에 용해해서 100 mL로 만든다. 이 용액 1 mL는 니코틴산 1 mg을 포함한다.

4.2.7 염류용액

KH₂PO₄ 2.2 g, KCl 1.7 g, CaCl₂·2H₂O 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, MnSO₄·4H₂O 0.01 g 및 FeCl₃ 0.01 g을 물에 용해해서 전량을 100 mL로 만든다. 불용물질이 있으면 여과한다.

4.2.8 구연산완충액

구연산칼륨 10 g과 구연산 2 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 만든다.

4.3 기초배지의 조제

카제인 산분해용액 10 mL, 비타민 B₁ 용액 5 mL, 이노시톨용액 5 mL, 비오틴용액 2 mL, 판토텐산칼륨용액 2.5 mL, 니코틴산용액 0.5 mL, 염류용액 50 mL 및 구연산완충액 10 mL를 혼합하고 여기에 포도당 10 g을 가하여 녹인다. 10% NaCl 용액으로 pH를 5.0~5.2로 조정한 후 물을 가하여 전량을 100 mL로 만든다. 용해되지 않은 물질이 있으면 여과한다. Pyridoxine assay medium(Difco)을 사용할 수 있다.

4.4 접종용액의 조제

4.4.1 *Saccharomyces pastorianus*의 보존균주

Saccharomyces pastorianus ATCC 9080을 효모용 한천사면배지 또는 Wort agar(Difco)에 접종하여, 30°C에서 16~24시간 배양 후 냉소에 보관한다. 보관균주는 2주 간격으로 새로 배양한다.

4.4.2 배지

기초배지 100 mL에 피리독신염산염 1 µg을 포함한 물 100 mL를 가하여 접종균액 조제용 배지로 한다. 이 배지를 소시험관에 2 mL씩 분주하여 면전한 후 121°C에서 10분간 가압 멸균하여 방냉한다.

4.4.3 접종균액

*Saccharomyces pastorianus*의 보존균주를 멸균된 배지에 접종하여 30°C에서 16~24시간 배양한다. 배양균을 원심분리하여 취한 후 이를 0.9% NaCl 용액으로 2회 세척하고, 0.9% NaCl 용액을 이용해서 약 20배로 희석하여 접종용액으로 한다.

4.5 표준용액 제조

4.5.1 피리독신염산염 50 mg을 정밀하게 취하여 500 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.5.2 1 N 염산용액을 가하여 표선을 맞춘다.

4.5.3 사용 시에는 5 µg/mL이 되게 증류수로 희석하여 사용한다.

4.6 시험용액 제조

4.6.1 시료 약 2 g을 500 mL 삼각플라스크에 취한다.

4.6.2 10 N 염산용액 1 mL, 물 180 mL을 가하여 뚜껑을 닫는다.

4.6.3 121°C에서 4시간 감압 추출한다.

4.6.4 냉각 후 10% 수산화나트륨용액으로 pH4.5로 조정한다.

4.6.5 물을 가하여 전량을 200 mL로 만든다. 필요시 여과한다.

4.6.6 비타민 B₆가 약 6 µg/mL을 포함하도록 물로 희석하여 시험용액으로 사용한다.

4.7. 시험조작

4.7.1 비타민 B₆ 표준용액 계열을 만들기 위해 시험관 2개씩에 비타민 B₆ 표준용액 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mL을 취한다.

4.7.2 시험용액의 계열을 만들기 위하여 시험관 3개씩에 시험용액 1.0, 1.5, 2.0 mL을 취한다.

4.7.3 각 시험관에 기초배지 5 mL을 넣고 물을 넣어 전량을 10 mL로 한다.

4.7.4 각 시험관 뚜껑을 닫고 혼합한다.

4.7.5 100°C에서 10분간 가압 멸균한다.

4.7.6 냉각 후 각 시험관에 접종균액 한 방울씩 무균 접종한다.

4.7.7 37°C에서 16~24시간 배양기에 넣어 배양한다.

4.7.8 배양 후 균의 증식을 정지시키기 위해 100°C에서 5분간 멸균한 후
탁도법에 의하여 균의 증식을 측정한다.

3-11 엽산

3-11-1 엽산(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 엽산을 미생물학적으로 함량을 구하는 방법으로 시료를 엽산과 물로 추출 후 접종액을 넣어 배양하여 나온 측정치를 가지고 시료중의 엽산의 함량을 측정하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 항온기
- 2.1.2 건조기
- 2.1.3 멸균기
- 2.1.4 무균대
- 2.1.5 시험관
- 2.1.6 피펫
- 2.1.7 원심분리기
- 2.1.8 데시케이터
- 2.1.9 메스플라스크

2.2 분석장비

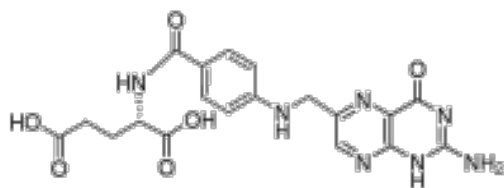
- 2.2.1 분광광도기

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Folic acid

분자식 : $C_{19}H_{19}N_7O_6$, 분자량 : 441.40, CAS No. : 59-30-3



3.2 일반시약

3.2.1 수산화나트륨(Sodium chloride)

3.2.2 톨루엔(Toluene)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 염산(Hydrochloric acid)

3.2.5 암모니아수(Ammonia water)

4. 시험과정

<일반정량조작법>

4.1 시험균의 보존

4.1.1 유산균류는 고층한천배지에 보존하며, 효모엑기스 분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, KH_2PO_4 0.2%, 한천 1.5%의 조성으로 한다.

4.1.2 효모류는 사면한천배지에 보존하며, 효모용은 맥아엑기스분말 3%, 한천 1.5% 조성으로 한다.

4.1.3 위의 배지에 한천을 가하기 전에 각 성분을 잘 녹이고 pH를 6.8~7.0으로 조정하여 여과한 후, 한천을 가하여 가온 상태에서 10 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한다.

4.1.4 균은 접종하여 유산균은 37°C, 효모는 30°C에서 약 20시간 배양한다. 배양 후 5°C에 보존하면서 1~3주 간격으로 새로 배양한다. 사용하지 않을 때에는 동결건조법에 의해 보존한다.

4.2 접종균액

4.2.1 유산균 접종배지는 효모엑기스분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, 염류용액 A와 B는 기초배지의 1/2 양으로 사용한다.

4.2.2 액체배지에 보존균을 접종한다. 필요하면 16~24시간 정도 같은 배지에 2~3회 배양한다.

4.2.3 증식된 균체는 3,000 rpm에서 원심분리하여 0.9% NaCl용액으로 3회 세정한 후, 적당한 농도의 균액(배지의 5~100배 용량의 0.9% NaCl용액을 가한다)이 될 때까지 희석하여 접종균액으로 한다. 이 균액을 접종하는 모든 실험 조작은 무균적으로 행해야 한다.

4.3 기초배지

4.3.1 염류용액 A

4.3.1.1 KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 각 5 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

4.3.2 염류용액 B

4.3.2.1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g 및 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

4.3.3 카제인 산분해용액

4.3.3.1 비타민이 포함되어 있지 않은 카제인 100 g을 95% 알코올로 2회 세정한다.

4.3.3.2 5배 양의 20% HCl을 가해서 8~12시간 동안 가열 환류 하거나 또는 멸균기에서 121°C로 8~12시간 가열한다

4.3.3.3 점액의 형태가 될 때까지 감압하여 HCl을 제거하고, 여기에 물 200 mL를 가해 감압 하에서 HCl을 제거한다.

4.4 시험조작

4.4.1 특별한 기준이 없을 경우, 배양액은 5 mL 또는 10 mL로 한다. 정량하고자 하는 비타민의 표준계열은 동질, 동형의 시험관을 사용한다.

4.4.2 각 농도에 관해서 2~3개씩 4~8단계로 하며, 비타민표준용액을 포함하지 않는 시험관을 공시험용으로 하여 4~6개 준비한다.

4.4.3 총량이 5 mL일 경우 기초배지는 2.5 mL를 사용하고, 10 mL일 경우 기초배지는 5 mL를 가한 후, 물을 가해서 각각 5 mL 또는 10 mL로 만든다.

4.4.4 시험용액의 계열은 각 시험법에 규정된 방법으로 제조한 시험용액에 관해서 각 농도별로 시험관을 각각 2~3개씩 보통 4단계로 하고 표준계열과 같은 방법으로 동량의 기초배지를 가한 후 물을 가해서 표준계열과 동량으로 한다.

4.4.5 분주가 끝나면 면전하여 121°C의 조건에서 5분간 가압 살균한다.

4.4.6 표준용액을 포함하지 않은 시험관은 1조(2~3개)를 제거하고, 각 시험관에 점종액 1방울씩을 무균적으로 가한 후, 30~37°C에서 16~24시간 배양 후 탁도법에 의하여 증식도를 측정한다.

4.4.7 증식도를 탁도법으로 측정할 때는 각 시험관의 내용물을 10 mm 직경의 흡수 cell에 옮기고 비타민 표준용액을 포함하지 않고 또한 균액을 접종하지 않는 시험관의 투과도를 100%로 하여, 분광광도기 에서 540~610 nm의 파장으로 투과도 또는 흡광도를 구한다.

4.4.8 잡균이 혼입된 것이 밝혀진 경우나 기초배지 또는 접종균액 중에 정량하고자 하는 비타민이 혼재해서 표준용액을 넣지 않은 대조 시험관에서의 증식이 느린 경우(투과율 90% 이하) 및 표준계열에 의한 최고의 증식이 소정의 증식도에 달하지 않을 때(투과율 40% 이상)는 다시 시험한다.

<엽산정량조작법>

4.1 시액 및 표준용액의 조제

4.1.1 엽산 보존용액

4.1.1.1 P_2O_5 를 넣은 데시케이터에서 건조시킨 엽산 표준물질 50 mg을 정확하게 취하여 500 mL의 메스플라스크에 넣어 0.01 N NaOH 용액 약 30 mL로 녹인다.

4.1.1.2 물 약 300 mL를 가한 후 HCl로 pH를 7~8로 조정하고 물을 가하여 500 mL로 만든다.

4.1.1.3 톨루엔을 가하여 약 10°C로 보존한다. 이 용액 1 mL는 엽산 100 μ g을 포함한다.

4.1.2 엽산 표준용액

4.1.2.1 엽산 보존용액을 물로 희석해서 1 mL에 엽산 2 μ g을 포함 하도록 한다. 사용 시 조제한다.

4.1.3 시스틴 트립토판용액

4.1.3.1 L-시스틴 2 g 및 L-트립토판 0.5 g(또는 DL-트립토판 1 g)을 350~400 mL의 물로 희석한다.

4.1.3.2 70~80°C로 가열하고, 고형물이 녹을 때까지 20% HCl을 첨가 한다.

4.1.3.2 식힌 후 물을 가해서 전량을 500 mL로 만들고, 톨루엔 소량을 가하여 10°C에 보관한다.

4.1.4 아데닌-구아닌-우라실용액

- 4.1.4.1 아데닌황산염, 구아닌염산염 및 우라실 각 0.1 g을 20% HCl 5 mL로 가열하면서 녹인다.
- 4.1.4.2 식힌 후 물을 가하여 100 mL로 만들고, 톨루엔 소량을 가하여 10°C에 보관한다.
- 4.1.5 카제인 산분해용액
3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량 용기초배지에 따른다.
- 4.1.6 염류용액 B
3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량 용기초배지에 따른다.
- 4.1.7 크산틴용액
4.1.7.1 물 약 80 mL에 크산틴 0.4 g을 가한다.
4.1.7.2 70°C로 가열하면서 10% 암모니아수 12 mL를 가하여 크산틴이 녹을 때까지 젓는다.
4.1.7.3 식힌 후 물을 가하여 400 mL로 만든다. 톨루엔을 가하여 보존한다.
- 4.1.8 비타민용액
4.1.8.1 파라아미노안식향산 10 mg, 피리독신염산염 40 mg, 비타민 B₁염산염 4 mg, 판토텐산 칼륨 8 mg, 니코틴산 8 mg 및 비오틴 0.2 mg을 약 300 mL의 물로 녹인다.
4.1.8.2 비타민 B₁₂ 10 mg을 0.02 N 초산으로 녹인 용액 200 mL를 가한다.
4.1.8.3 무수초산나트륨 1.9 g과 초산 1.6 mL를 40 mL의 물로 녹인 용액을 가한 후, 물을 가해서 2 L로 만든다. 톨루엔을 가하여 보존한다.
- 4.1.9 아스파라긴 용액
4.1.9.1 L-아스파라긴 8 g을 물에 용해해서 800 mL로 만든다. 톨루엔을 가하여 보존한다.
- 4.1.10 MnSO₄ 용액
4.1.10.1 MnSO₄·4H₂O 2 g을 물에 용해해서 200 mL로 만든다. 톨루엔을 가하여 보존한다.
- 4.1.11 폴리솔베이트 80 용액

4.1.11.1 폴리솔베이트 80(Polyoxyethylene sorbitan monooleate) 25 g을 에탄올로 녹여 250 mL로 만든다.

4.2 기초배지의 제조

4.2.1 카제인 산분해용액 10 mL, 시스틴-트립토판용액 20 mL, 아스파라긴 용액 3 mL, 아데닌-구아닌-우라실용액 1 mL, 크산틴용액 2 mL, 비타민용액 20 mL, 염류용액 B 2 mL, MnSO_4 용액 2 mL 및 폴리솔베이트 80 용액 0.1 mL를 잘 섞고바릴티로신 표준물질 6 mg을 정밀히 측정한다.

4.2.2 포도당 4 g, 인산이칼륨(K_2HPO_4) 0.64 g 및 구연산나트륨($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 5.2 g을 가하여 녹인다.

4.2.3 10% NaOH용액으로 pH를 6.8로 조정 한 후, 물을 가하여 100 mL로 만든다. 불용물질이 있으면 여과한다.

4.2.4 Folic acid assay medium(Difco)을 사용할 수 있다.

4.3 접종균액의 제조

4.3.1 *Streptococcus faecalis*의 보존균주

4.3.1.1 물 100 mL에 효모엑기스 2 g을 녹이고 여기에 포도당 0.5 g, 무수초산나트륨 0.5 g을 가하여 pH를 6.8로 조정한다.

4.3.1.2 수욕 상에서 10~20분간 가열하여 여과한 후 한천 1.5 g을 가하여 한천이 용해될 때까지 수욕 상에서 세게 혼합하면서 가열한다.

4.3.1.3 뜨거운 상태에서 10 mL씩을 시험관에 분주하여 면전하고 121°C에서 10분간 가압멸균한 후 시험관을 수직으로 세워 식힌다.

4.3.1.4 *Streptococcus faecalis* ATCC 8043의 보존균주를 멸균된 배지 10 mL에 접종하여 37°C에서 16~24시간 배양하여 냉소에 보관한다.

4.3.1.5 보존균주는 매주 새로 배양하고 1주를 넘은 것은 사용하지 않는다.

4.3.2 배지

4.3.2.1 천을 제외한 보존배지로 조제한 액체배지 2 mL를 소시험관에 분주하여 면전한다.

4.3.2.2 121°C에서 10분간 가압 멸균하여 방냉한다.

4.3.3 접종균액

4.3.3.1 *Streptococcus faecalis*의 보존균주로부터 멸균된 배지에 접종 한다.

4.3.3.2 7°C에서 16~24시간 배양 후 증식된 균체를 무균적으로 원심 분리한다.

4.3.3.3 0.9% NaCl 용액으로 2회 세척한 후, 0.9% NaCl 용액 약 2 mL를 가해서 접종균액으로 한다.

4.4 시험용액 제조

4.4.1 일정량의 시료를 플라스크에 넣고, 여기에 적어도 시료의 10배량의 물을 가한다. 이 때 이 액 1 mL는 엽산 1 mg 이상을 포함하여야 한다.

4.4.2 약 10% 암모니아수를 100 mL당 2 mL의 비로 가해서 잘 섞고, 가압멸균기에 넣어 121°C에서 약 15분간 가열한 후 식힌다.

4.4.3 물을 가해 일정량으로 하여 여과 또는 원심분리하여 투명한 용액으로 만든다.

4.4.4 pH를 6.8로 조정한 후, 물을 가하여 적당히 희석한 것을 시험용액으로 한다. 시험용액 1 mL는 엽산 약 2 µg을 포함하도록 조제한다.

4.5 시험조작

4.5.1 엽산표준용액의 계열을 만들기 위해서 시험관 2개씩에 엽산표준용액 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75 및 2.0 mL를 취하여 각 시험관에 기초배지 2 mL 및 물을 가해서 각각 4 mL로 만든다.

4.5.2 시험용액의 계열은 시험관 3개씩에 시험용액 0.5, 1.0 및 1.5 mL를 가하고 각 시험관에 기초배지 2 mL 및 물을 가하여 4 mL로 만든다.

4.5.3 시험관의 내용물을 잘 섞어 면전하고 121°C에서 5분간 가압 멸균하여 식힌 후 각 시험관에 접종균액 1방울씩을 무균적으로 접종하여 37°C에서 20~24시간 배양한다.

4.5.4 탁도법에 의하여 균의 증식도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 탁도법에 의한 계산

- 5.1.1 검량선을 작성할 때는 횡축에는 표준용액의 농도 또는 mL 수의 대수를, 종축에는 투과도 또는 흡광도를 취한다.
 - 5.1.2 표준용액의 각 농도단계에 관해서 얻어진 투과도 또는 흡광도의 평균치를 구해, 그 값(y)을 정점으로 해서 직선을 그린다.
 - 5.1.3 실험용액의 각 농도단계에 관해서 투과도 또는 흡광도를 구해, 횡축에 시료의 g 수 또는 시료용액 mL 수의 대수를 임의로 취하여 실험치 y를 정점으로 하여 직선을 그린다. 적어도 3점 이상이 직선을 구성하여야 한다.
 - 5.1.4 표준용액 및 실험용액은 직선으로 평행하는 부분에 관해서 실험용액 1 mL 또는 시료 1 g당의 함유량을 구해 계산식에 따라 시료 중의 비타민 함유량을 산출한다.
- 5.2 탁도법에 의한 계산식

[계산식]

$$\text{비타민함량} = \text{실험용액의 비타민함량} \times \frac{\text{희석농도}}{\text{시료채취량}}$$

3-11-2 엽산(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)으로 추출하고 역상 분배형 컬럼을 이용하여 액체크로마토그래프에서 분리하고 UV 280 nm에서 측정한다.

2. 장비와 재료

2.1. 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(50 mL)
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.3 용매용 일회용 실린지
- 2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.5 원심분리기

2.2. 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

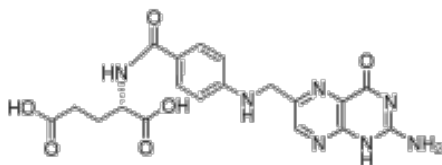
이동상은 A용액(Tetrabutyl ammonium bromide 용액), 아세토니트릴을 이용하여 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1. 표준물질

3.1.1 엽산(Folic acid)

분자식 : $C_{19}H_{19}N_7O_6$, 분자량 : 441.40, CAS No. : 59-30-3



3.2. 일반시약

3.2.1 인산수소이나트륨(Disodium hydrogen phosphate)

3.2.2 증류수(Distilled water)

3.2.3 인산이수소나트륨(Sodium dihydrogen phosphate)

3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.5 테트라부틸암모늄 브로마이드(Tetrabutylammonium bromide)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)

10 mM 인산수소이나트륨 용액에 10 mM 인산이수소나트륨 용액을 가하여 pH 8.0로 조정하여 제조한다.

4.1.2 이동상 A

Tetrabutylammonium bromide 1.6120 g (5 mM)을 pH 7.2로 조정한 인산완충용액을 가하여 1 L가 되게 한 뒤 0.22 μ m 필터로 여과하여 조제한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 엽산 표준품(99.9%)를 0.1 N NaOH 수용액에 녹여 1000 mg/L가 되도록 조제한다.

4.2.2 표준원액을 이동상 A로 희석하여 10 mg/L로 조제한다.(사용 시 제조)

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 시료 일정량을 정밀히 취한다.

4.3.2 위의 시료를 50 mL 갈색 부피플라스크에 넣고 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 넣는다.

4.3.3 30분 동안 초음파 추출한다.

4.3.4 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.3.5 35,000 G로 10분간 원심분리를 하고 상등액을 취해 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표.1 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
컬럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	이동상 A : 아세토니트릴 = 8 : 2
검출기파장	280 nm
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 $\text{엽산(mg/100g)} = C \times (a \times b) / S \times 100 / 1,000$

C : 시험용액 중의 엽산의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-11-3 엽산(메틸테트라히드로엽산글루코사민)(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 메틸테트라히드로엽산을 아황산나트륨 용액으로 추출하고 역상칼럼을 이용하여 액체크로마토그래프 에서 분리하고 PDA 검출기로 280 nm에서 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 원심분리기

2.1.4 원심분리관(50 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 포토다이오드어레이(Photodiode Array, PDA) 검출기

2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼 (안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Octadecylsilica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

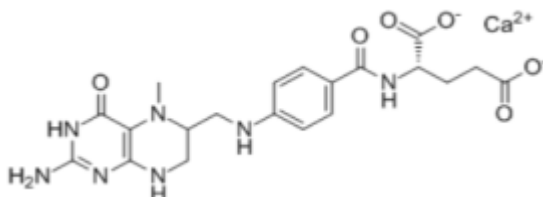
이동상 A(인산이수소칼륨) 용액을 이용하여 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 메틸테트라히드로엽산칼슘(L-5-Methyltetrahydrofolate calcium)

분자식 : $C_{20}H_{23}CaN_7O_6$, 분자량 : 497.5 g/mol, CAS No. : 151533-22-1



3.2. 일반시약

3.2.1 아황산나트륨(Sodium sulfite)

3.2.2 인산이수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate)

3.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.4 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

4. 시험과정

4.1 시약 조제

4.1.1 이동상 A

6.8 g의 인산이수소칼륨을 증류수에 녹여 1 L로 한 후 20% 수산화 칼륨 용액을 가하여 pH 6.5로 조절한다.

4.1.2 이동상 B

4.08 g의 인산이수소칼륨을 증류수 650 mL에 녹이고 아세토니트릴 350 mL를 혼합한 후 20% 수산화칼륨 용액을 이용하여 pH 8.0로 조절한다.

4.2 표준용액 조제

4.2.1 메틸테트라히드로엽산칼슘을 메틸테트라히드로엽산으로서 5 mg 취하고 1.5% 아황산나트륨용액 50 mL에 녹여 표준원액으로 한다.

4.2.2 표준원액을 1.5% 아황산나트륨 용액으로 적당히 희석하여 표준용액 으로 한다.

4.3 시험용액 조제

4.3.1 엽산으로서 약 0.5 mg을 함유하는 시료를 정밀히 취하고 1.5% 아황산나트륨 용액 50 mL로 정용한다.

4.3.2 20분동안 초음파 추출한다.

4.3.3 2,000 × g로 10분간 원심분리 하고 상등액을 취해 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	32°C
이동상	A: 인산이수소칼륨 (pH 6.5) B: 인산이수소칼륨 : 아세트니트릴(pH 8.0) = 65 : 35
검출기파장	280 nm
유속	1.0 mL/min

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	100	0
15	80	20
30	100	0
40	100	0

5.2 계산

엽산의 함량(mg/100 g) = $(C \times (a \times b) / S) \times 0.96 \times 100$

C : 시험용액 중 메틸테트라히드로엽산의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

S : 시료채취량(mg)

0.96 : 메틸테트라히드로엽산의 엽산으로의 전환계수

3-12 비타민 B₁₂

3-12-1 비타민 B₁₂(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 비타민 B₁₂을 준비된 배지에 가한 후 균을 접종하여 배양 후 탁도법에 의한 증식도를 측정한 후, 공시험을 투과도 100%로 하여 분광광도기에서 540~610 nm의 파장으로 흡광도를 구하여 탁도 측정에 의해 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 항온기
- 2.1.2 건조기
- 2.1.3 멸균기
- 2.1.4 무균대
- 2.1.5 시험관
- 2.1.6 피펫
- 2.1.7 원심분리기
- 2.1.8 데시케이터
- 2.1.9 메스플라스크

2.2 분석장비

- 2.2.1 분광광도계

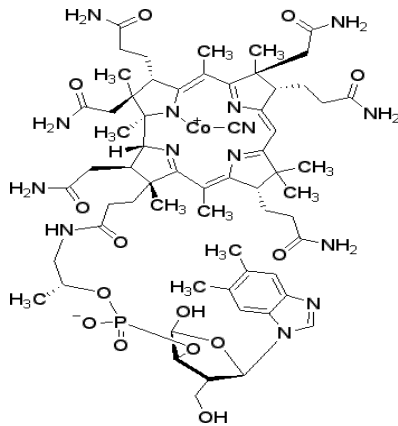
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Cyanocob(III)alamin

α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)cyanocobamide

분자식 : C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P, 분자량 : 1355.37, CAS No. : 68-19-9



3.2 일반시약

- 3.2.1 에탄올(Ethanol)
- 3.2.2 초산(Acetic acid)
- 3.2.3 염산(Hydro chloride)
- 3.2.4 수산화나트륨(Sodium chloride)

4. 시험과정

<일반정량조작법>

4.1 시험균의 보존

- 4.1.1 유산균류는 고층한천배지에 보존하며, 효모엑기스 분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, KH_2PO_4 0.2%, 한천 1.5%의 조성으로 한다.
- 4.1.2 효모류는 사면한천배지에 보존하며, 효모용은 맥아엑기스분말 3%, 한천 1.5% 조성으로 한다.
- 4.1.3 위의 배지에 한천을 가하기 전에 각 성분을 잘 녹이고 pH를 6.8~7.0으로 조정하여 여과한 후, 한천을 가하여 가온 상태에서 10 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한다.
- 4.1.4 균은 접종하여 유산균은 37°C, 효모는 30°C에서 약 20시간 배양한다. 배양 후 5°C에 보존하면서 1~3주 간격으로 새로 배양한다. 사용하지 않을 때에는 동결건조법에 의해 보존한다.

4.2 접종균액

- 4.2.1 유산균 접종배지는 효모엑기스분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, 염류용액 A와 B는 기초배지의 1/2 양으로

사용한다.

4.2.2 액체배지에 보존균을 접종한다. 필요하면 16~24시간 정도 같은 배지에 2~3회 배양한다.

4.2.3 증식된 균체는 3,000 rpm에서 원심분리하여 0.9% NaCl용액으로 3회 세정한 후, 적당한 농도의 균액(배지의 5~100배 용량의 0.9% NaCl용액을 가한다)이 될 때까지 희석하여 접종균액으로 한다. 이 균액을 접종하는 모든 실험 조작은 무균적으로 행해야 한다.

4.3 기초배지

4.3.1 염류용액 A

KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 각 5 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

4.3.2 염류용액 B

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g 및 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g 을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

4.3.3 카제인 산분해용액

4.3.3.1 비타민이 포함되어 있지 않은 카제인 100 g을 95% 알코올로 2회 세정한다.

4.3.3.2 5배 양의 20% HCl을 가해서 8~12시간 동안 가열 환류 하거나 또는 멸균기에서 121°C로 8~12시간 가열한다.

4.3.3.3 점액의 형태가 될 때까지 감압하여 HCl을 제거하고, 여기에 물 200 mL를 가해 감압 하에서 HCl을 제거한다.

4.4 시험조작

4.4.1 특별한 기준이 없을 경우, 배양액은 5 mL 또는 10 mL로 한다. 정량 하고자 하는 비타민의 표준계열은 동질, 동형의 시험관을 사용한다.

4.4.2 각 농도에 관해서 2~3개씩 4~8단계로 하며, 비타민표준용액을 포함하지 않는 시험관을 공시험용으로 하여 4~6개 준비한다.

4.4.3 총량이 5 mL일 경우 기초배지는 2.5 mL를 사용하고, 10 mL일 경우 기초배지는 5 mL를 가한 후, 물을 가해서 각각 5 mL 또는 10 mL로 만든다.

4.4.4 시험용액의 계열은 각 시험법에 규정된 방법으로 제조한

시험용액에 관해서 각 농도별로 시험관을 각각 2~3개씩 보통 4단계로 하고 표준계열과 같은 방법으로 동량의 기초배지를 가한 후 물을 가해서 표준계열과 동량으로 한다.

- 4.4.5 분주가 끝나면 면전하여 121°C의 조건에서 5분간 가압 살균한다.
- 4.4.6 표준용액을 포함하지 않은 시험관은 1조(2~3개)를 제거하고, 각 시험관에 접종액 1방울씩을 무균적으로 가한 후, 30~37°C에서 16~24시간 배양 후 탁도법에 의하여 증식도를 측정한다.
- 4.4.7 증식도를 탁도법으로 측정할 때는 각 시험관의 내용물을 10 mm 직경의 흡수 cell에 옮기고 비타민 표준용액을 포함하지 않고 또한 균액을 접종하지 않는 시험관의 투과도를 100%로 하여, 분광광도기에서 540~610 nm의 파장으로 투과도 또는 흡광도를 구한다.
- 4.4.8 잡균이 혼입된 것이 밝혀진 경우나 기초배지 또는 접종균액 중에 정량하고자 하는 비타민이 혼재해서 표준용액을 넣지 않은 대조 시험관에서의 증식이 느린 경우(투과율 90% 이하) 및 표준계열에 의한 최고의 증식이 소정의 증식도에 달하지 않을 때(투과율 40% 이상)는 다시 시험한다.

<비타민 B₁₂ 정량조작법>

4.1 시액 및 표준용액의 조제

4.1.1 시아노코발아민 보존용액

- 4.1.1.1 데시케이터 중에서 건조시킨 시아노코발아민 표준물질을 시아노코발아민의 양이 50~60 µg에 해당되도록 정확히 칭량하여 25% 알코올을 가한 후 mL당 100 ng의 농도가 되도록 표준용액 농축액을 만든다. 농축액은 10°C에 보관한다.

4.1.2 시아노코발아민 표준용액

- 4.1.2.1 용액에 일정량의 증류수를 가하여 500 mL로 희석한다.
- 4.1.2.2 표준용액의 농도는 mL당 0.01~0.04 ng에 해당하는 농도로서, 시료의 농도와 유사하도록 한다.
- 4.1.2.3 위와 같은 방법으로 시료 중의 비타민 B₁₂ 농도보다 높은 농도 및 낮은 농도(예 : 0.010 ng/mL와 0.020 ng/mL)의 표준용액을 준비한다.

4.1.3 아데닌-구아닌-우라실 용액

4.1.3.1 아데닌황산염, 구아닌염산염, 우라실 1.0 g을 50 mL의 가온한 HCl로 용해하고(1 + 1) 물을 가하여 1 L로 만든다.

4.1.4 아스파라긴 용액

4.1.4.1 L-아스파라긴 10 g을 물로 녹이고 1 L로 만든다.

4.1.5 폴리솔베이트 80 용액

4.1.5.1 폴리솔베이트 80 25 g을 알코올로 녹여 250 mL로 만든다.

4.1.6 염류용액 A

4.1.6.1 3-9 판토텐산 1) 일반정량조작법 (5) 정량용 기초배지에 따른다.

4.1.7 염류용액 B

4.1.7.1 3-9 판토텐산 1) 일반정량조작법 (5) 정량용 기초배지에 따른다.

4.1.8 비타민용액

4.1.8.1 비타민 B₂ 25 mg, 비타민 B₁염산염 25 mg, 비오틴 0.25 mg, 나이아신 50 mg을 0.02 N 초산으로 녹이고 1 L로 만든다.

4.1.9 비타민용액 II

4.1.9.1 파라아미노벤조산(PABA) 50 mg, 판토텐산 25 mg, 피리독신 염산염 100 mg, 피리독살염산염 100 mg, 피리독사민염산염 20 mg, 엽산 5 mg을 25% 알코올로 녹이고 1 L로 만든다.

4.1.10 부유배지(Suspension medium)

4.1.10.1 기초배지 5 mL를 동량의 물로 희석하여 시험관에 넣고 면전한다.

4.1.10.2 121°C에서 15분간 멸균한 후 빨리 식힌다. 10°C의 암소에 저장한다.

4.1.11 크산틴용액

4.1.11.1 크산틴 1.0 g을 150~200 mL의 물로 녹이고 약 70°C로 가열하면서, 30 mL의 NH₄OH(2 + 3)를 넣고 완전히 녹을 때까지 저은 후 물을 가하여 1 L로 만든다.

4.1.12 카제인 산분해용액

4.1.12.1 3-9-1 판토텐산 1) 일반정량조작법 (5) 정량용 기초배지에 따른다.

4.2 기초배지의 제조

4.2.1 비타민 B₁₂가 포함되어 있지 않은 2배농도의 기초배지 1 L를 준비하기 위하여 다음의 물질들을 순서대로 첨가한다.

4.2.2 아데닌-구아닌-우라실용액 20 mL, 아스파라긴용액 20 mL, 염류용액 A 20 mL, 염류용액 B 20 mL, 비타민용액 I 40 mL, 비타민용액 II 40 mL, 크산틴용액 20 mL, 폴리솔베이트 80 용액 20 mL를 넣은 후 증류수를 가하여 약 800 mL로 만든다.

4.2.3 산가수분해카제인 10 g, L-시스틴 0.4 g, DL-트립토판 0.4 g을 최소량의 묽은 염산(236 mL 진한염산/L)으로 녹인 용액과 포도당 40 g, sodium acetate trihydrate 33.2 g, 아스코브산 4 g을 순서대로 넣는다. 아스코브산을 가한 후에는 강하게 교반하지 않아야 한다.

4.2.4 모든 고형분이 완전히 녹을 때까지 가볍게 젓는다.

4.2.5 HCl 또는 NaOH를 사용하여 pH를 6.0으로 조정한다. 지시약을 사용할 때는 지시약이 폴리솔베이트를 흡수하기 때문에 pH를 조정한 후 폴리솔베이트용액을 넣는다. vitamin B₁₂ assay medium(Difco)을 사용할 수 있다.

4.3 접종균액의 제조

4.3.1 *Lactobacillus leichmannii*의 보존균주

4.3.1.1 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830은 배양배지에 천자배양(stab culture)한다. 37°C에서 6~24시간 배양하여 10°C의 암소에 저장한다.

4.3.1.2 분석하기 전 1~2주 간격으로 계속 배양하고, 최소한 1주일에 1번 정도로 새로 준비한다.

4.3.2 액체배양배지

4.3.2.1 Peptonized milk 15 g, 효모엑기스 5 g, 포도당 10 g, KH₂PO₄ 2 g을 600 mL의 물로 용해한다.

4.3.2.2 여과한 tomato juice 100 mL를 가한 후 NaOH로 pH를 6.5~6.8로 조정한다.

4.3.2.3 저으면서 10 mL의 폴리솔베이트 80을 첨가하고 물로 희석하여 1 L로 만든다. Lactobacilli broth AOAC(Difco)를 사용할 수 있다.

4.3.2.4 1 mL당 1 ng의 비타민 B₁₂를 포함하도록 동량의 물로

희석하여 시험관에 10 mL씩 분주한 후, 면전하여 121°C에서 15분간 멸균하여 빨리 식히고 냉장고에 보관한다.

4.3.3 배양배지

4.3.3.1 액체배양배지 500 mL에 5~7.5 g의 agar를 넣고 agar가 녹을 때까지 수욕 상에서 젓는다.

4.3.3.2 뜨거운 상태에서 10 mL를 취하여 시험관에 넣고 121°C로 15분간 멸균한 후 똑바로 세워 빨리 식히고 10°C의 암소에 저장한다. Lactobacilli agar AOAC(Difco)를 사용할 수 있다.

4.3.4 접종균액

4.3.4.1 *L. leichmannii*의 보관균주를 2개의 액체배양배지에 접종하여 37°C에서 6~24시간 배양 후 원심분리하여 상등액은 버리고 0.9% NaCl 용액 또는 부유배지 10 mL로 3회 세척한다.

4.3.4.2 부유배지를 100% T로 고정하고 이에 대하여 판독할 때, 시험관 당 0.50~0.75의 건조량에 상응되는 T 값이 주어지도록 0.9% NaCl 용액 또는 부유배지로 일정량을 희석한다.

4.3.3.3 위와 같이 준비한 것을 접종액으로 한다.

4.4 시험용액 제조

4.4.1 Na₂HPO₄ 1.3 g, 구연산 1.2 g, sodium metabisulfite(Na₂S₂O₅) 1.0 g 을 넣은 용액 100 mL를 사용 전에 준비한다.

4.4.2 비타민 B₁₂의 농도가 50~100 ng이 되도록 시료의 양을 취한 후 mL당 0.01에서 0.04 ng의 비타민 B₁₂ 최종분석 농도에서 추출 용액을 sodium metabisulfite의 농도가 mL당 0.03 mg을 넘지 않도록 첨가한다.

4.4.3 액상으로 시료용액을 완전히 분산시키고 물로 비커의 아랫부분을 세정하여 혼합물을 121°C에서 10분간 멸균하여 식힌다. 만일 덩어리가 생기면 입자가 완전히 녹을 때까지 혼합물을 젓는다.

4.4.4 세게 흔들면서 pH를 4.5로 조정하고, 비타민 B₁₂의 농도가 mL당 0.2 ng이 되도록 물로 희석하여 여과한다.

4.4.5 pH를 6.0으로 조정한 후 물을 가하여 적당히 희석한 것을 시험 용액으로 한다. 시험용액 1 mL는 비타민 B₁₂ 0.014 ng을 포함 하도록 조제한다.

4.5 시험조작

- 4.5.1 비타민 B₁₂의 표준용액과 분석용액의 계열을 다음과 같이 준비한다. 두 개의 시험관에 표준용액을 0(비접종 blank), 0(접종 blank), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0과 5.0 mL씩 넣는다.
- 4.5.2 분석시료는 2개 시험관에 분석용액을 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL씩 넣는다. 표준용액과 분석용액의 각 시험관에 물을 넣어 5 mL로 만든 후, 5 mL의 기초배지를 넣고 잘 섞는다.
- 4.5.3 면전하여 121°C에서 10분간 고압 멸균하여 빨리 식힌다. 비접종 공시험용 시험관을 제외한 각 시험관에 접종액 1방울씩을 무균적으로 접종하여 37°C에서 16~24시간 배양한다.
- 4.5.4 각 시험관의 내용물을 완전히 혼합하여 흡수 cell에 옮기고, 비접종 시험관의 투과도를 100%로 고정하여 각 시험관의 투과도를 구한다.
- 4.5.5 시아노코발아민 표준계열에 의한 흡광도의 평균치로부터 검량선을 작성한다. 표준곡선으로부터 분석용액의 각 시험관의 비타민양을 정한다. 표준용액의 T값이 0.5 mL 이하 또는 4.5 mL 이상으로 관찰되면 무시한다.
- 4.5.6 시험에 사용한 분석용액의 농도(비타민함량/mL)를 계산한다. 각 시험관 결과치의 평균을 구하되, 평균으로부터 10%이내의 오차를 보이는 결과만을 취하여 계산한다.
- 4.5.7 분석용액의 4단계에 사용한 시험관 중 2/3미만이 적합한 결과를 보인 경우, 이 결과는 시료의 비타민 B₁₂ 함량 결정에는 불충분하다. 2/3 이상의 시험관의 결과가 적합한 경우라면, 그 평균값으로부터 시료의 역가를 구한다.

5. 분석 및 계산

5.1 탁도법에 의한 계산

- 5.1.1 검량선을 작성할 때는 횡축에는 표준용액의 농도 또는 mL 수의 대수를, 종축에는 투과도 또는 흡광도를 취한다.
- 5.1.2 표준용액의 각 농도단계에 관해서 얻어진 투과도 또는 흡광도의 평균치를 구해, 그 값(y)을 정점으로 해서 직선을 그린다.
- 5.1.3 실험용액의 각 농도단계에 관해서 투과도 또는 흡광도를 구해, 횡축에 시료의 g수 또는 시료용액 mL 수의 대수를 임의로 취하여

실험치 y 를 정점으로 하여 직선을 그린다. 적어도 3점 이상이 직선을 구성하여야 한다.

5.1.4 표준용액 및 시험용액은 직선으로 평행하는 부분에 관해서 시험용액 1 mL 또는 시료 1 g당의 함유량을 구해 계산식에 따라 시료 중의 비타민 함량을 산출한다.

5.2 탁도법에 의한 계산식

[계산식]

$$\text{비타민함량} = \text{시험용액의 비타민함량} \times \frac{\text{희석농도}}{\text{시료채취량}}$$

3-12-2 비타민 B₁₂(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 비타민 B₁₂을 이동상으로 추출하고 액체크로마토그래프(육방전환밸브시스템)/자외부흡광광도검출기(최대 흡수파장 550 nm) 또는 액체크로마토그래프/질량분석기를 이용하여 정량 분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 용매용 일회용 실린지
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.4 부피플라스크(50 mL)
- 2.1.5 원심분리기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

- 2.2.1.1 액체크로마토그래프
- 2.2.1.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.1.3 육방전환밸브시스템
- 2.2.1.4 전처리칼럼 : Capcellpak MF C₈(안지름 4.6 mm, 길이 150 mm, 충전입자 크기 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- 2.2.1.5 농축칼럼 : Capcellpak MG C₁₈(안지름 2.0 mm, 길이 35 mm, 충전입자크기 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- 2.2.1.6 분석칼럼 : Capcellpak UG C₁₈(안지름 1.5 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 µm) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량분석기

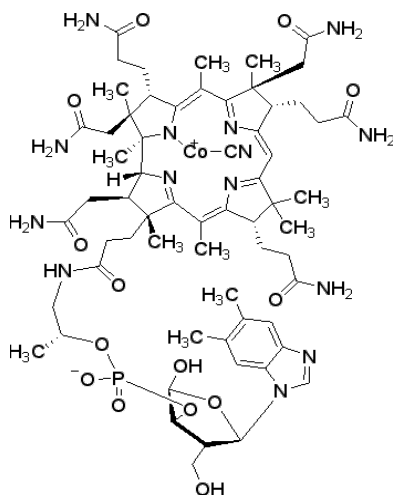
- 2.2.2.1 액체크로마토그래프
- 2.2.2.2 질량분석기
- 2.2.2.3 칼럼 : ACQUITY UPLC®BEH(안지름 2.1 mm, 길이 50 mm, 충전입자크기 1.7 µm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Cyanocob(III)alamin(α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)cyanocobamide)

분자식 : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$, 분자량 : 1355.37, CAS No. : 68-19-9



3.2 일반시약

3.2.1 인산이수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4)

3.2.2 클로로포름(Chloroform)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 메탄올(Methanol)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 5 mM 인산이수소칼륨용액

인산이수소칼륨 0.68 g을 증류수에 녹이고 전량을 1 L가 되게 한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 표준원액

비타민 B₁₂(Cyanocobalamin)를 5 mM 인산이수소칼륨용액에 녹여 표준원액(100 μ g/mL)을 조제한다.

4.2.2 표준용액

표준원액을 증류수로 적당히 희석하여 표준용액을 만든다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 검체 적당량(0.1~1 g)을 취하여 마쇄기를 이용하여 잘게 부순 후 5 mM 인산이수소칼륨용액 40 mL와 클로로포름 5 mL를 가하여 10분간 초음파 진탕기로 추출한 후 클로로포름을 제거하고 5 mM 인산이수소칼륨용액으로 50 mL로 맞춘다.

4.3.2 4,500 × g에서 원심분리한다.

4.3.3 분리 후 중간층을 취해서 4,500 × g에서 10분간 원심분리한다.

4.3.4 마지막으로 맑은 액층을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	200 μL
칼럼온도	35°C
이동상	전처리칼럼 : 5 mM 인산이수소칼륨(KH ₂ PO ₄) 용액 분석칼럼 : 5 mM 인산이수소칼륨(KH ₂ PO ₄) 용액/ 메탄올(MeOH)(80:20)
검출기 파장	550 nm
유량	전처리칼럼 : 500 μL/분 분석칼럼 : 120 μL/분

표 2. 액체크로마토그래프/질량분석기 조건(예)

항목	조건		
주입량	2 μL		
유량	0.4 mL/분		
칼럼온도	35℃		
	A : 20 mM 개미산암모늄		
	B : 아세토니트릴		
이동상	시간(분)	이동상(%)	
		A	B
	0	95	5
	0.7	95	5
	1.2	80	20
	1.6	80	20
	1.7	20	80
	3.7	20	80
	3.8	95	5
	6.0	95	5
이온화	ESI, positive		
Monitoring ion(m/z)	678(precusor ion), 147, 359(fragment ion)		
Capillary Voltage	3.5 kV		
Source Temp.	120℃		
Desolvation Temp.	350℃		

5.2 계산

5.2.1 계산식

$$\text{비타민 B}_{12}(\mu\text{g}/100 \text{ g}) = S \times \frac{a \times b}{\text{검체량(g)}} \times \frac{100}{1,000}$$

S : 시험용액 중의 비타민 B₁₂의 농도(ng/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

3-13 비오틴

3-13-1 비오틴(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 비오틴을 준비된 배지에 가한 후 균을 접종하여 배양 후 탁도법에 의한 증식도를 측정한 후, 공시험을 투과도 100%로 하여 분광광도계에서 540~610 nm의 파장으로 흡광도를 구하여 탁도 측정에 의해 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 항온기
- 2.1.2 건조기
- 2.1.3 멸균기
- 2.1.4 무균대
- 2.1.5 시험관(10~15 mL)
- 2.1.6 피펫
- 2.1.7 삼각플라스크(50 mL)

2.2 분석장비

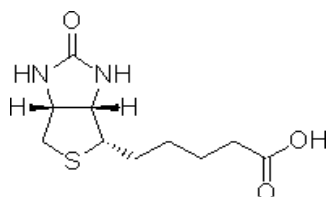
- 2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Biotin

분자식 : $C_{10}H_{16}N_2O_4S$, 분자량 : 244.31, CAS No. : 58-85-5



3.2 일반시약

- 3.2.1 에탄올(Ethanol)
- 3.2.2 염산(Hydrochloric acid)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 초산(Acetic acid)
- 3.2.5 수산화나트륨(Sodium chloride)

4. 시험과정

<일반정량조작법>

4.1 시험균의 보존

- 4.1.1 유산균류는 고층한천배지에 보존하며, 효모엑기스 분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, KH_2PO_4 0.2%, 한천 1.5%의 조성으로 한다.
- 4.1.2 효모류는 사면한천배지에 보존하며, 효모용은 맥아엑기스분말 3%, 한천 1.5% 조성으로 한다.
- 4.1.3 위의 배지에 한천을 가하기 전에 각 성분을 잘 녹이고 pH를 6.8~7.0으로 조정하여 여과한 후, 한천을 가하여 가온 상태에서 10 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한다.
- 4.1.4 균은 접종하여 유산균은 37°C, 효모는 30°C에서 약 20시간 배양한다. 배양 후 5°C에 보존하면서 1~3주 간격으로 새로 배양한다. 사용하지 않을 때에는 동결건조법에 의해 보존한다.

4.2 접종균액

- 4.2.1 유산균 접종배지는 효모엑기스분말 1%, 펩톤 0.5%, 포도당 1%, 초산나트륨 1%, 염류용액 A와 B는 기초배지의 1/2 양으로 사용한다.
- 4.2.2 액체배지에 보존균을 접종한다. 필요하면 16~24시간 정도 같은 배지에 2~3회 배양한다.
- 4.2.3 증식된 균체는 3,000 rpm에서 원심분리하여 0.9% NaCl용액으로 3회 세정한 후, 적당한 농도의 균액(배지의 5~100배 용량의 0.9% NaCl용액을 가한다)이 될 때까지 희석하여 접종균액으로 한다. 이 균액을 접종하는 모든 실험 조작은 무균적으로 행해야 한다.

4.3 기초배지

4.3.1 염류용액 A

KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 각 5 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

4.3.2 염류용액 B

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g 및 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g을 물에 녹여 전량을 100 mL로 하여 HCl 1방울 및 톨루엔 소량을 가해서 보존한다.

4.3.3 카제인 산분해용액

4.3.3.1 비타민이 포함되어 있지 않은 카제인 100 g을 95% 알코올로 2회 세정한다.

4.3.3.2 5배 양의 20% HCl을 가해서 8~12시간 동안 가열 환류 하거나 또는 멸균기에서 121°C로 8~12시간 가열한다.

4.3.3.3 점액의 형태가 될 때까지 감압하여 HCl을 제거하고, 여기에 물 200 mL를 가해 감압 하에서 HCl을 제거한다.

4.4 시험조작

4.4.1 특별한 기준이 없을 경우, 배양액은 5 mL 또는 10 mL로 한다. 정량 하고자 하는 비타민의 표준계열은 동질, 동형의 시험관을 사용한다.

4.4.2 각 농도에 관해서 2~3개씩 4~8단계로 하며, 비타민표준용액을 포함하지 않는 시험관을 공시험용으로 하여 4~6개 준비한다.

4.4.3 총량이 5 mL일 경우 기초배지는 2.5 mL를 사용하고, 10 mL일 경우 기초배지는 5 mL를 가한 후, 물을 가해서 각각 5 mL 또는 10 mL로 만든다.

4.4.4 시험용액의 계열은 각 시험법에 규정된 방법으로 제조한 시험용액에 관해서 각 농도별로 시험관을 각각 2~3개씩 보통 4단계로 하고 표준계열과 같은 방법으로 동량의 기초배지를 가한 후 물을 가해서 표준계열과 동량으로 한다.

4.4.5 분주가 끝나면 면전하여 121°C의 조건에서 5분간 가압 살균한다.

4.4.6 표준용액을 포함하지 않은 시험관은 1조(2~3개)를 제거하고, 각 시험관에 접종액 1방울씩을 무균적으로 가한 후, 30~37°C에서 16~24시간 배양 후 탁도법에 의하여 증식도를 측정한다.

4.4.7 증식도를 탁도법으로 측정할 때는 각 시험관의 내용물을 10 mm

직경의 흡수 cell에 옮기고 비타민 표준용액을 포함하지 않고 또한 균액을 접종하지 않는 시험관의 투과도를 100%로 하여, 분광광도기 에서 540~610 nm의 파장으로 투과도 또는 흡광도를 구한다.

- 4.4.8 잡균이 혼입된 것이 밝혀진 경우나 기초배지 또는 접종균액 중에 정량하고자 하는 비타민이 혼재해서 표준용액을 넣지 않은 대조 시험관에서의 증식이 느린 경우(투과율 90% 이하) 및 표준계열에 의한 최고의 증식이 소정의 증식도에 달하지 않을 때(투과율 40% 이상)는 다시 시험한다.

<비오틴 정량조작법>

4.1 시액 및 표준용액의 조제

4.1.1 비오틴 보존용액

- 4.1.1.1 비오틴 표준물질을 50% 에탄올에 녹여, 그 1 mL에 비오틴 20 μ g이 함유되도록 한다. 이 용액은 냉소에 보관한다.

4.1.2 비오틴 표준용액

- 4.1.2.1 사용 시 비오틴 보존액을 물로 희석하여, 그 1 mL에 비오틴 0.2 μ g이 함유되도록 한다.

4.1.3 카제인 산분해용액

- 4.1.3.1 3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량용기초배지에 따른다.

4.1.4 아데닌-구아닌-우라실용액

- 4.1.4.1 아데닌황산염, 구아닌염산염 및 우라실 각 0.1 g을 20% HCl 5 mL로 가열하면서 녹인다.

- 4.1.4.2 식힌 후 물을 가하여 100 mL로 만들고, 톨루엔 소량을 가하여 10°C에 보관한다.

4.1.5 시스틴 트립토판 용액

- 4.1.5.1 L-시스틴 2 g 및 L-트립토판 0.5 g(또는 DL-트립토판 1 g)을 350~400 mL의 물로 희석하여 70~80°C로 가열하고, 고형물이 녹을 때까지 20% HCl을 첨가한다.

- 4.1.5.2 식힌 후 물을 가해서 전량을 500 mL로 만들고, 톨루엔 소량을 가하여 10°C에 보관한다.

4.1.6 비타민 B₁·비타민 B₂ 용액

4.1.6.1 비타민 B₁염산염, 비타민 B₂를 0.02 N 초산에 녹여, 그 1 mL가 비타민 B₁염산염 10 µg 및 비타민 B₂ 20 µg을 함유하도록 한다. 이 용액은 톨루엔을 소량 가하여, 빛을 차광하여 냉소에 보관한다.

4.1.7 p-아미노안식향산·니코틴산·판토텐산칼슘·비타민 B₆ 용액

4.1.7.1 용액 1 mL가 p-아미노안식향산 10 µg, 니코틴산 20 µg, 판토텐산 칼슘 20 µg, 피리독신염산염 40 µg을 함유하도록 25% 에탄올에 녹인다. 이 용액은 냉소에 보관한다.

4.1.8 염류용액 A 및 B

4.1.8.1 3-9-1 판토텐산(제1법) 4.시험과정 4.1 일반정량조작법 4.1.4 정량용기초배지에 따른다.

4.2 기초배지의 제조

4.2.1 카제인 산분해용액 10 mL, 시스틴-트립토판용액 20 mL, 아스파라긴 용액 3 mL, 아데닌-구아닌-우라실용액 1 mL, 크산틴용액 2 mL, 비타민용액 20 mL, 염류용액 B 2 mL, MnSO₄ 용액 2 mL 및 폴리솔베이트 80 용액 0.1 mL를 잘 섞고 바릴티로신 표준물질 6 mg을 정밀히 측정한다.

4.2.2 포도당 4 g, 인산이칼륨(K₂HPO₄) 0.64 g 및 구연산나트륨 (C₆H₅O₇Na₃·2H₂O) 5.2 g을 가하여 녹인다.

4.2.3 10% NaOH용액으로 pH를 6.8로 조정 한 후, 물을 가하여 100 mL로 만든다. 불용물질이 있으면 여과한다.

4.2.4 Folic acid assay medium(Difco)을 사용할 수 있다.

4.3 접종균액의 제조

4.3.1 *Lactobacillus plantarum* 보존균주

4.3.1.1 효모엑기스 0.5 g, 펩톤 1 g, 포도당 1 g 및 초산나트륨 (3H₂O) 1 g을 물 60~70 mL에 녹여, 1~2분 끓인다.

4.3.1.2 냉각 후, 염류용액 A 및 B 각 0.5 mL를 가하고 10% 수산화나트륨용액으로 pH 6.8로 조정한다.

4.3.1.3 물을 가하여 100 mL로 하고, 이것에 분말한천 2 g을 녹여, 10~15 mL씩 시험관에 분주하여 1 kg/cm²로 15분간 가압 멸균하여, 시험관을 수직으로 보존하여 방냉한다.

4.3.1.4 *Lactobacillus plantarum* ATCC No. 8014의 순수배양에서 상기의 균주보존용 배지에 균을 접종하고, 37°C에서 16~24 시간 배양하여, 냉소에 저장하여, 1주간마다 이식한다.

4.3.2 접종용배지

4.3.2.1 4.3.1의 균주보존용 배지의 조제법에 따라서, 최후에 분말 한천을 가하지 않고 불용잔사를 여과하여 없애고 5 mL씩 시험관에 분주하고 1 kg/cm² 15분간 가압멸균하여 방냉하여 접종용 배지로 한다.

4.3.3 접종균액

4.3.3.1 *Lactobacillus plantarum*의 보존균주를 접종용 배지에 이식한다.

4.3.3.2 37°C에서 16~24시간 배양하고, 증식한 균액을 무균적으로 원심분리 한다.

4.3.3.3 상등액을 비스듬하게 하여 제거하고, 여기에 멸균생리식염수 약 5 mL로 현탁시켜 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고, 이 조작을 2회 반복하여 균을 세정한다.

4.3.3.4 세정이 끝난 균액을 멸균생리식염수로 10~100배로 희석하여 접종균액으로 한다.

4.4 시험용액 제조

4.4.1 비오틴 약 200 µg을 함유하는 시료를 50 mL의 삼각플라스크에 취하고 6 N 황산용액 25 mL를 가하여 1 kg/cm²로 1시간 가압한다.

4.4.2 냉각 후, 10% 수산화나트륨용액으로 pH 6.8로 조정한다.

4.4.3 원심분리 또는 여과한 후 물을 가하여 용액 1 mL 중에 비오틴 약 0.2 µg을 함유하도록 희석한다.

4.5 시험조작

4.5.1 시험관 각 2개씩에 비오틴 표준용액 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.0 및 2.5 mL를 넣고, 각 시험관에 기초배지 2.5 mL 및 물을 가해 전량을 5 mL로 하여 표준용액 계열로 한다.

4.5.2 별도로 시험관 각 3개씩에 시험용액 0.5, 1 및 2 mL를 취하고 각 시험관에 기초배지 2.5 mL 및 물을 가해 전량을 5 mL로 한 것을 시험용액 계열로 한다

- 4.5.3 양 계열의 시험관의 내용물을 잘 혼합하여, 알루미늄 뚜껑을 씌우고, 1 kg/cm²로 10분간 가압 멸균한다.
- 4.5.4 냉각 후, 각 시험관에 접종균액을 1방울씩 무균적으로 접종하고, 산도적정에 의한 정량에는 37°C, 72시간, 탁도측정에 의한 정량에는 37°C, 16~24시간 배양한다.
- 4.5.5 배양 후, 각 시험관에 생긴 산 또는 탁도를 3-8 나이아신 <제2법 미생물학적 시험법> 의해 정량한다.

5. 분석 및 계산

5.1 탁도법에 의한 계산

- 5.1.1 검량선을 작성할 때는 횡축에는 표준용액의 농도 또는 mL 수의 대수를, 종축에는 투과도 또는 흡광도를 취한다.
- 5.1.2 표준용액의 각 농도단계에 관해서 얻어진 투과도 또는 흡광도의 평균치를 구해, 그 값(y)을 정점으로 해서 직선을 그린다.
- 5.1.3 실험용액의 각 농도단계에 관해서 투과도 또는 흡광도를 구해, 횡축에 시료의 g수 또는 시료용액 mL 수의 대수를 임의로 취하여 실험치 y를 정점으로 하여 직선을 그린다. 적어도 3점 이상이 직선을 구성하여야 한다.
- 5.1.4 표준용액 및 시험용액은 직선으로 평행하는 부분에 관해서 시험용액 1 mL 또는 시료 1 g당의 함유량을 구해 계산식에 따라 시료 중의 비타민 함유량을 산출한다.

5.2 탁도법에 의한 계산식

[계산식]

$$\text{비타민함량} = \text{시험용액의 비타민함량} \times \frac{\text{희석농도}}{\text{시료채취량}}$$

3-13-2 비오틴(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 비오틴을 이동상으로 충분히 추출하고 액체크로마토그래프(육방전환밸브시스템)/자외부흡광광도검출기(최대 흡수파장 200 nm) 또는 액체크로마토그래프/질량분석기를 이용하여 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(50 mL)
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.3 용매용 일회용 실린지
- 2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.5 원심분리기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

- 2.2.1.1 액체크로마토그래프
- 2.2.1.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.1.3 육방전환밸브시스템
- 2.2.1.4 칼럼오븐
- 2.2.1.5 칼럼
 - 2.2.1.5.1 전처리칼럼 : Capcellpak MF C₈, SG80(안지름 4.6 mm, 길이 150 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
 - 2.2.1.5.2 농축칼럼 : Capcellpak C₁₈ UG120V(안지름 2.0 mm, 길이 35 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
 - 2.2.1.5.3 분석칼럼 : Capcellpak C₁₈ UG120V(안지름 1.5 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량분석기

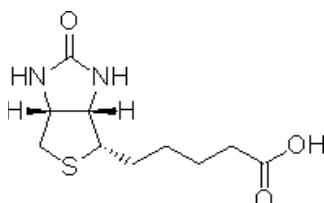
- 2.2.2.1 액체크로마토그래프
- 2.2.2.2 질량분석기
- 2.2.2.3 칼럼 : ACQUITY UPLC® BEH(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전입자 크기 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 비오틴(Biotin)

분자식 : $C_{10}H_{10}N_2O_3S$, 분자량 : 244.31, CAS No. : 58-85-5



3.2 일반시약

3.2.1 인산이수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate)

3.2.2 증류수(Distilled water)

3.2.3 메탄올(Methanol)

3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.5 클로로포름(Chloroform)

3.2.6 개미산(Formic acid)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 0.01 M 인산이수소칼륨 용액(pH 4.8)

인산이수소칼륨 1.35 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 비오틴 표준물질을 0.01 M 인산이수소칼륨용액에 녹여 100 mg/L가 되도록 조제한다. (4°C 이하 암소 보관)

4.2.2 상기 표준원액을 0.01 M 인산이수소칼륨용액으로 희석하여 표준용액 으로 사용한다.(사용시 제조)

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 균질화한 시료 일정량(약 0.5~5 g)을 정밀히 취한다.

4.3.2 위의 시료를 50 mL 갈색 부피플라스크에 넣고 0.01 M 인산이수소칼륨 용액 40 mL와 클로로포름 5 mL를 넣는다.

4.3.3 10분 동안 초음파 추출한 후 클로로포름을 제거한다.

4.3.4 0.01 M 인산이수소칼륨용액 넣어 표선까지 맞춘다.

4.3.5 추출액을 원심분리관으로 옮겨 10분간 shaker에서 격렬하게 흔든다.

4.3.6 0°C에서 $4,500 \times g$ 로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취한다.

4.3.7 이 액을 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	100 μL
칼럼온도	40°C
이동상	전처리칼럼 : 0.01 M 인산이수소칼륨용액 분석칼럼 : 0.01 M 인산이수소칼륨용액/메탄올(90:10, v/v)
검출기파장	200 nm
유속	전처리칼럼 : 500 $\mu\text{L}/\text{분}$, 분석칼럼 : 100 $\mu\text{L}/\text{분}$

표 2. 액체크로마토그래프/질량분석기 조건(예)

항목	조건
주입량	2 μL
유량	0.2 mL/분
칼럼온도	40°C
이동상	A : 0.1%(v/v) 포름산 B : 0.1%(v/v) 포름산을 함유한 아세토니트릴

항목	조건		
	시간(분)	이동상(%)	
		A	B
	0	100	0
	5.0	80	20
	5.2	0	100
	6.2	0	100
	7.0	100	0
	11.0	100	0
이온화	ESI, positive		
Monitoring ion	245(precursor ion), 227, 166(fragment ion)		
Capillary Voltage	3.5 kV		
Source Temp.	120°C		
Desolvation Temp.	350°C		

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 비오틴}(\text{mg}/100 \text{ g}) = C \times (a \times b) / S \times 100 / 1,000$$

C : 시험용액 중의 비오틴의 농도(ug/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-14 비타민 C

3-14-1 비타민 C(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 비타민 C를 메타인산용액으로 추출한 환원형 비타민 C(ascorbic acid, AA)를 2,6-dichlorophenol-indophenol(DCP)로 산화시켜 산화형(dehydroascorbic acid, DHAA)으로 만든 다음 2,4-DNPH (dinitrophenyl hydrazine)를 가해 적색의 오사존(osazone)을 형성시킨 후 황산(H_2SO_4)을 가해 탈수시키면 등적색의 무수물 bis-2,4-dinitrophenylhydrazine으로 전환되어 안정된 정색반응을 나타내는데, 이를 파장 510~540 nm에서 표준용액과의 흡광도를 측정하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 항온수조
- 2.1.2 시험관
- 2.1.3 피펫
- 2.1.4 원심분리기
- 2.1.5 데시케이터
- 2.1.6 메스플라스크

2.2 분석장비

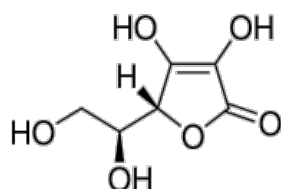
- 2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 L-Ascorbic acid, L-Threoascorbic acid

분자식 : $C_6H_8O_6$, 분자량 : 176.12, CAS No. : 50-81-7



3.2 일반시약

- 3.2.1 초산(Acetic acid)
- 3.2.2 디니트로페닐하이드라진용액(DNP)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 황산용액(Sulfuric acid)

4. 시험과정

4.1 시액 및 표준용액의 조제

4.1.1 메타인산-초산용액

- 4.1.1.1 메타인산 15 g을 초산 40 mL 및 물 200 mL로 잘 진탕 혼합하여 녹여서 물을 가해 250 mL로 한다. 이 용액은 냉장고에 보관하면 1주간 사용할 수 있다.

4.1.2 묽은 메타인산-초산용액

- 4.1.2.1 메타인산-초산용액을 같은 양의 물로 혼합한다. (사용 시 조제)

4.1.3 20% 메타인산용액

- 4.1.3.1 냉장고에 보존한다.

4.1.4 10% 메타인산용액

- 4.1.4.1 냉장고에 저장, 2주간 사용할 수 있다.

4.1.5 5% 메타인산용액

- 4.1.5.1 사용할 때 조제한다.

4.1.6 인도페놀용액

- 4.1.6.1 2,6-디클로로페놀 인도페놀나트륨염 0.2 g을 더운물에 녹여 100 mL로 한다. 필요하면 여과한다. 본 용액은 냉장고에 보존하고 2주간 사용할 수 있다.

4.1.7 메타인산-티오요소용액

- 4.1.7.1 10% 메타인산용액 50 mL에 티오요소 2 g을 녹인다. 물을 가해 100 mL로 한다(사용 시 조제).

4.1.8 디니트로페닐하이드라진용액

4.1.8.1 2,4-디니트로페닐하이드라진 2 g을 9 N 황산액 100 mL에 녹인다. 유리여과기로 여과한다. 본 용액은 냉장고에 보존하면 2주간 사용할 수 있다.

4.1.9 비타민 C 표준용액

4.1.9.1 비타민 C 표준물질 100 mg을 정밀히 단다.

4.1.9.2 메스플라스크에 넣어 5% 메타인산용액에 녹여서 100 mL로 한다.

4.1.9.3 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 및 2.5 mL를 각각 메스플라스크에 취해 5% 메타인산용액을 가해서 100 mL로 한다(사용 시 조제).

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 시료의 일정량을 정밀히 단 후 정확히 같은 양의 메타인산-초산 용액을 잘 혼합해서 균등한 죽 상태로 한다.

4.2.2 환원형 비타민 C로서 1~5 mg 함유되도록 균등한 죽상태의 일정량 (W g)을 100 mL의 메스플라스크에 옮기고 묽은 메타인산-초산용액 으로 100 mL로 한다.

4.2.3 용액을 여과하여 처음의 수 mL를 제거해서 그 후의 여액을 취하거나 또는 원심분리해서 상등액을 취하여 시험용액으로 한다. 다만, 조작은 모두 신속히 행한다.

4.3 시험조작

4.3.1 산화

4.3.1.1 시험용액 2 mL를 시험관 T₁, T₂ 및 T₃에 취해 T₁에 인도페놀용액 1방울을 혼합해서 이것이 적색을 나타내는지 확인하고, T₁, T₂ 및 T₃에 메타인산-티오요소용액 2 mL씩 가한다.

4.3.2 오사존의 생성

4.3.2.1 시험관 T₁ 및 T₂에 디니트로페닐하이드라진용액 1 mL씩을 가해 37°C(±0.5°C) 항온 수욕 중에서 정확히 3시간 방치하고 T₃와 함께 얼음물 중에 침적한다.

4.3.3 오사존의 용해

4.3.3.1 얼음물 중에서 냉각하면서 T₁, T₂ 및 T₃에 85% 황산용액 5

mL를 조금씩 적가해서 1분간 얼음물 중에서 내용액을 잘 혼합 냉각한다.

4.3.3.2 차가운 상태에서 T₃에 디니트로페닐하이드라진용액 1 mL를 혼합한다.

4.3.3.3 T₁, T₂ 및 T₃의 내용액을 재차 혼합한 후 얼음물로부터 꺼내서 실온에서 30~40분간 방치한다.

5. 분석 및 계산

5.1 비색

5.1.1 T₁ 및 T₂의 내용액에 대해서 510~540 nm에서 흡광도를 측정하고, T₁ 및 T₂로 한다. 대조액은 T₃로 한다.

5.2 검량선의 작성

5.2.1 비타민 C 표준용액의 각 2 mL씩을 시험관에 취하고 위의 시험 조작에 따라서 조작한다. 각각 흡광도를 구하고 검량선을 그린다.

5.3 흡광도에 따른 계산

5.3.1 시험용액 2 mL 중의 총 비타민 C량 및 산화형 비타민 C량을 각각의 환원형 비타민 C량(μg)으로 나타낸 수치를 검량선에서 찾아서 T₁ 및 T₂에 대응하는 점으로부터 구하여 C₁ 및 C₂로 한다. 시료 중의 비타민 C함량은 다음 식으로 구한다.

[계산식]

$$\text{총 비타민 C 함량(mg/100 g)} = \frac{C_1}{1,000} \times 50 \times \frac{\text{시료 채취량(g)} \times 2}{W} \times \frac{100}{\text{시료 채취량(g)}}$$

$$\text{산화형 비타민 C 함량(mg/100 g)} = \frac{C_2}{1,000} \times 50 \times \frac{\text{시료 채취량(g)} \times 2}{W} \times \frac{100}{\text{시료 채취량(g)}}$$

$$\begin{aligned} \text{환원형 비타민 C 함량(mg/100 g)} &= \text{총 비타민 C함량(mg/100 g)} \\ &\quad - \text{산화형 비타민 C 함량(mg/100 g)} \end{aligned}$$

3-14-2 비타민 C(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 비타민 C에 인도페놀용액을 넣어 적색이 5초간 지속 될 때까지 투입량을 이용하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 피펫

2.1.2 메스플라스크

2.1.3 삼각플라스크

2.1.4 타이머

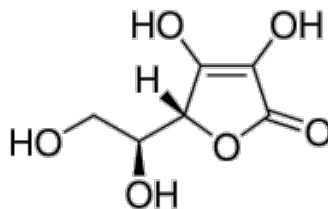
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 L-Ascorbic acid

L-Threoascorbic acid

분자식 : $C_6H_8O_6$, 분자량 : 176.12, CAS No. : 50-81-7



3.2 일반시약

3.2.1 증류수(Distilled water)

3.2.2 초산(Acetic acid)

3.2.3 2,6-디클로로페놀 인도페놀나트륨염(2,6 - Dichloroindophenol sodium salt dihydrate)

4. 시험과정

4.1 시액 조제

4.1.1 인도페놀용액

4.1.1.1 미리 탄산수소나트륨 약 50 mg을 더운물 약 150 mL에 용해한다.

4.1.1.2 2,6-디클로로페놀 인도페놀나트륨염 약 50 mg을 용해시키고 냉각 후 물로 200 mL로 한다.

4.1.1.3 여과 후 차광하여 냉소에 저장하면 일주간 사용할 수 있다. 단, 다음 방법에 따라 사용할 때 적정한다.

4.1.1.4 비타민 C 표준물질 100 mg을 정밀히 달아서 500 mL의 메스플라스크에 넣어 묽은 메타인산-초산용액으로 500 mL로 한다. 그 5 mL를 정밀히 취하여 묽은 메타인산-초산용액 5 mL를 가하고 인도페놀용액으로 액이 적어도 5초간 적색이 지속될 때까지 적정한다. 여기에 적정된 인도페놀용액의 소비량을 T mL로 한다.

4.2. 시험조작(조작은 모두 신속히 행한다.)

4.2.1 환원형 비타민 C의 적정

4.2.1.1 비타민 C(제1법)에서 조제한 시험용액 10 mL를 삼각 플라스크에 정확히 취하여 즉시 인도페놀용액으로 액이 적어도 5초간 적색이 지속될 때까지 적정한다. 이 때 적정된 인도페놀 용액의 소비량을 S mL로 한다.

4.2.2 계산

4.2.2.1 시료 중의 환원형 비타민 C는 다음 식에 의해 구한다.

[계산식]

$$\text{환원형 비타민 C 함량(mg/100 g)} = A \times \frac{S}{T} \times 10 \times \frac{\text{시료 채취량(g)} \times 2}{W} \times \frac{100}{\text{시료 채취량(g)}}$$

A(mg) : 인도페놀용액 T mL에 대응하는 아스코브산 량

3-14-3 비타민 C(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 비타민 C를 메타인산으로 균질화 시킨 후 옥타데실화된 칼럼을 연결하여 분리하는 방법으로 자외부흡광광도검출기를 이용하여 최대 흡수 파장인 254 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 가지달린 삼각플라스크(Filter flask)

2.1.4 여지(filter paper)

2.1.5 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.6 부피플라스크(50 mL, 10 mL)

2.1.7 원심분리관

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 Jascopack Fine Sil-NH₂, Lichrosorb NH₂, Zipax SAX, Vydac SAX, Partisil-10SAX, μ -Bondapak C₁₈, μ -Bondapak/CN, Pormaphase CPS 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

이동상은 2개의 용매가 사용 되는데 0.05 M KH₂PO₄ : 아세토니트릴(60 : 40) 이 두 개의 용매를 분당 1 mL씩 충분한 시간동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화 시킨다.

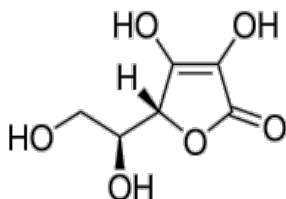
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 L-Ascorbic acid

L-Ascorbic acid(L-Threoascorbic acid)

분자식 : $C_6H_8O_6$, 분자량 : 176.12, CAS No. : 50-81-7



3.2 일반시약

- 3.2.1 메타인산(Metaphosphoric acid)
- 3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 인산칼륨(Potassium phosphate)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 10% 메타인산용액

메타인산 10 g을 물에 녹여 100 mL로 한다. 불용물이 생기는 경우 여과하여 사용한다. 냉장고에서 일주일까지 보관할 수 있다.

4.1.2 5% 메타인산용액

10% 메타인산용액을 물로 2배 희석한다. 사용시 조제한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 표준원액

아스코브산 10 mg을 정밀히 달아, 5% 메타인산용액에 녹여 100 mL로 한 것을 표준원액(100 ppm)으로 한다.

4.2.2 표준용액

필요한 경우 표준원액에 5% 메타인산용액을 넣어 원하는 농도로 희석하여 사용한다. 사용 시 조제한다.

4.3 시험용액 제조

- 4.3.1 시료 일정량(비타민 C함량이 50 mg/100 g 이상인 경우 2 g 정도, 10~50 mg/100 g인 경우 5~10 g 정도를 시료로 한다)을 정확히 단다.

- 4.3.2 동량의 10% 메타인산용액을 가하여 10분간 현탁시킨 후 적당량의 5% 메타인산을 넣어 균질화한다.
- 4.3.3 균질화된 시료를 100 mL 메스플라스크에 옮기고 소량의 5% 메타인산용액으로 용기를 씻은 후 메스플라스크에 합하여 100 mL로 한다.
- 4.3.4 3,000 rpm에서 10~15분간 원심분리를 행하여 상등액을 취하고 5% 메타인산용액으로 적당히 희석하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	실온
이동상	0.05 M KH_2PO_4 : 아세토니트릴(60 : 40)
검출기 파장	254 nm
유량	1.0 mL/min

5.2 정량시험

- 5.2.1 시험용액 및 표준용액을 각각 10 μ L씩 주입하여 얻은 피크의 넓이 또는 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액의 비타민 C의 농도(μ g/mL)를 구한다.
- 5.2.2 계산식에 의해 시료 중 아스코브산의 함량(mg/100g)을 산출한다. L-아스코브산 나트륨으로 환산하는 경우에는 L-아스코브산량에 계수 1.125를 곱한다.
- 5.2.3 계산식

$$\text{비타민 C(mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체량(g)}} \times \frac{100}{1000}$$

S : 시험용액 중의 아스코브산의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

3-14-4 비타민 C(제4법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 아스코빌팔미테이트를 메탄올로 균질화시킨 후 옥타데실화된 칼럼을 연결하여 분리하는 방법으로 자외부흡광 광도 검출기를 이용하여 최대 흡수 파장인 245 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 가지달린 삼각플라스크(Filter flask)

2.1.4 여지(Filter paper)

2.1.5 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.6 부피플라스크

2.1.7 원심분리관

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 150 mm, 충전제 : octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

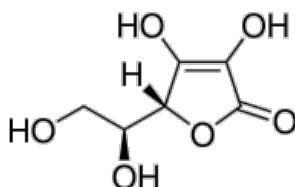
이동상은 2개의 용매가 사용되는데 0.05 M KH_2PO_4 : 아세토니트릴(30 : 70) 이 두 개의 용매를 분당 1 mL씩 충분한 시간동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Ascorbyl palmitate

분자식 : $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_7$, 분자량 : 414.53, CAS No. : 137-66-6



3.2 일반시약

- 3.2.1 메탄올(Methanol)
- 3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 인산칼륨(Potassium phosphate)

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

4.1.1 표준원액

아스코빌팔미테이트 10 mg을 정밀히 달아, 메탄올에 녹여 100 mL로 한 것을 표준원액으로 한다.

4.1.2 표준용액

필요한 경우 표준원액에 메탄올을 넣어 원하는 농도로 희석하여 사용 한다. 사용 시 조제한다.

4.2 시험용액 제조

4.2.1 아스코빌팔미테이트 약 5 mg에 해당하는 시료를 10 mL 메탄올을 가하여 10분간 현탁시킨 후 적당량의 메탄올을 넣어 균질화한다.

4.2.2 균질화된 시료를 100 mL 메스플라스크에 옮기고 소량의 메탄올로 용기를 씻은 후 메스플라스크에 합하여 100 mL로 한다.

4.2.3 3,000 rpm에서 10~15분간 원심분리를 행하여 상등액을 취하고 메탄올로 적당히 희석하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	실온
이동상	0.05 M KH_2PO_4 : 아세트니트릴(30 : 70)
검출기 파장	245 nm
유량	1 mL/min

5.2 정량시험

5.2.1 시험용액 및 표준용액을 각각 10 μ L씩 주입하여 얻은 피크의 넓이 또는 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액의 아스코빌팔미테이트의 농도를 구한다.

5.2.2 계산식에 의해 시료 중 아스코브산의 함량을 산출한다.

5.2.3 계산식

$$\text{비타민 C (mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체량(g)}} \times \frac{100}{1,000} \times 0.4249$$

S : 시험용액 중의 아스코빌팔미테이트의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

0.4249 : 아스코빌팔미테이트의 아스코브산으로의 환산계수

3-15 구리, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 셀렌, 크롬

3-15-1 구리, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 셀렌, 크롬 (제1법 원자흡광광도법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 구리, 마그네슘, 망간, 몰리브덴을 건식으로 분해하여 원자흡광광도법을 적용하여 정량한다. 이는 시험용액 중의 금속 원소를 적당한 방법으로 해리시켜 원자 증기화하여 생성한 기저상태의 원자가 그 원자증기를 통과하는 빛으로부터 측정파장의 빛을 흡수하는 현상을 이용하여 광전측정 등에 따라 목적원소의 특정파장에서의 흡광도를 측정하고 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 유리여과기 또는 석면

2.1.5 시험관

2.1.6 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Copper

분자식 : Cu, 분자량 : 63.55, CAS No. : 7440-50-8

3.1.2 Magnesium

분자식 : Mg, 분자량 : 24.31, CAS No. : 7439-95-4

3.1.3 Maganese

분자식 : Mn, 분자량 : 54.94, CAS No. : 7439-96-5

3.1.4 Molybdenum

분자식 : Mo, 분자량 : 95.94, CAS No. : 7439-98-7

3.1.5 Selenium

분자식 : Se, 분자량 : 78.96, CAS No. : 7782-49-2

3.1.6 Chromium

분자식 : Cr, 분자량 : 52.00, CAS No. : 7440-47-3

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric Acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 황산(Sulfuric acid)

3.2.4 증류수(Distilled water)

3.2.5 수산화암모늄용액(Ammonium hydroxide liquid)

3.2.6 구연산암모늄용액(Ammonium citrate liquid)

3.2.7 BTB시액(Bromothymol blue)

3.2.8 황산암모늄용액(Ammonium sulfate liquid)

3.2.9 암모니아수(Ammonia water)

3.2.10 DDT(Diethyl dithiocarbamic acid)

3.2.11 MIBK(Methyl iso-butyl ketone)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 제조

4.1.1 건식분해법

4.1.1.1 시료(건조물) 약 5~20 g을 취해 건조하여 탄화시킨다.

4.1.1.2 450~550°C에서 회화한다. 잘 되지 않으면 일단 식혀 질산(1+1) 또는 50% 질산마그네슘용액 또는 질산알루미늄 40 g 및 질산칼륨 20 g을 물 100 mL에 녹인 액 2~5 mL로 적시고 건조한 다음 회화를 계속한다. 회화가 불충분할 때는 위의 조작을 1회 되풀이하고 필요하면 마지막으로 질산(1+1) 2~5 mL를 가하여 완전하게 회화를 한다.

4.1.1.3 회분을 물로 적시고 염산 2~4 mL를 가하여 수욕 상 또는 건조 장치에서 건조한다.

4.1.1.4 염산 1~2 mL 또는 0.5 N 질산을 가하여 가온해서 녹이고 불용물이 있으면 석면 또는 유리여과기로 여과한 다음 일정량으로 하여 시험용액으로 한다. 다만, 회화보조제로서 염산, 산화마그네슘, 탄산나트륨 등을 사용해도 좋으나 시험조작에 영향이 없을 때에만 사용하되 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정한다.

4.1.2 습식분해법

4.1.2.1 황산-질산법

4.1.2.1.1 시료(건조물로서 5~20 g에 상당하는 양)를 분해플라스크에 취하여 물 50~70 mL, 질산 10~40 mL를 넣고 혼합 하여 방치한다.

4.1.2.1.2 시험액을 조용히 가열하여 격렬한 반응이 그치면 식힌 다음 황산 5~20 mL를 넣고 다시 서서히 가열한다.

4.1.2.1.3 내용물이 암색이 되기 시작하면 질산 2~3 mL를 추가하면서 가열을 계속하여 내용물이 미황색~무색이 되었을 때 분해가 끝난 것으로 한다.

4.1.2.1.4 분해액을 식힌 후 물 30~50 mL, 포화수산암모늄 용액 10~25 mL를 가해서 황산의 흰 연기가 발생할 때까지 가열 하고 식힌 다음 물로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2.1.5 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정 한다.

4.1.2.2 마이크로웨이브법

4.1.2.2.1 시료 일정량을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고, 부피플라스크에 옮겨 증류수를 가하여 일정량으로 한다.

4.2 시험조작

4.2.1 직접법

4.2.1.1 시험용액 및 공시험용액을 그대로, 혹은 희석 또는 농축한다.

4.2.1.2 원자흡광 광도계에 주입하여 흡광도를 구하고 따로 표준용액 및 이의 공시험용액에 대해서도 각각 시험용액의 경우와 같은 조작을 해서 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를

구한다.

4.2.2 용매추출법

4.2.2.1 시험용액 및 공시험용액을 각각 10~50 mL 취한다. (질산으로 pH 4.0 조정)

4.2.2.2 25% 구연산암모늄용액 2~10 mL 및 BTB시액 2방울을 가하여 액의 색이 황색에서 연한 녹색이 될 때까지 암모니아수로 중화한다.

4.2.2.3 40% 황산암모늄시액 2~10 mL 및 물을 가하여 일정량으로 한다.

4.2.2.4 10% DDTC용액 2~10 mL를 넣고 혼합하여 수 분간 방치한 다음 MIBK 10~20 mL를 가하여 격렬히 흔들어 섞는다.

4.2.2.5 MIBK층을 분취하여 원자흡광광도계에 주입하여 각각의 원소 측정파장에 있어서 흡광도를 측정하고 따로 표준용액 및 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하고 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를 구한다.

3-15-2 구리, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 셀렌, 크롬 (제2법 유도결합플라즈마법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 유도결합플라즈마 검출기(Inductively Coupled Plasma, ICP)

2.1.2 유도결합플라즈마 질량검출기(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP/MS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준용액

3.1.1 Copper

분자식 : Cu, 분자량 : 63.55, CAS No. : 7440-50-8

3.1.2 Magnesium

분자식 : Mg, 분자량 : 24.31, CAS No. : 7439-95-4

3.1.3 Maganese

분자식 : Mn, 분자량 : 54.94, CAS No. : 7439-96-5

3.1.4 Molybdenum

분자식 : Mo, 분자량 : 95.94, CAS No. : 7439-98-7

3.1.5 Selenium

분자식 : Se, 분자량 : 78.96, CAS No. : 7782-49-2

3.1.6 Chromium

분자식 : Cr, 분자량 : 52.00, CAS No. : 7440-47-3

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric Acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 3-15-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 제조하고 및
공시험용액을 ICP에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

3-16 칼슘

3-16-1 칼슘(제1법 과망간산칼륨 용량법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 칼슘을 함유하는 용액에 수산염을 첨가하여 물에 난용성인 수산칼슘으로 침전시켜 침전물을 황산에 녹여 용액내 수산을 과망간산칼륨 용액으로 적정하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 비커

2.1.6 유리봉

2.1.7 피펫

2.1.8 유리여과기(15AG-4)

2.2 분석장비

2.2.1 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Calcium

분자식 : Ca, 분자량 : 40.08, CAS No. : 7440-70-2

3.2 일반시약

3.2.1 수산암모늄용액(Ammonium water)

수산암모늄[(NH₄)₂C₂O₄] 3.0 g을 물을 가하여 100 mL로 한다.

3.2.2 메틸레드시약(Methyl red, 특급)

0.1% 메틸레드알코올용액

3.2.3 요소(Urea)

특급요소 70~80°C의 저온으로 건조한 다음 흡습하지 않도록 보존한다.

3.2.4 세척용 암모니아수(1→50)

3.2.5 황산용액(Sulfuric acid)

3.2.6 0.02 N 과망간산칼륨용액 (Potassium permanganate)

3.2.7 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 제조

4.1.1 건식분해법

4.1.1.1 시료 적절량을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550~600°C의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화한다.

4.1.1.2 회분을 방냉 후 주의하여 물로 적신 후 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가해 수욕 상에서 완전 증발 건조시킨다.

4.1.1.3 건조물에 염산용액(1→4) 약 8~10 mL를 가해 수 분 가열 후 100 mL 메스플라스크에 여과한다.

4.1.1.4 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화한다. 이 회분을 물로 적시어 염산용액(1→4) 약 2 mL를 가해 물 약 5 mL로 희석한 후 수욕 상에서 가온하고, 여과한 액을 앞의 100 mL 메스플라스크에 채워 물을 가하여 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2 습식분해법

4.1.2.1 질산-과염소산법

4.1.2.1.1 시료 적절량을 200~300 mL 분해 플라스크에 취하여 질산 5 mL를 가하여 서서히 약하게 가열하고 최초의 심한 반응이 끝난 후 다시 온도를 올려 가열시킨다.

4.1.2.1.2 질산이 휘산되어 내용물이 거의 건조될 때까지 가열 하고 질산용액(1→2) 10 mL와 70% 과염소산 10 mL를 가하여 가열을 조절하면서 서서히 가열시킨다.

4.1.2.1.3 고형물이 완전히 용해되고 액이 거의 무색이 될 때까지

가열을 계속하여 분해한다. 만약, 액이 착색 되어 있으면, 70% 과염소산 수 mL를 가하여 가열 한다.

4.1.2.1.4 분해 후 냉각하고 소량의 물로 희석한 후 직경이 9 cm의 자체증발접시에 액을 씻어 옮기고 증발 건조 하여 과염소산을 증발시킨다.

4.1.2.1.5 잔류물에 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가하고 동량의 물로 희석시켜 수욕 상에서 가온하여 완전히 녹인 후 100 mL 메스플라스크에 옮겨 물을 가하여 전량을 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2.2 마이크로웨이브법

4.1.2.2.1 시료 일정량을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고, 부피플라스크에 옮겨 증류수를 가하여 일정량으로 한다.

4.2 시험조작

4.2.1 시험용액의 조제에서 얻은 시험용액 중에 40 mL(Ca 1~12 mg에 대응하는 양)를 200 mL의 비커에 취하여 메틸레드시액 수 방울 및 수산암모늄용액 10 mL를 가한 다음 요소 2~5 g을 가해 녹인다.

4.2.2 비커를 시계접시로 덮고 약하게 가열을 계속시킨다. 메틸레드시액을 색이 적색에서 등황색으로 (pH 약 5.6) 되었을 때 가열을 중지하고 방냉한다. 이를 2시간 이상(침전이 적을 때는 하룻밤) 실온으로 방치한다. 이 때의 액량은 약 20~30 mL정도이다.

4.2.3 충분히 침전을 형성시킨 후 석출 전 수산칼슘 결정을 유리여과기 (15AG-4)로 흡입여과하고 세척용 암모니아수 30~40 mL를 수 회 나누어 침전과 여지를 잘 씻는다.

4.2.4 세척이 끝나면 침전 생성에 사용한 비커를 앞의 유리여과기의 밑에 놓고 여과에 사용한 유리봉을 유리여과기에 넣어 미리 70℃ 이상으로 가온한 황산용액(1→25)을 유리여과기에 주입한다.

4.2.5 유리봉으로 교반하여 잠시 방치하고 수산칼슘을 용해한 다음 흡입한다. 다음 흡입을 그치고 가온한 황산용액(1→25) 약 5~7 mL를 유리여과기에 주입하고 유리봉으로 교반하여 내벽을 씻고 흡입한다. 이 조작을 2회 반복한다.

4.2.6 비커를 여과장치에서 들어내고 65~80℃로 가열하여 0.02 N 과망간산 칼륨용액으로 적정한다. 공시험에 대하여도 같은 조작을 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 과망간산칼륨 용량법의 계산

$$\text{칼슘 함량(mg/g)} = \frac{(b-a) \times 0.4008 \times F \times V}{\text{시료채취량(g)}}$$

a : 공시험에 대한 0.02 N 과망간산칼륨용액의 소비 mL 수

b : 검액에 대한 0.02 N 과망간산칼륨용액의 소비 mL 수

F : 0.02 N 과망간산칼륨용액의 역가

V : 시험용액의 희석배수

3-16-2 칼슘(제2법 원자흡광광도법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 칼슘을 건식 또는 습식으로 분해하여 원자흡광 광도법을 적용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Calcium

분자식 : Ca, 분자량 : 40.08, CAS No. : 7440-70-2

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 염화란탄(Lanthanum chloride, LaCl_3) 또는 염화스트론튬 (Strontium chloride, SrCl_2)

4. 시험과정

4.1 3-16-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 조제하고 1 N 염산용액을 사용하여 칼슘 농도 1~5 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 조정하여 3-15-1원자흡광 광도법에 따라 측정한다.

4.2 사용될 1 N 염산용액에는 La으로서 1,000 ppm이 되도록 염화란탄(LaCl_3)을 첨가하거나 또는 Sr으로서 5,000 ppm이 되도록 염화스트론튬(SrCl_2)을 첨가하여 사용한다.

3-16-3 칼슘(제3법 유도결합플라즈마법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방식으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 유도결합플라즈마검출기(Inductively Coupled Plasma, ICP)

2.2.2 유도결합플라즈마 질량검출기(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP/MS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Calcium

분자식 : Ca, 분자량 : 40.08, CAS No. : 7440-70-2

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 3-16-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 제조하고 공시험용액을 포함하여 ICP 또는 ICP/MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

3-17 요오드

3-17-1 요오드(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 요오드를 건식·습식으로 분해하여 이온-선택 전극법을 적용 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 도가니 또는 백금접시
- 2.1.2 회화로
- 2.1.3 수욕조
- 2.1.4 부피플라스크
- 2.1.5 비커
- 2.1.6 마그네틱바
- 2.1.7 피펫
- 2.1.8 여과지(Whatman. 541)
- 2.1.9 pH 측정기

2.2 분석장비

- 2.2.1 전극 : 요오드전극, 기준 전극(Ag/AgCl전극)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Iodium

분자식 : I, 분자량 : 253.81, CAS No. : 7553-56-2

3.2 일반시약

- 3.2.1 빙초산(Acetic acid)
- 3.2.2 질산나트륨용액(Sodium nitrate liquid)
- 3.2.3 질산니켈(Nikel nitrate)
- 3.2.4 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 제조

4.1.1 제1법 건식분해법

4.1.1.1 시료 적절량을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550~600°C의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화한다.

4.1.1.2 회분을 방냉 후 주의하여 물로 적신 후 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가해 수욕 상에서 완전 증발 건조시킨다.

4.1.1.3 건조물에 염산용액(1→4) 약 8~10 mL를 가해 수 분 가열 후 100 mL 메스플라스크에 여과한다.

4.1.1.4 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화한다. 이 회분을 물로 적시어 염산용액(1→4) 약 2 mL를 가해 물 약 5 mL로 희석한 후 수욕 상에서 가온하고, 여과한 액을 앞의 100 mL 메스플라스크에 채워 물을 가하여 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2 제2법 습식분해법

4.1.2.1 시료 적절량을 200~300 mL 분해 플라스크에 취하여 질산 5 mL를 가하여 서서히 약하게 가열하고 최초의 심한 반응이 끝난 후 다시 온도를 올려 가열시킨다.

4.1.2.2 질산이 휘산되어 내용물이 거의 건조될 때까지 가열하고 질산용액(1→2) 10 mL와 70% 과염소산 10 mL를 가하여 가열을 조절하면서 서서히 가열시킨다.

4.1.2.3 고형물이 완전히 용해되고 액이 거의 무색이 될 때까지 가열을 계속하여 분해한다. 만약, 액이 착색되어 있으면, 70% 과염소산 수 mL를 가하여 가열한다.

4.1.2.4 분해 후 냉각하고 소량의 물로 희석한 후 직경이 9 cm의 자제증발접시에 액을 씻어 옮기고 증발 건조하여 과염소산을 증발시킨다.

4.1.2.5 잔류물에 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가하고 동량의 물로 희석시켜 수욕 상에서 가온하여 완전히 녹인 후 100 mL 메스플라스크에 옮겨 물을 가하여 전량을 100 mL로 하여 시험 용액으로 한다.

4.1.3 이온-선택 전극법

4.1.3.1 시료 100 mL(분말의 경우 10% 수용액)를 250 mL 메스플라스크에 넣고 3% 초산용액 10 mL를 가한 후 물로 정용한다. 이 액을 여과하고 처음 10 mL는 버린다.

4.1.3.2 3%(v/v) 초산 용액

빙초산 15 mL를 물로 희석하여 500 mL가 되게 한다.

4.1.3.3 전극 보관 용액

요오드 표준원액을 물로 희석하여 0.1 mL/L가 되게 한다. 요오드 전극을 이 용액에 담가서 보관하며 매주 새 용액으로 교환한다. 차광보관하며, 3개월간 보존가능하다.

4.1.3.4 이온강도 조절액(5 M 질산나트륨용액, ISA:ionic strength adjuster) 질산나트륨 42.5 g을 물에 녹여 100 mL로 한다.

4.1.3.5 2 M 질산니켈용액

질산니켈·6 수화물 58.2 g을 물에 녹여 100 mL가 되게 한다.

4.1.3.6 요오드 표준물질 (요오드 12.69 g/L, 0.1 M)

요오드화나트륨 또는 요오드화칼륨 표준물질을 사용한다. 실온에서 차광 보관하며, 개봉 후 6개월간 보존 가능하다.

4.1.3.7 요오드 표준원액

요오드 표준물질 8 mL를 물로 희석하여 1 L가 되게 한다 (101.5 µg/mL). 차광하여 보존하며 2주간 사용 가능하다.

4.1.3.8 요오드 표준용액 I

요오드 표준원액 5 mL를 물로 희석하여 500 mL가 되게 한다(1 µg/mL). 차광하여 보존하며 2주간 사용 가능하다.

4.1.3.9 요오드 표준용액 II

요오드 표준용액 I를 물로 10배 희석한다. 차광하여 보존하며 2주간 사용 가능하다(0.1 µg/mL).

4.1.3.10 기지의 첨가 표준용액

요오드 표준원액 (2) 10 mL를 물로 희석하여 1 L가 되게 한다. 이 액 100 mL에 이온강도조절액(ISA), 2 M 질산니켈 용액, 물을 각각 1.0 mL씩 첨가한 후 잘 혼합한다. 사용 시 조제한다.

4.2 시험조작

4.2.1 전극 기울기체크

4.2.1.1 전극을 요오드 표준용액 II 100 mL에 담고 ISA, 2 M 질산니켈 용액, 물을 각각 1.0 mL씩 가하고 약 2~5분 후 reading 전위계가 안정되었을 때 E1 값을 측정한다.

4.2.1.2 전극을 물로 씻고 건조시킨 후 요오드 표준용액 I 100 mL에 담고 ISA, 2 M 질산니켈 용액, 물을 각각 1.0 mL씩을 가하고, 약 2~5분 후 reading 전위계가 안정되었을 때 E2 값을 측정한다.

4.2.1.3 전극을 물로 씻고 건조시킨다. 전극의 기울기(S)는 E2-E1로 계산된다. 매 4시간마다 기울기를 측정하며, 직전에 측정한 기울기를 사용하여 요오드 함량을 계산한다.

4.2.2 측정

4.2.2.1 시험용액 100 mL를 비커에 넣고 마그네틱바로 저어주면서 ISA, 2 M 질산니켈 용액, 진한 질산을 각각 1 mL씩 가하고 전극을 담근 후 약 2분 후 reading 전위계가 안정되었을 때 E3 값을 측정한다.

4.2.2.2 용액에 즉시 기지의 첨가 표준용액 10 mL를 가하고 약 2~5분 후 reading 전위계가 안정되었을 때, E4 값을 측정 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 요오드 용량법의 계산

$$\text{요오드 함량}(\mu\text{g}/100\text{g}) = Q \times 0.9854 \times V \times 100$$

$$Q = 0.0885 / \{\text{antilog}[(E4-E3)/S] - 0.912\}$$

0.9854 : 기지의 첨가 표준용액의 요오드 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : 희석 배수

0.0885 : 표준용액 첨가 mL수/(표준용액 첨가 전 총 mL수+표준용액 첨가 mL수) = 10/(103+10)

0.912 : 표준용액 첨가 전 총 mL수/(표준용액 첨가 전 총 mL수 + 표준 용액 첨가 mL수) = 103/(103 + 10)

S : E2-E1

3-17-2 요오드(제 2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중에 존재하는 요오드를 마이크로웨이브 분해 장치에 넣고 테트라메틸암모늄하이드록사이드(TMAH)용액으로 분해하여 유도결합플라즈마/ 질량검출기로 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 50 mL용 폴리프로필렌 부피플라스크

2.2 분석장비

2.2.1 유도결합플라즈마/질량검출기

2.2.2 마이크로웨이브 분해 장치

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 요오드화칼륨(Potassium iodide)

분자식 : KI, 분자량 : 166.0, CAS No. : 7681-11-0

3.2 일반시약

3.2.1 25% 테트라메틸암모늄하이드록사이드(Tetramethylammonium hydroxide, TMAH)

3.2.2 증류수

4. 시험과정

4.1 시약조제

4.1.1 5% TMAH: 25% TMAH 100 mL을 취하여 증류수로 500 mL로 한다.

4.1.2 0.5% TMAH: 25% TMAH 10 mL을 취하여 증류수로 500 mL로 한다.

4.2 표준용액 조제

4.2.1 내부 표준용액: 시판 Te 표준용액(1,000 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL를 취하여 증류수로 500 mL로 한다(Te 2 $\mu\text{g/mL}$ 함유).

4.2.2 요오드 표준용액: 요오드화칼륨 0.1308 g을 취하고 증류수를 가하여 100 mL(1,000 µg/mL)로 한다. 다시 증류수로 희석하여 1 µg/mL 으로 한다. 이 용액 일정량을 취하여 각각 50 mL 용 폴리프로필렌 부피 플라스크에 넣고 0.5% TMAH 용액으로 정용한다. 이들 용액 10 mL에 내부표준용액 100 µL를 가한 것을 표준용액으로 한다.

4.3 시험용액 조제

4.3.1 균질화된 시료 약 0.5 g을 마이크로웨이브 분해장치에 넣고 5% TMAH 용액을 적절히 가하여 90°C, 1시간동안 분해한다.

4.3.2 분해액을 방냉시킨 후 50 mL 용 폴리프로필렌 부피플라스크에 넣고 증류수를 가하여 정용한다.

4.3.3 검량선 범위에 들어가게 0.5% TMAH로 적절히 희석한다.

4.3.4 이 액 10 mL를 취하여 내부표준용액 100 µL를 가한 것을 시험용액 으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표. ICP-MS 측정 조건(예)

항목	조건
기기	ICP-MS
시료 도입 유속	1.0 mL/분
RF 파워	1.1 kw
플라즈마 기체	아르곤(15 L/분)
이동상 기체	아르곤(0.7 L/분)
메이크업 기체	아르곤(0.29 L/분)
m/z	요오드(I) 127 내부표준물질(Te): 128
세척용매	0.5% TMAH

5.2 계산

5.2.1 요오드 함량(ng/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 검량선에서 구한 시험용액 중 요오드 농도(ng/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-18 철

3-18-1 철(제1법 올쏘 페난트로린 비색법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 철을 건식 또는 습식으로 분해하여 올쏘 페난트로린 비색법을 적용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 도가니 또는 백금접시
- 2.1.2 회화로
- 2.1.3 수욕조
- 2.1.4 부피플라스크
- 2.1.5 비커
- 2.1.6 마그네틱바
- 2.1.7 피펫
- 2.1.8 여과지(Whatman. 541)
- 2.1.9 pH 측정기

2.2 분석장비

- 2.2.1 흡광광도계(Spectrophotometer)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Iron

분자식 : Fe, 분자량 : 55.85, CAS No. : 7439-89-6

3.2 일반시약

- 3.2.1 염산용액(Hydrochloric acid)
- 3.2.2 증류수(Distilled water)
- 3.2.3 질산용액(Nitric acid)
- 3.2.4 페난트로린(1,10-phenanthroline monohydrate)

- 3.2.5 하이드로퀴논용액(Hydroquinone)
- 3.2.6 구연산나트륨용액(Sodium citrate)
- 3.2.7 브롬페놀블루(Bromphenol blue)
- 3.2.8 수산화나트륨(Sodium chloride)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 제조

4.1.1 건식분해법

- 4.1.1.1 시료 적절량을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550~600°C의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화한다.
- 4.1.1.2 회분을 방냉 후 주의하여 물로 적신 후 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가해 수욕 상에서 완전 증발 건조시킨다.
- 4.1.1.3 건조물에 염산용액(1→4) 약 8~10 mL를 가해 수 분 가열 후 100 mL 메스플라스크에 여과한다.
- 4.1.1.4 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화한다. 이 회분을 물로 적시어 염산용액(1→4) 약 2 mL를 가해 물 약 5 mL로 희석한 후 수욕 상에서 가온하고, 여과한 액을 앞의 100 mL 메스플라스크에 채워 물을 가하여 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2 습식분해법

4.1.2.1 질산-과염소산법

- 4.1.2.1.1 시료 적절량을 200~300 mL 분해 플라스크에 취하여 질산 5 mL를 가하여 서서히 약하게 가열하고 최초의 심한 반응이 끝난 후 다시 온도를 올려 가열시킨다.
- 4.1.2.1.2 질산이 휘산되어 내용물이 거의 건조될 때까지 가열 하고 질산용액(1→2) 10 mL와 70% 과염소산 10 mL를 가하여 가열을 조절하면서 서서히 가열시킨다.
- 4.1.2.1.3 고형물이 완전히 용해되고 액이 거의 무색이 될 때까지 가열을 계속하여 분해한다. 만약, 액이 착색되어 있으면, 70% 과염소산 수 mL를 가하여 가열한다.
- 4.1.2.1.4 분해 후 냉각하고 소량의 물로 희석한 후 직경이 9 cm의

자제증발접시에 액을 씻어 옮기고 증발 건조 하여
과염소산을 증발시킨다.

4.1.2.1.5 잔류물에 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가하고 동량의 물로
희석시켜 수욕 상에서 가온하여 완전히 녹인 후 100 mL
메스플라스크에 옮겨 물을 가하여 전량을 100 mL로 하여
시험용액으로 한다.

4.1.2.2 마이크로웨이브법

4.1.2.2.1 시료 일정량을 Microwave digestion system에 넣고 질산
등으로 처리하여 분해하고, 부피플라스크에 옮겨 증류수를
가하여 일정량으로 한다.

4.1.3 올쏘 페난트로린 비색법

4.1.3.1 페난트로린용액

올쏘 페난트로린 염산염($C_{12}H_8N_2 \cdot HCl \cdot H_2O$) 0.5 g을 물을
가하여 200 mL로 하여 냉소에 보존한다.

4.1.3.2 하이드로퀴논용액

하이드로퀴논($C_6H_4O_2$)을 물에 녹여 쓰며 사용할 때마다 새로
만들어야 한다(희석배수 1%).

4.1.3.3 구연산나트륨용액

특급 구연산나트륨($Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$) 50 g을 물을 가하여 200
mL로 한다. 필요하면 여과하여 냉소에 보존한다.

4.1.3.4 브롬페놀블루시액

브롬페놀블루 0.1 g을 0.05 N 수산화나트륨액 3 mL로 녹이고
물을 가하여 250 mL로 한다.

4.1.3.5 철표준액

특급 황산제1철 암모늄($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 0.7021 g을 약
1%의 염산에 용해하여 1 L로 한다. 이 액 1 L 중에는 철 0.1
mg을 함유한다.

4.2 시험조작

4.2.1 올쏘 페난트로린 비색법

4.2.1.1 시험용액의 조제에서 얻은 시험용액 중의 10 mL를 피펫으로
25 mL의 메스플라스크에 취하고 같은 10 mL를 시험관(혹은
작은 삼각플라스크)에 취한다. 후자는 pH조절용 대조액으로

쓴다.

- 4.2.1.2 시험관 쪽에는 브롬페놀블루시액 4방울을 가하고 25 mL 메스플라스크 쪽에는 하이드로퀴논용액 1 mL와 또 페난트로린 용액 2 mL를 피펫으로 가한다.
- 4.2.1.3 구연산나트륨용액을 뷰렛 또는 5 mL 메스피펫으로 취하여 시험관의 액 중에 적가하고 액의 pH가 3.5가 되면 지시액을 가한 액의 색이 황색에서 황록색으로 변하는 점에서 적가를 그치고 이 때까지 소요된 구연산나트륨용액의 mL수를 기록한다.
- 4.2.1.4 [4.2.1.3] 같은 용량의 구연산나트륨용액을 메스플라스크 쪽에 가하여 물로 25 mL의 표선까지 희석하여 20°C 이상의 온도에서 1시간 이상 방치한다. 하룻밤 방치해도 무방하다. 완전히 발색된 액은 적어도 48시간은 퇴색하지 않는다.
- 4.2.1.5 분광광도계(Spectrophotometer)에서는 510 nm의 파장에서, 광전비색계에서는 녹색필터를 이용해서 발색액의 흡광도를 측정하여 비흡광계수를 구한다.
- 4.2.1.6 [4.2.1.5]를 미리 작성하여 놓은 검량선과 대조하여 철의 양을 구한다. 검량선은 철표준액을 물로 정확히 10배로 희석하여 1, 2, 5, 10, 15 및 20 mL를 각각 1조씩 25 mL의 메스플라스크와 시험관 또는 작은 삼각플라스크에 취한다. 10 mL 안되는 것은 물을 추가하여 거의 10 mL로 만든다.
- 4.2.1.7 상기 발색조작과 동일하게 pH 3.5에서 각 메스플라스크에서 발색시켜 흡광도를 측정하며, 농도 흡광곡선을 작성하고 시료 중의 철 함량은 계산식에 따라 산출한다.

5. 분석 및 계산

5.1 철 용량법의 계산

$$\text{철 함량(mg/g)} = S \times \frac{a}{\text{시료채취량(g)}}$$

S : 시험용액 중의 철의 양(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

3-18-2 철(제2법 원자흡광광도법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 철을 건식 또는 습식으로 분해하여 원자흡광 광도법을 적용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Iron

분자식 : Fe, 분자량 : 55.85, Cas No. : 7439-89-6

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 3-18-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 제조하고 1 N 염산용액을 사용하여 철 농도 1~5 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 조정하여 3-15-1 원자흡광 광도법에 따라 측정한다.

3-18-3 철(제3법 유도결합플라즈마법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방식으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 유도결합플라즈마검출기(Inductively Coupled Plasma, ICP)

2.2.2 유도결합플라즈마 질량검출기(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP/MS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Iron

분자식 : Fe, 분자량 : 55.85, Cas No. : 7439-89-6

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 3-18-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 제조하고 공시험용액을 포함하여 ICP 또는 ICP/MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

3-19 아연

3-19-1 아연(제1법 원자흡광광도법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 아연을 건식 또는 습식으로 분해하여 원자흡광 광도법을 적용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 유리여과기 또는 석면

2.1.5 시험관

2.1.6 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Zinc

분자식 : Zn, 분자량 : 65.39, CAS No. : 7440-66-6

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 제조

4.1.1 건식분해법

4.1.1.1 시료 적절량을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550~600°C의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화한다.

4.1.1.2 회분을 방냉 후 주의하여 물로 적신 후 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가해 수욕 상에서 완전 증발 건조시킨다.

4.1.1.3 건조물에 염산용액(1→4) 약 8~10 mL를 가해 수 분 가열 후 100 mL 메스플라스크에 여과한다.

4.1.1.4 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화한다. 이 회분을 물로 적시어 염산용액(1→4) 약 2 mL를 가해 물 약 5 mL로 희석한 후 수욕 상에서 가온하고, 여과한 액을 앞의 100 mL 메스플라스크에 채워 물을 가하여 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2 습식분해법

4.1.2.1 질산-과염소산법

4.1.2.1.1 시료 적정량을 200~300 mL 분해플라스크에 취하여 질산 5 mL를 가하여 서서히 약하게 가열하고 최초의 심한 반응이 끝난 후 다시 온도를 올려 가열시킨다.

4.1.2.1.2 질산이 휘산되어 내용물이 거의 건조될 때까지 가열 하고 질산용액(1→2) 10 mL와 70% 과염소산 10 mL를 가하여 가열을 조절하면서 서서히 가열시킨다.

4.1.2.1.3 고형물이 완전히 용해되고 액이 거의 무색이 될 때까지 가열을 계속하여 분해한다. 만약, 액이 착색되어 있다면 70% 과염소산 수 mL를 가하여 가열한다.

4.1.2.1.4 분해 후 냉각하고 소량의 물로 희석한 후 직경이 9 cm의 자제증발접시에 액을 씻어 옮기고 증발건고 하여 과염소산을 증발시킨다.

4.1.2.1.5 잔류물에 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가하고 동량의 물로 희석시켜 수욕상에서 가온하여 완전히 녹인 후 100 mL 메스플라스크에 옮겨 0.5 N 질산용액을 가하여 전량을 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2.2 마이크로웨이브법

4.1.2.2.1 시료 일정량을 Microwave digestion system에 넣고 질산

등으로 처리하여 분해하고, 부피플라스크에 옮겨 증류수를
가하여 일정량으로 한다.

4.2 시험조작

4.2.1 시험용액을 아연 농도 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 조정하여 3-15-1 중 원자
흡광광도법에 따라 측정한다.

3-19-2 아연(제2법 유도결합플라즈마법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방식으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 유도결합플라즈마검출기(Inductively Coupled Plasma, ICP)

2.2.2 유도결합플라즈마 질량검출기(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP/MS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Zinc

분자식 : Zn, 분자량 : 65.39, CAS No. : 7440-66-6

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 3-19-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 제조하고 공시험용액을 포함하여 ICP 또는 ICP/MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

3-20 칼륨

3-20-1 칼륨(제1법 원자흡광광도법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 칼륨을 건식 또는 습식으로 분해하여 원자흡광 광도법을 적용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Potassium

분자식 : K, 분자량 : 39.10, CAS No. : 7440-09-7

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric Acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 제조

4.1.1 건식분해법

4.1.1.1 시료 적절량을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550~600°C의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질

때까지 회화한다.

4.1.1.2 회분을 방냉 후 주의하여 물로 적신 후 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가해 수욕 상에서 완전 증발 건조시킨다.

4.1.1.3 건조물에 염산용액(1→4) 약 8~10 mL를 가해 수 분 가열 후 100 mL 메스플라스크에 여과한다.

4.1.1.4 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화한다. 이 회분을 물로 적시어 염산용액(1→4) 약 2 mL를 가해 물 약 5 mL로 희석한 후 수욕 상에서 가온하고, 여과한 액을 앞의 100 mL 메스플라스크에 채워 0.5 N 질산용액을 가하여 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2 습식분해법

4.1.2.1 질산-과염소산법

4.1.2.1.1 시료 적정량을 200~300 mL 분해플라스크에 취하여 질산 5 mL를 가하여 서서히 약하게 가열하고 최초의 심한 반응이 끝난 후 다시 온도를 올려 가열시킨다.

4.1.2.1.2 질산이 휘산되어 내용물이 거의 건조될 때까지 가열하고 질산용액(1→2) 10 mL와 70% 과염소산 10 mL를 가하여 가열을 조절하면서 서서히 가열시킨다.

4.1.2.1.3 고형물이 완전히 용해되고 액이 거의 무색이 될 때까지 가열을 계속하여 분해한다. 만약, 액이 착색 되어 있다면 70% 과염소산 수 mL를 가하여 가열 한다.

4.1.2.1.4 분해 후 냉각하고 소량의 물로 희석한 후 직경이 9 cm의 자제증발접시에 액을 씻어 옮기고 증발건고 하여 과염소산을 증발시킨다.

4.1.2.1.5 잔류물에 염산용액(1→2) 약 10 mL를 가하고 동량의 물로 희석시켜 수욕상에서 가온하여 완전히 녹인 후 100 mL 메스플라스크에 옮겨 0.5 N 질산용액을 가하여 전량을 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.1.2.2 마이크로웨이브법

4.1.2.2.1 시료 일정량을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고, 부피플라스크에 옮겨 증류수를 가하여 일정량으로 한다.

4.2 시험조작

- 4.2.1 시험용액을 칼륨 농도 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 되게 조정하여 3-15-1 중 원자흡광광도법에 따라 측정한다.

3-20-2 칼륨(제2법 유도결합플라즈마법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방식으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 도가니 또는 백금접시

2.1.2 회화로

2.1.3 수욕조 또는 오븐

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 피펫

2.2 분석장비

2.2.1 유도결합플라즈마검출기(Inductively Coupled Plasma, ICP)

2.2.2 유도결합플라즈마 질량검출기(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP/MS)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Potassium

분자식 : K, 분자량 : 39.10, CAS No. : 7440-09-7

3.2 일반시약

3.2.1 질산(Nitric acid)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 3-20-1의 방법에 따라 표준용액과 시험용액을 제조하고 공시험용액을 포함하여 ICP 또는 ICP/MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

3-21 조단백질

3-21-1 세미마이크로 킬달법(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 질소가 함유된 시료를 황산과 브런스워크시액을 이용하여 냉각 시킨 후 추출하여 수산화나트륨용액으로 적정하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 킬달플라스크

2.1.2 깔때기

2.1.3 수증기 유도관

2.1.4 냉각기

2.1.5 흡수용 플라스크

2.1.6 감압농축기

2.1.7 여과지(FH Type, pore size $0.5\mu\text{m}$)

2.2 분석장비

2.2.1 세미마이크로킬달장치

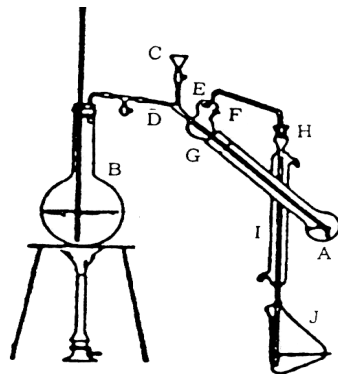


그림 1. 세미마이크로킬달장치

A : 킬달플라스크

B : 수증기 발생기로서 황산 2~3방울을 넣은 물을 넣고 갑자기 끓는 것을

피하기 위하여 비등석을 넣는다.

C : 알칼리용액을 넣는 깔때기

D : 수증기 유도관

E : 내용물이 튀어 올라오는 것을 막는다.

F : 작은 구멍(관의 안지름과 거의 같다.)

G, H : 갈아 맞춘 접속부위

I : 냉각기(바깥지름 200 mm, 안지름 350 mm, 아래 끝은 약 5 mm)

J : 흡수용 플라스크

2.3 분석장비의 준비

세미마이크로킬달장치는 경질유리를 사용하며, 장치에 쓰는 고무는 수산화나트륨시액 속에서 10~30분간 끓이고, 다음에 물에서 30~60분간 끓인 다음 물로 씻어서 쓴다. 다만 동 시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동, 반자동기기를 사용할 수 있다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

3.1.1 분해 촉진제 : $\text{CuSO}_4 : \text{K}_2\text{SO}_4(1 : 4)$

3.1.2 부런스위크(Brunswik)시액

3.1.3 증류수(Distilled water)

3.1.4 황산(Sulfate acid)

3.1.5 과산화수소(Hydrogen peroxide)

3.1.6 수산화나트륨(Sodium chloride)

3.2 시액의 조제

3.2.1 분해촉진제 : $\text{CuSO}_4 : \text{K}_2\text{SO}_4(1 : 4)$

3.2.2 부런스위크(Brunswik)시액

메틸레드 0.2 g 및 메틸렌블루 0.1 g을 에탄올 300 mL에 녹여서 여과하여 사용하고 갈색병에 보존한다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 질소 함량이 2~3 mg에 해당하는 양의 시료를 킬달플라스크에 넣고 분해 촉진제 약 0.5 g을 넣은 후 황산 3~5 mL를 넣은 다음

흔들어 주면서 30%과산화수소 1 mL를 조금씩 넣는다.

4.1.2 플라스크를 금망상에서 가열하고 분해액이 투명한 담청색이 되면 다시 1~2시간 가열한다.

4.1.3 분해액을 냉각시킨 후 물 20 mL를 주의하여 가한 후 이 플라스크를 증류장치에 연결한다.

4.1.4 환류플라스크를 물 10 mL로 씻어 분액깔때기에 합친다.

4.2 시험조작

4.2.1 증류 및 적정

4.2.1.1 증류장치의 흡수플라스크에 0.05 N 황산 10 mL를 취하여 이에 부런스위크시액 2~3방울을 떨어뜨려서 냉각기의 끝부분을 액면 밑에 담그고 작은 깔때기로부터 30% 수산화나트륨용액 25 mL를 가한다.

4.2.1.2 수증기 발생기로부터 수증기증류를 하여 증류액 약 100 mL를 받은 후 냉각기의 끝을 액면에서 조금 떼어 다시 유액 수 mL를 유취하여 다시 냉각기의 끝을 소량의 물로 수기 내에 씻어 넣는다.

4.2.1.3 수기 내에 들어 있는 유액을 0.05 N 수산화나트륨액으로 부런스위크시액이 녹색으로 변할 때까지 적정한다. 같은 방법으로 공시험을 한다.

$$0.05 \text{ N 황산 } 1 \text{ mL} = 0.7003 \text{ mg N}$$

5. 분석 및 계산

5.1 계산

5.1.1 시료의 분해액을 전부 사용해서 적정했을 때의 식이므로 분해액의 일부를 사용할 때에는 그 계수를 곱한다. 여기서 얻은 질소량에 질소 계수(6.25)를 곱하여 조단백질의 양으로 한다.

[계산식]

$$N(\%) = 0.7003 \times (a - b) \times \frac{100}{\text{시료 채취량(mg)}}$$

N : 질소

a : 공시험에서 증화에 소요된 0.05 N 수산화나트륨액의 mL수

b : 본시험에서 증화에 소요된 0.05 N 수산화나트륨액의 mL수

0.05N 황산 1 mL = 0.7003 mg N

[계산식]

조단백질(%) = N(%)×질소계수(6.25)

3-21-2 듀마스법(연소법, 제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 분말, 액체 등의 균질한 식품에 적용이 가능하며, 질소분석기를 이용하여 검체는 순수한 산소가 사용되는 고온의 연소공정으로 인해 질소성분이 질소산화물 형태로 산화되며, 질소산화물은 환원력이 높은 구리(또는 텅스텐 등)와 반응하여 질소로 환원된다. 질소가스는 열전도도 검출기를 통해 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 분석장비

2.1.1 연소로(Combustion furnace)

2.1.2 환원로(Reduction furnace)

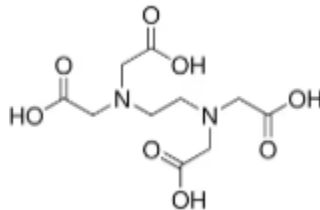
2.1.3 열전도도검출기(TCD, Thermal Conductivity Detector)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid)

분자식 : $C_{10}H_{16}N_2O_8$, 분자량 : 292.24, CAS No. : 60-00-4



4. 시험과정

4.1 검량선 작성용 표준물질 조제

4.1.1 질소분석기의 특성에 따라 EDTA의 양을 적절하게 조절하여 칭량한다.

4.2 분석시료 조제

4.2.1 시료 0.1 ~ 1.0 g을 정밀하게 취하여 칭량한다.

5. 분석 및 계산

5.1 질소분석기를 이용하여 자동으로 연소, 환원 및 검출과정이 수행된다.

5.2 4.1.1에 따라 EDTA를 이용하여 검량선을 작성한 후 시료 중 총질소(%)를 구하고, 다음 식에 의해 시료 중 조단백질(%)를 산출한다.

5.3 계산

5.3.1 조단백질% = 총질소(%) × 질소계수

3-22 아미노산

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 단백질을 동결건조 한 후 단백질 가수분해 장치를 이용하여 가수분해 한 후 구연산나트륨 완충액 또는 염산용액으로 단백질을 분리하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 용매용 일회용 실린지
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.4 환류 플라스크(100 mL)
- 2.1.5 분액깔때기(Sperate funnel)
- 2.1.6 감압농축기
- 2.1.7 여과지(FH Type, pore size 0.5 μ m)

2.2 분석장비

- 2.2.1 단백질 가수분해장치
- 2.2.2 아미노산 자동분석기
- 2.2.3 고속액체크로마토그래프

2.3 분석장비의 준비

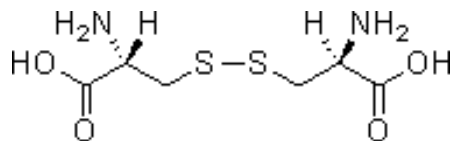
단백질 가수분해장치는 정온가열로써 100~150℃의 온도범위에서 $\pm 1^\circ\text{C}$ 로 제어 가능한 것이어야 한다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-Cystine

분자식 : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, 분자량 : 240.30, CAS No. : 349-46-2



3.1.2 D-Tryptophane

분자식 : $C_{11}H_{12}N_2O_2$, 분자량 : 204.23, CAS No. : 153-94-6

3.2 일반시약

3.2.1 염산(Hydro chloride 20%)

3.2.2 과개미산용액 (과산화수소: 개미산= 1 : 9)

3.2.3 수산화나트륨용액(Sodium chloride)

3.2.4 가용성전분(soluble starch)

3.2.5 트리클로로초산용액(Trichloro acetic acid)

3.2.6 구연산나트륨

3.3 시액의 조제

3.3.1 6 N 염산

3.3.2 과개미산용액

30% 과산화수소(특), 88% 개미산(특)을 1 : 9의 비율로 혼합하여 실온에서 한 시간 방치 후 0℃로 냉각한다. 사용 시 한다.

3.3.3 2 N 수산화나트륨액

3.3.4 가용성전분

아세톤으로 세척·건조하여 사용한다.

3.3.5 16%(w/v)트리클로로초산용액

50%(w/v)트리클로로초산을 사용 시 희석하여 사용한다.
50% 트리클로로초산용액은 냉암소에 보관한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액

4.1.1 아미노산 표준용액을 0.2 N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산용액으로 적당히 희석하여 사용한다.

4.2 시험용액

<단백질구성 아미노산>

시료는 동결건조를 한 후 분말로 하여 균질화한 것을 분석에 사용한다.
또 지방함량이 높은 시료는 동결건조 후 에테르에 침출, 탈지하여 사용한다.

4.2.1 시스틴, 트립토판 이외의 아미노산 정량용 시험용액

- 4.2.1.1 단백질을 약 10 mg에 0.05%(w/v) 2-머캅토에탄올(C_2H_6SO)을 함유한 6 N 염산을 단백질 양에 대하여 약 1,000배량 즉, 10 mL를 가한다.
- 4.2.1.2 드라이아이스·에탄올로 동결한 후 탈기장치에 장착하여 용해, 동결을 반복하여 충분히 탈기한다.
- 4.2.1.3 봉관하여 정온가열로 $110^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, 22~24시간 가수분해 한 후 봉관을 절단한다.
- 4.2.1.4 즉시 감압하여 $40^{\circ}C$ 에서 농축조건을 반복하여 염산을 최대한 제거한다.
- 4.2.1.5 0.2 N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산용액으로 일정량 만들어 시험용액으로 한다. 침전이 있는 경우에는 멤브레인 필터를 사용하여 여과한다.
- 4.2.2 시스틴 정량용 시험용액
 - 4.2.2.1 단백질을 약 10 mg 함유하는 시료를 정밀히 달아 미리 $0^{\circ}C$ 로 냉각시켜 과개미산 용액 10 mL를 가한다.
 - 4.2.2.2 단백질이 가용성인 경우 $0^{\circ}C$ 에서 4시간, 불용성인 경우 $0^{\circ}C$ 에서 하룻밤 방치한다.
 - 4.2.2.3 방치 후 공기를 흡입하고 소량의 물을 가해 동결 건조한다.
 - 4.2.2.4 잔사를 0.05%(v/v) 2 머캅토에탄올 함유의 6 N 염산 10 mL를 사용하여 가수분해 시험관으로 옮긴다.
 - 4.2.2.5 동결한 후, 탈기장치에 장착하여 충분히 탈기한 후 봉관하여 $110 \pm 1^{\circ}C$ 에서 18시간 분해한다.
 - 4.2.2.6 시스틴, 트립토판 이외의 아미노산 정량용 시험용액에 따라 시험 용액을 조제한다.
- 4.2.3 트립토판 정량용 시험용액
 - 4.2.3.1 단백질을 약 10 mg 함유하는 시료를 가수분해 시험관에 정밀히 달아 넣고, 가용성전분 100 mg을 가한 다음 4.2 N 수산화 나트륨용액 3 mL를 가한다.
 - 4.2.3.2 동결시킨 후, 탈기장치에 장착하여 충분히 탈기하고 밀봉하여 $135 \pm 1^{\circ}C$ 에서 22시간 가수분해한다.
 - 4.2.3.3 가수분해 후 봉관을 잘라 열고 6 N 염산으로 중화하여 0.2 N 구연산나트륨완충액(pH 4.25)으로 일정량을 만들어 시험용액

으로 한다.

- 4.2.3.4 용액이 탁한 경우 30,000~40,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취한다.

<유리 아미노산>

- 4.2.4 물에 의한 추출 - 고체 또는 페이스트상의 시료에 적용된다.

- 4.2.4.1 균질한 시료 약 1 g을 정밀히 달아 약 10배량을 물을 가해 비등 수욕 상에서 가열하여 응고시킨 다음 여과하여 물층을 취한다.

- 4.2.4.2 잔사는 2~3회 소량의 물로 세정하고, 세액은 앞서의 물과 합한다. 지방이 있는 경우에는 에테르로 추출하여 제거한다.

- 4.2.4.3 물층을 감압 하에 농축 건조하여 얻은 잔사를 0.2 N 구연산 나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산으로 용해하여 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

- 4.2.4.4 불용물질이 있는 경우에는 멤브레인 필터를 사용하여 여과한다.

- 4.2.5 트리클로로초산법 - 액체상의 시료에 적용한다.

- 4.2.5.1 시료 1.0~3.0 mL를 시험관에 달아 16% 트리클로로초산 용액을 동 용량 가하여 15분간 진탕한다.

- 4.2.5.2 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 아미노산 자동분석기 조건

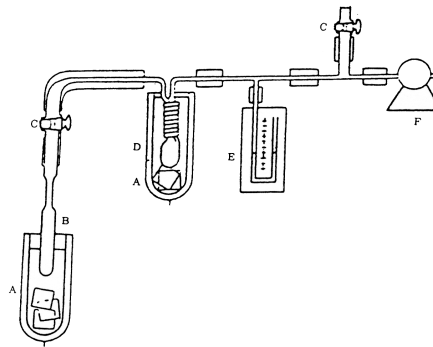
- 5.1.1 완충액, 발색시약의 유무, 칼럼항온조의 온도를 점검하고, 자동완충액 전환기구 및 정유량 펌프, 유량을 소정의 조건에 따라 설정하고 측정을 실시한다.

- 5.1.2 정성분석을 위하여 표준물질과 시험용액을 동일한 조건에서 분석하여 머무름 시간이 일치하는 성분을 비교 동정한다.

- 5.1.3 정량분석의 경우에는 미리 구해 놓은 농도의 아미노산표준의 피크 면적과 함량으로부터 검량 곡선을 작성한 다음 시험용액으로부터 얻어진 피크면적으로 시험용액 중의 아미노산 함량을 계산한다.

5.2 고속액체크로마토그래프에 의한 정성 및 정량

- 5.2.1 아미노산자동분석기에 의한 정량 및 정성에서와 같이 시험용액을 준비한다.
- 5.2.2 각각의 고속액체크로마토그래프에서 주어진 조건에 맞추어 유도체를 만든 후 시료와 동일 조건하에 조제한 아미노산표준용액의 피크면적과 함량으로부터 검량곡선을 작성한다.
- 5.2.3 시험용액에서 얻어진 피크면적으로 시험용액 중의 아미노산 함량을 계산한다.



- A : 드라이아이스·에탄올
 B : 가수분해용 시험관
 C : 진공코오드
 D : 트랩
 E : 마노메타
 F : 펌프

3-23 글루코사민

3-23-1 글루코사민(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 글루코사민을 추출한 후 액체크로마토그래프를 이용 하여 분석하는 방법으로 시차굴절계검출기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 시차굴절계검출기(Refractive Index Detector)

2.2.3 칼럼오븐

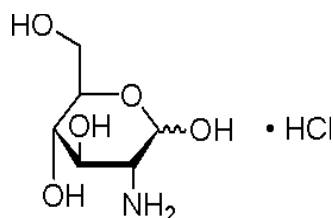
2.2.4 NH₂-60칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-글루코사민 염산염(D-glucosamine hydrochloride)

분자식 : C₆H₁₃NO₅ · HCl, 분자량 : 215.63, CAS No. : 66-84-2



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 D-글루코사민 염산염 표준물질 0.5 g을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 증류수 50 mL를 가하여 완전히 녹인다.

4.1.3 아세토니트릴을 표선까지 채워 100 mL로 한다.

4.1.4 상기 표준원액을 적절히 희석하여 표준용액을 준비한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 글루코사민으로서 0.5 g이 되도록 시료를 정밀히 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다(필요한 경우 탈지한다).

4.2.2 증류수 50 mL를 가하여 녹인 후 아세토니트릴을 표선까지 채운다.

4.2.3 0.45 μ m의 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼 온도	40°C
이동상	증류수 : 아세토니트릴 (30 : 70)
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 글루코사민 염산염 또는 황산염(황산염화나트륨염*, 황산염화칼륨염**) 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times F$

C : 시험용액 중의 글루코사민 염산염의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

F : 보정계수

* 글루코사민 황산염화나트륨염 $[(C_6H_{14}NO_5)_2 \cdot SO_4 \cdot 2NaCl] = 1.33$
(글루코사민 황산염화나트륨염 분자량/글루코사민염산염 분자량
 $\times 2, 573/431$)

** 글루코사민 황산염화칼륨염 $(C_6H_{14}NO_5)_2 \cdot SO_4 \cdot 2KCl] = 1.40$
(글루코사민 황산염화칼륨염 분자량/글루코사민염산염 분자량 \times
 $2, 605/431$)

3-23-2 글루코사민(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 글루코사민을 추출한 후 액체크로마토그래프를 이용 하여 분석하는 방법으로 증기화광산란검출기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 증기화광산란검출기(Evaporative Light Scattering Detectors, ELSD)

2.2.3 칼럼오븐

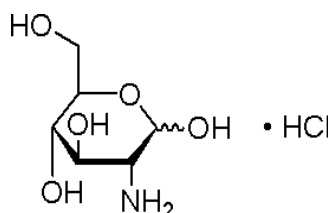
2.2.4 NH₂-60칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-글루코사민 염산염(D-glucosamine hydrochloride)

분자식 : C₆H₁₃NO₅ · HCl, 분자량 : 215.63, CAS No. : 66-84-2



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.2 개미산(Formic acid)

3.2.3 트리에틸아민(Triethylamine)

3.3 시액의 조제

3.3.1 완충용액

증류수 5 L에 개미산 4 mL를 넣어 섞은 후 트리에틸아민 12.5 mL을 넣어 pH 4.5로 맞춘다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 D-글루코사민 염산염 표준물질 0.5 g을 100 mL용 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 증류수 50 mL를 가하여 완전히 녹인다.

4.1.3 아세토니트릴을 표선까지 채워 100 mL로 한다.

4.1.4 상기 표준원액을 적절히 희석하여 표준용액을 준비한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 글루코사민으로서 0.5 g이 되도록 시료를 정밀히 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다(필요한 경우 탈지한다).

4.2.2 증류수 50 mL를 가하여 완전히 녹인다.

4.2.3 아세토니트릴을 표선까지 채워 100 mL로 한다.

4.2.4 이를 0.45 μ m의 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	40 μ L
칼럼온도	40°C
Nebulization Temp.	70%
Pressure (N ₂ gas)	40psi
Drift tube Temp.	85°C
이동상	완충용액 : 아세토니트릴 (50 : 50)
유량	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 글루코사민염산염 또는 황산염(황산염화나트륨염*,

황산염화칼륨**) 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times F$

C : 시험용액 중의 D-글루코사민 염산염의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

F : 보정계수

* 글루코사민 황산염화나트륨염 $[(C_6H_{14}NO_5)_2 \cdot SO_4 \cdot 2NaCl]$ = 1.33
(글루코사민 황산염화나트륨염 분자량/글루코사민염산염 분자량
× 2, 573/431)

** 글루코사민 황산염화칼륨염 $(C_6H_{14}NO_5)_2 \cdot SO_4 \cdot 2KCl]$ = 1.40
(글루코사민 황산염화칼륨염 분자량/글루코사민염산염 분자량 ×
2, 605/431)

3-24 N-아세틸글루코사민

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 존재하는 N-아세틸글루코사민을 아세토니트릴용액으로 추출하여 아민칼럼을 통해 N-아세틸글루코사민을 분리하는 방법으로 시차 굴절계를 이용하여 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 부피플라스크(100 mL)

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 시차굴절계(Refractive Index Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 NH₂P-50 (안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 polyamine bonded polymer gel) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

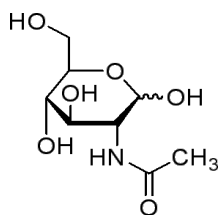
이동상은 증류수와 아세토니트릴을 25 : 75로 조제하여 분당 0.8 mL씩 충분한 시간동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 N-아세틸글루코사민(N-Acetylglucosamine, 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose)

분자식 : C₈H₁₅NO₆, 분자량 : 221.21, CAS No. : 7512-17-6



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 N-아세틸글루코사민 표준물질 500 mg을 정밀히 취한다.
- 4.1.2 위의 표준물질을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.3 증류수 50 mL을 가하여 녹인다.
- 4.1.4 아세토니트릴을 넣어 표선까지 채운다.
- 4.1.5 위의 용액을 아세토니트릴로 적절히 희석하여 표준용액으로 준비한 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

- 4.2.1 시료(N-아세틸글루코사민으로서 200 mg) 일정량을 정밀히 취한다.
- 4.2.2 위의 시료를 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.2.3 증류수 50 mL을 가하여 녹인다.
- 4.2.4 아세토니트릴을 넣어 표선까지 채운다.
- 4.2.5 이를 0.45 μ m의 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	20 μ L
칼럼온도	35~40°C
이동상	증류수 : 아세토니트릴(25 : 75)
유량	0.8 mL/분

5.2 계산

N-아세틸글루코사민 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 N-아세틸글루코사민의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-25 베타글루칸

3-25-1 베타글루칸(제 1법 영지버섯자실체추출물)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 효소처리하여 베타글루칸만을 침전 시킨 후 글루코오스 형태로 분해하고 발색시켜 분광광도계로 정량하는 방법으로 영지버섯자실체추출물에 적용하며 최대흡수파장인 470 nm에서 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 삼각플라스크

2.1.2 pH 측정기

2.1.3 항온 진탕기

2.1.4 원심분리기

2.1.5 부피플라스크(50 mL)

2.2 분석장비

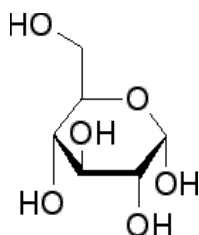
2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 글루코오스(D-(+)-glucose)

분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 50-99-7



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 α -아밀라아제(α -amylase, Sigma A3306 또는 Termamyl 300L, Novo 361-6282)

3.2.3 셀룰라아제(Cellulase, Sigma C8546)

3.2.4 프로테아제(Protease, Sigma P3910)

3.2.5 아밀로글루코시다제(Amyloglucosidase, Sigma A9913)

3.2.6 0.1 N 염산(Hydrochloric acid)

3.2.7 황산(Sulfuric acid)

3.2.8 페놀(Phenol)

3.2.9 0.1 N 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.3 시액의 조제

3.3.1 5% 페놀용액

페놀 5 g을 취하여 증류수를 가해 100 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 D-글루코오스 표준물질 0.1 g을 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 증류수를 가하여 완전히 녹이고 100 mL로 한 후 희석하여 표준 원액으로 한다.

4.1.3 위의 용액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제(전처리 과정)

4.2.1 베타글루칸으로서 100 mg의 시료를 삼각플라스크에 취한다(지방이 10%이상인 경우 탈지하고, 당을 많이 함유한 경우 85% 에탄올 용액을 이용하여 베타글루칸 20 mg당 10 mL씩으로 세척한다).

4.2.2 증류수 10 mL를 가한다.

4.2.3 여기에 아밀라아제(20,000~60,000 U/mL) 0.1 mL을 가한다.

4.2.4 0.1 N 수산화나트륨용액을 이용하여 pH 6.9로 한 후 20°C 항온 수조에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다.

4.2.5 위의 용액에 0.1 N 염산용액으로 pH 5.0으로 맞추고 셀룰라아제 (1,600 U/mL)를 0.1 mL 넣고 37°C 항온수조에서 2시간동안 진탕 하여 효소분해 시킨다.

- 4.2.6 위의 용액에 프로테아제(600~1,300 U/mL) 약 0.1 mL을 넣고 0.1 N 수산화나트륨용액으로 pH 7.5로 한 후 37°C 항온수조에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해 시킨다.
- 4.2.7 위의 용액에 아밀로글루코시다제(10,000 U/mL) 약 0.1 mL을 넣고 0.1 N 염산용액으로 pH 4.8로 한 후 60°C 항온수조에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다.
- 4.2.8 효소분해물[4.2.7]에 95% 에탄올 40 mL를 가하여 4°C에서 12시간 이상 침전 시킨다.
- 4.2.9 위의 용액을 원심분리(3,000 g, 20분)하여 시료의 침전물을 취한다.
- 4.2.10 시료의 침전물[4.2.9]에 80% 에탄올 50 mL를 가하여 4°C에서 1시간동안 침전시킨다.
- 4.2.11 위의 용액을 원심분리(3,000 g, 20분) 한다.
- 4.2.12 원심분리된 침전물[4.2.11]에 증류수 10 mL를 가한 후 침전물을 혼합하여 균질화시킨다.
- 4.2.13 위의 용액을 증류수로 50 mL가 되도록 한 후, 이를 적정농도가 되도록 희석하여 시험용액으로 한다.
- 4.3 시험용액의 조제(발색 과정)
- 4.3.1 15 mL 시험관에 농도별 표준용액과 시험용액(공시험포함)으로 구분하여 각각 5% 페놀용액 1 mL를 넣는다.
- 4.3.2 위의 시험관에 농도별 표준용액[4.1]을 각각 1 mL씩 가하고, 시험용액은 시험용액[4.2] 0.1 mL과 증류수 0.9 mL를 가한다. 공시험은 증류수 1 mL을 가한다. 이 용액들을 10초간 잘 흔들어 섞는다.
- 4.3.3 위의 시험관에 각각 황산 5 mL을 가하여 혼합한다.
- 4.3.4 실온에서 20분간 반응시킨다.

5. 분석 및 계산

5.1 흡광도 측정

- 5.1.1 파장 470 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

- 5.2.1 베타글루칸함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 10 \times 1/1,000 \times 0.9$

C: 시험용액중의 글루코오스 농도($\mu\text{g/mL}$)

a: 시험용액의 전량(mL)
b: 희석배수
S: 시료 채취량(g)
10: 발색과정의 희석배수
1/1,000: 단위 환산 계수
0.9: 베타글루칸 전환계수(162/180)

3-25-2 베타글루칸(제2법 상황버섯추출물)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료에 있는 총 글루칸에서 베타글루칸 외의 글루칸 함량을 제거하여 베타글루칸의 값을 구한다. 산분해와 효소처리를 하여 글루코오스 형태로 분해한 후 발색시켜 분광광도계로 정량하는 방법으로 상황버섯 추출물에 적용하며 최대흡수파장인 470 nm에서 분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 분석저울

2.1.2 항온수조

2.1.3 pH 미터

2.1.4 부피플라스크(100 mL)

2.1.5 마개 있는 50 mL 유리시험관, 5 mL 시험관

2.1.6 원심분리기

2.1.7 교반기

2.1.8 유리섬유여과지(Whatman GF/A 유리섬유 필터 또는 이와 동등한 것)

2.2 분석장비

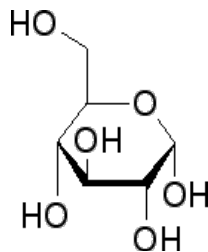
2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 글루코오스(D-(+)-glucose)

분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 50-99-7



3.2 일반시약

3.2.1 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

3.2.2 초산(Acetic acid)

3.2.3 진한염산(Hydrochloric acid, 37%(v/v))

3.2.4 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.5 버섯효모베타글루칸 분석키트(Mushroom and Yeast Beta-glucan assay procedure Kit, Megazyme, K-YBGL, Ireland)

[키트의 구성]

① Bottle 1 : 1,3-베타글루카나아제(1,000 U/mL), 베타글루코시다아제 (20 U/mL)혼합액

② Bottle 2 : Amyloglucosidase(1,630 U/mL), Invertase(500 U/mL), 50% 글리세린 혼합액

③ Bottle 3 : 포도당 반응 완충액

④ Bottle 4 : 포도당 측정 반응액(글루코오스 옥시다아제 12,000 U/L 이상, 페록시다아제 650 U/L 이상, 4-아미노안티피린 0.4 mM)

3.2.6 증류수

3.3 시액의 조제

3.3.1 4 M 수산화나트륨용액

수산화나트륨 80.0 g을 증류수로 용해하여 500 mL로 정용한다.

3.3.2 200 mM 초산완충액(Acetate buffer, pH 5.0)

초산 11.6 mL를 900 mL 증류수에 용해한 후 4 M 수산화나트륨 용액으로 pH를 5.0으로 맞추어 1 L로 정용한다.

3.3.3 1.2 M 초산완충액(Acetate buffer, pH 3.8)

초산 69.6 mL를 800 mL 증류수에 용해한 후 4 M 수산화나트륨 용액으로 pH를 3.8로 맞추어 1 L로 정용한다.

3.3.4 2 M 수산화칼륨용액

수산화칼륨 112 g을 증류수로 용해하여 1 L로 정용한다.

3.3.5 베타글루칸 효소혼합액

K-YBGL의 Bottle 1에 200 mM 초산완충액(pH 5.0) 8 mL을 첨가한다. 1 mL 씩 나누어 -20℃에서 보관한다.

3.3.6 알파글루칸 효소혼합액

K-YBGL에 들어있는 Bottle 2를 그대로 사용한다.

3.3.7 발색시약 (GPOD : glucose oxidase/peroxidase)

K-YBGL에 들어있는 Bottle 3 전량을 1L 부피플라스크에 넣은 후 증류수로 희석하고 1 L로 정용한다. 이 용액 소량으로 Bottle 4 전량을 녹이고 다시 Bottle 3가 녹아있는 이전 1L 부피플라스크에 넣어 충분히 섞은 후 사용한다. 40 mL 씩 나누어 -20°C에서 보관한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

4.1.1 D-글루코오스 표준물질 500 mg을 50 mL 부피플라스크에 넣는다

4.1.2 증류수를 가하여 완전히 녹인 후 표선까지 정용하여 표준원액으로 한다.

4.1.3 표준원액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 총 글루칸 측정

4.2.1.1 시료는 0.5 mm의 체를 통과할 수 있도록 분쇄한다

4.2.1.2 마개가 있는 50 mL 유리시험관에 베타글루칸으로서 10 mg에 해당하는 시료를 칭량한다.

4.2.1.3 진한 염산을 각 시험관에 1.5 mL씩 가한 후 덩어리가 생기지 않도록 강하게 교반한 후 40°C 항온수조에서 45분간 반응시킨다.

4.2.1.4 각 시험관에 증류수 10 mL를 첨가하고 강하게 교반한다.

4.2.1.5 시험관 뚜껑을 완전히 닫지 않은 상태로 100°C 항온수조에서 5분간 방치한 후 뚜껑을 완전히 닫아 2시간 반응시킨다.

4.2.1.6 반응 후 실온까지 냉각하여 2 M 수산화칼륨용액을 10 mL 가한다.

4.2.1.7 200 mM 초산완충액으로 시험관의 잔여물을 남기지 않고 100 mL 부피플라스크로 옮긴 후 표선까지 정용한다.

4.2.1.8 유리섬유여과지(Whatman GF/A)를 이용하여 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4.2.1.9 시험용액 0.1 mL을 새로운 5 mL 시험관에 옮긴 후 베타글루칸 효소혼합액 0.1 mL을 각 시험관에 가하여 40°C에서 30분간

반응시킨다(총 글루칸 측정 효소공시험 시험관에 200 mM 초산완충액 0.1 mL와 베타글루칸 효소혼합액 0.1 mL첨가 하고, 발색시약 공시험 시험관에 200 mM 초산완충액 0.2 mL를 가한 후 다음단계 부터 함께 반응시킨다).

4.2.1.10 반응 후 발색시약(GOPD) 3 mL을 가하여 실온에서 10분간 반응시킨다.

4.2.1.11 증류수를 대조액으로 분광광도계 파장 510 nm에서 흡광도를 측정한다.

4.2.2 베타글루칸을 제외한 글루칸 측정

4.2.2.1 시험관에 베타글루칸으로서 10 mg에 해당하는 시료를 칭량 한다(효소공시험을 동시에 진행한다).

4.2.2.2 2 M 수산화칼륨용액을 각 시험관에 2 mL씩 가한 후 덩어리가 생기지 않도록 강하게 교반한다(덩어리가 생겨 제거되지 않을 경우 실온에 20분간 방치한 후 강하게 교반한다).

4.2.2.3 1.2 M 초산완충액 8 mL을 가하여 강하게 교반한 후 알파 글루칸 효소혼합액 0.2 mL을 가하여 40℃ 항온수조에서 30분간 반응시킨다.

4.2.2.4 반응액을 원심분리(1,500 g, 10분)하여 시험용액으로 한다.

4.2.2.5 시험용액 0.1 mL을 새로운 시험관에 옮긴 후 발색시약 (GOPD) 3 mL을 각 시험관에 가하여 실온에서 10분간 반응 시킨다.

4.2.2.6 증류수를 대조액으로 분광광도계 파장 510 nm에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 흡광도 측정

5.1.1 증류수를 대조액으로 하여 파장 510 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

5.2.1 농도별 표준용액의 흡광도에서 발색시약 공시험 흡광도를 뺀 값을 검량선 작성에 이용한다.

5.2.3.2 총 글루칸 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 0.9$

5.2.3.3 베타글루칸을 제외한 글루칸의 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 0.9$

5.2.3.4 베타글루칸 함량(mg/g)

= 총 글루칸 함량(mg/g) - 베타글루칸을 제외한 글루칸의
함량(mg/g)

C : 시험용액의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석 배수

S : 시료중량 (mg)

0.9 : 베타글루칸 전환계수(162/180)

3-26 식이섬유

3-26-1 식이섬유(제1법)

1. 시험방법의 요약

건조된 시료 두 개를 준비하고 이를 내열성 α -아밀라아제, 프로테아제, 아밀로글루코시다제 효소로 연속적으로 분해하여 전분과 단백질을 제거한다. 이때 10% 이상의 지방을 함유한 식품은 건조 전에 지방을 제거하여 시험한다. 총 식이섬유(TDF) 정량은 효소분해물에 녹아 있는 식이섬유를 에탄올로 처리하여 침전시켜 여과하고 에탄올과 아세톤으로 세척한 후, 건조하여 그 무게를 확인한다. 물불용성 식이섬유(IDF)는 효소분해물을 여과하여 잔사를 따뜻한 물로 세척하고 그 무게를 확인하여 정량한다. 수용성식이섬유(SDF)는 IDF의 전처리과정에서 얻은 여과액과 세척액을 합하여 에탄올로 침전시킨 후 여과하여 잔류물을 건조하고 무게를 확인 하여 정량한다. 총 식이섬유, 물불용성 및 수용성식이섬유 함량계산 시 잔사의 무게 중 단백질 및 회분량은 보정해준다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 비커 : 400 또는 600 mL Tall-form

2.1.2 유리여과기 : 기공 40~60 μm (ASTM 기준)의 용융 유리디스크가 있는 Pyrex 60 mL(Corning No. 36060 Buchner 또는 이와 동등한 것). 525°C에서 하룻밤 동안 회화하고 회화로 온도가 130°C 까지 떨어지면 유리여과기를 상온에서 방냉한 후, 2% 세척액에 1시간 동안 담근 후 물로 씻고 증류수로 행군 다음 아세톤 15 mL을 사용하여 마지막으로 세척하고 바람을 불어 대기 중 방치하여 건조 시킨다. 건조된 유리여과기에 규조토 약 1.0 g을 넣고 130°C에서 항량한 후, 데시케이터에서 1시간 동안 실온에 방냉하여 규조토를 포함한 유리여과기의 무게를 0.1 mg까지 칭량하여 기록한다.

- 2.1.3 진공장치 : 조절장치를 갖춘 진공펌프나 아스피레이터, 1L 용량의 여과용 가지달린 플라스크 및 여과용 플라스크에 사용하는 고무 아답터
- 2.1.4 진탕 항온수조 : $98\pm 2^{\circ}\text{C}$ 까지 가온 및 온도의 유지가 가능하고 60°C 로 일정하게 온도를 유지할 수 있는 것
- 2.1.5 저울 : 0.1 mg 까지 측정이 유효한 것
- 2.1.6 회화로 : $525\pm 5^{\circ}\text{C}$ 유지할 수 있는 것.
- 2.1.7 오븐 : 105°C 와 $130\pm 3^{\circ}\text{C}$ 유지할 수 있는 것
- 2.1.8 데시케이터 : 실리카겔이나 이와 동등한 건조제가 있는 것. 건조제는 필요 시 130°C 에서 하룻밤 동안 건조하여 사용한다.
- 2.1.9 pH meter : 온도 보정이 되고 pH 4, 7, 10 버퍼용액으로 표준화 된 것
- 2.1.10 피펫 : 일회용 팁이 사용가능한 것으로 용량 100~300 μL 및 5 mL
- 2.1.11 디스펜서 : 15 ± 0.5 mL용 3개(78% ethanol, 95% ethanol, acetone용), 40 ± 0.5 mL용 1개(버퍼용)
- 2.1.12 자석 교반기 및 마크네틱바

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

- 3.1.1 에탄올(Ethanol)
- 3.1.2 규조토(Celite 545 AW)
- 3.1.3 내열성 α -아밀라아제(α -amylase heat stable)
- 3.1.4 프로테아제(protease)
- 3.1.5 아밀로글루코시다아제(Amyloglucosidase)
- 3.1.6 MES(2-(N-Morpholin)ethanesulfonic acid)
- 3.1.7 TRIS(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)
- 3.1.8 아세톤(Acetone)

3.2 시액의 조제

3.2.1 에탄올 수용액

- (1) 85% : 1 L 정용 플라스크에 95% 에탄올 895 mL을 넣고 물을 표선까지 채워 조제한다.
- (2) 78% : 1 L 정용 플라스크에 95% 에탄올 821 mL을 넣고 물을

표선까지 채워 조제한다.

3.2.2 내열성 α -아밀라아제 용액 : 아래의 효소분해능을 만족하거나 5)효소 활성 검증 시 회수율을 만족하는 것으로 글리세롤이 없을 것, 0~5°C 에서 보관하며 사용한다(Sigma사 Catalog No. A 3306 또는 이와 동등한 것)

- ※ (1) 가용성 전분을 기질로 하는 Nelson/Somogyi reducing sugar 방법에 기초하는 것 : $10,000 \pm 1,000$ units/mL(1 unit: pH 6.5, 40°C에서 1분당 1 μ mole reducing sugar equivalents를 만드는 데 필요한 효소의 양)
- ※ (2) 내열성 α -글루코시다제의 존재 시 기질로 p-nitrophenyl-maltosaccharide를 사용하는 Ceralpha방법에 기초한 것 : $3,000 \pm 300$ Ceralpha units/mL(1 unit: pH 6.5, 40°C에서 1분당 1 μ mole p-nitrophenol을 만드는 데 필요한 효소의 양)

3.2.3 프로테아제 효소용액: 아래의 효소분해능을 만족하거나 5)효소 활성 검증 시 회수율을 만족하는 것으로서 0~5°C에서 보관하고 MES/ TRIS 완충액으로 희석하여 50 mg/mL로 사용 시 조제한다(Sigma사 Catalog No. P 3910 또는 이와 동등한 것)

- ※ (1) Casein assay : 300~400 units/mL (1 unit: pH 8.0, 40°C에서 가용성 casein으로부터 1분당 1 μ mole tyrosine equivalents를 가수분해하는데 필요한 효소의 양) ; 7~15 units/mg (1 unit: pH 7.5, 37°C에서 casein으로부터 1분당 1.0 μ mole tyrosine에 해당하는 색 (Folin-Ciocalteu reagent)을 내는데 필요한 효소의 양)
- (2) Azo-casein assay : 300~400 units/mL(1 unit endo- peptidase activity: pH 8.0, 40°C에서 가용성 casein으로부터 1분당 1 μ mole tyrosine equivalents를 가수분해하는데 필요한 효소의 양)

3.2.4 아밀로글루코시다제 용액 : 아래의 효소분해능을 만족하거나 5)효소 활성 검증 시 회수율을 만족하는 것으로서 0~5°C에서 보관하며 사용한다. 글리세롤이 없을 것(Sigma사 Catalog No. A 9913 또는 이와 동등한 것)

- ※ (1) Starch/glucose oxidase-peroxidase 방법 : 2,000~3,300 units/mL(1 unit: pH 4.5, 40°C에서 1분당 1 μ mole 포도당을

만드는 데 필요한 효소의 양)

(2) PNPBM (p-nitrophenyl β -maltosidase) 방법 : 130~200 units/
mL(1 unit: β -글루코시다제가 과량 존재할 때, 40°C에서 1분당
p-nitrophenyl β -maltosidase가 1 μ mole p-nitrophenol을
만드는 데 필요한 효소의 양)

3.2.5 규조토(Diatomaceous earth) : 산세척한 것(Sigma사 Catalog No.
C 8656 또는 Fisher Scientific사 Catalog No. C-211, 산세척
또는 그와 동등한 것)

3.2.6 세척용액 : 실험실용 액체 계면활성 세정제(International products
사의 Micro 혹은 그와 동등한 것)를 2% 수용액으로 조제한다.

3.2.7 MES : 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid(Sigma사 Catalog
No. M-8250 또는 이와 동등한 것)

3.2.8 TRIS : Tris(hydroxymethyl) aminomethane(Sigma사 Catalog
No. T-1503 또는 이와 동등한 것)

3.2.9 MES-TRIS 완충용액(0.05 M MES, 0.05M TRIS, 24°C에서 pH 8.2)
: MES 19.52 g과 TRIS 12.2 g을 물 1.7 L에 녹인 후 6 N
수산화나트륨용액을 가하여 pH 8.2로 조절한 후, 물을 가하여 2
L가 되게 조제한다(24°C에서 pH 8.2로 조절하는 것이 중요하다.
만약 버퍼용액의 온도가 20°C이면 pH 8.3으로 조절하고, 28°C이면
pH 8.1로 조절한다).

3.2.10 염산용액(0.561 N) : 1 L 정용 플라스크에 물 약 700 mL를 넣고
6 N HCl 93.5 mL을 혼합한 후 증류수로 표선까지 채워
조제한다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 시료 균질화

건조된 시료의 총 식이섬유를 확인하기 위해서 시료를 균질화한
후, 70°C 진공오븐에서 하룻밤 동안 건조시킨다. 시료를
데시케이터에서 방냉하고 0.3~0.5 mm mesh가 되도록 건식
분쇄한다. 열처리를 할 수 없는 시료의 경우 분쇄하기 전에 냉동
건조한다. 지방함량이 높다면(10% 이상) 분쇄하기 전에

석유에테르로 탈지한다(시료 1 g당 25 mL 씩 3번 처리). 지방제거로 인한 무게 손실을 기록하고 이에 대한 총 식이섬유 함량(%)을 보정한다. 분석 전까지 건조-분쇄된 시료는 마개가 있는 병에 담아 데시케이터에서 보관한다(만약 시료의 지방함량을 모른다면, 식이섬유를 측정하기 전에 탈지한다). 당 함량이 높은 제품은 식이섬유 측정 전에 85% 에탄올(10 mL/g)로 2~3회 추출한 다음 상등액을 제거하고 40°C에서 하룻밤 동안 건조한다.

4.1.2 효소분해

4개의 400 mL(또는 600 mL) tall-form 비커에 시료 1.000 ± 0.005 g을 정밀히 달아 2개의 검체(M1, M2)를 준비하고 2개의 공시험(B1, B2)을 준비한다. 이에 MES-TRIS 완충용액 40 mL씩 가하여 시료가 뭉치지 않고 완벽하게 분산될 때까지 자석 교반하여 혼합한다. 저속으로 혼합하면서, 내열성 α -아밀라아제 용액 50 μ L을 첨가한다. 비커를 알루미늄박으로 덮은 후 95~100°C 수욕에서 15분 동안 계속 교반하면서 반응한다. 수욕의 온도가 95°C에 도달할 때부터 시작한다(보통 총 35분이면 충분하다). 수욕에서 모든 비커를 꺼내어 60°C로 식힌다. 알루미늄박을 제거하고 비커의 벽 또는 바닥에 생긴 겔 형태의 내용물을 시약스폰으로 긁어내어 용액 속에 분산시킨다. 비커 벽과 시약스폰을 10 mL의 물로 씻어준다. 프로테아제 효소용액 100 μ L을 각 비커에 첨가한다. 알루미늄박으로 비커를 덮고 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 수욕에서 30분간 계속해서 교반하여 반응시킨다. 수욕의 온도가 60°C에 도달한 후 반응을 시작한다. 알루미늄박을 제거한 후 비커를 잘 교반하면서 0.561 N HCl 5 mL을 넣어준다. 60°C에서 1 N NaOH, 1 N HCl를 사용하여 용액을 pH 4.0~4.7로 조정한다(*참고 : pH는 낮은 온도에서 올라가기 때문에 60°C에서 pH를 조정하고 확인하는 것이 중요하다. 대부분의 곡류, 채소 시료의 경우, pH 조정이 없이도 pH조건을 만족할 수 있으므로 이전에 확인된 시료의 경우, pH 조정 과정을 생략할 수 있다. 단, 공시험의 pH를 예비단계로 확인하고 만약 공시험의 pH가 올바른 범위를 벗어난다면, 반드시 시료의 pH를 점검한다). 비커를 교반하면서 아미노글루코시다제 용액 300 μ L를 첨가하고 알루미늄박으로 덮은

후 $60\pm1^{\circ}\text{C}$ 수욕에서 교반하면서 30분간 항온한다. 수욕의 온도가 60°C 에 도달할 때 반응을 시작한다.

4.2 총 식이섬유(TDF) 함량 측정

4.2.1 실온 기준 225 mL 95% 에탄올을 60°C 에서 효소 분해된 각각의 시험용액에 가한다. 이때 에탄올과 시험용액의 부피 비율은 4 : 1이 되어야 한다. 수욕에서 비커를 꺼내어 알루미늄박으로 덮고 실온 에서 1시간 침전시킨다. ☆미리 규조토를 넣고 무게를 칭량한 유리여과기에 78% 에탄올 15 mL을 가하여 규조토를 분산시킨 후 흡인 여과하여 규조토층이 고르게 형성되도록 한다. 에탄올 처리된 효소 분해물을 준비된 유리여과기로 여과하고 78% 에탄올이 들어있는 세척병과 고무재질의 시약스폰을 이용하여 비커의 잔류물을 유리여과기로 옮긴다. 이때 효소분해물에 얹은 막이 생성될 경우, 시약스폰으로 생성된 막을 깨고 여과한다. 진공을 유지하면서 78% 에탄올, 95% 에탄올, 아세톤 순으로 각각 15 mL씩 2회 잔류물을 씻는다. ★ 105°C 에서 잔류물이 남아있는 유리여과기를 하룻밤 동안 건조시키고, 데시케이터에서 1시간 동안 방냉하여 항량한 후, 식이섬유 잔류물 및 규조토를 포함한 유리 여과기의 무게를 0.1 mg 단위까지 칭량한다. 미리 칭량하여 확인한 규조토를 포함한 유리여과기의 무게를 빼서 식이섬유의 무게를 계산한다. 같은 두개의 시료 중 하나는 1.1.3.1 총질소 및 조단 백질에 따라 단백질 함량을 측정한다. 이때 질소계수는 6.25를 사용한다. 다른 하나는 1.1.2. 회분에 따라 회분량을 확인한다. 이때 525°C 에서 5시간 이상 회화하고 0.1 mg 단위까지 칭량한다. 미리 칭량하여 확인한 규조토를 포함한 유리여과기의 무게를 빼서 회분의 무게를 결정한다.

4.3 물불용성 식이섬유(IDF) 측정

4.3.1 미리 규조토를 넣어 항량하여 준비한 유리여과기에 물 3 mL을 가하여 규조토를 적시고 분산시킨 후 흡인여과하여 규조토층을 고르게 한다. 이에 시험용액 조제에서 얻어진 효소분해물을 유리 여과기를 통해 여과용 플라스크로 여과한다. 비커를 세척하면서 잔류물을 70°C 물 10 mL로 2회 세척한다. 여액과 물 세척액을

합치고, 미리 무게를 칭량한 600 mL 비커로 옮겨 9) 수용성 식이섬유 측정에 사용한다. 잔류물은 곧바로 78% 에탄올, 95% 에탄올 그리고 아세톤의 순으로 각각 15 mL씩 2회 세척한다(주의: 잔류물의 세척을 즉시 하지 않을 경우, IDF 값이 높아질 수 있다).

7) 총식이섬유 함량 측정 과정의 ★ 이하에 따라 IDF의 무게를 계산한다.

4.4 수용성 식이섬유(SDF) 측정

4.4.1 물불용성 식이섬유 측정에서 600 mL 비커로 옮긴 여액과 물 세척액의 무게를 확인하여 부피를 확인하고 미리 60°C로 가열된 95% 에탄올을 측정된 부피의 4배량을 가한다. 이때 60°C 에탄올의 일부를 이용하여 여과용 플라스크에 남은 여액과 물 세척액을 세척한다. 여과액과 물 세척액에 에탄올을 4배량 가하기 위한 방법으로 물을 첨가하여 여과액과 물 세척액의 무게를 80 g으로 맞추고, 60°C의 95% 에탄올 320 mL을 가할 수도 있다. 그 후, 상온에서 1시간 침전시킨 후, 7) 총 식이섬유 함량 측정 중 ☆이하에 따라 SDF의 함량을 측정한다.

5. 계산

5.1 계산

※ 총 식이섬유 함량은 7) 총 식이섬유(TDF) 함량 측정을 독립적으로 수행하여 결정하거나 8) 물불용성 식이섬유(IDF) 측정 및 9) 수용성 식이섬유(SDF) 측정에서 구한 IDF와 SDF의 합으로 결정할 수 있다.

가) 공시험 함량 (B, mg) 측정 :

$$B = [(B1R + B2R) / 2] - P_B - A_B$$

B1R, B2R: 공시험 2반복에 대한 잔사의 무게(mg)

P_B : 공시험(B1)의 단백질 무게(mg)

A_B : 공시험(B2)의 회분 무게(mg)

나) 식이섬유 함량(DF, g/100g) 측정 :

$$DF = \frac{\frac{[M1R + M2R]}{2} - P - A - B}{\frac{(M1 + M2)}{2}} \times 100$$

M1R, M2R : 검체 2반복의 잔사 무게(mg)

P : 잔사(M1R) 중 단백질 무게(mg)

A : 잔사(M2R) 중 회분 무게(mg)

B : 공시험 함량(mg)

M1, M2: 검체의 무게(mg)

3-26-2 식이섬유(제2법)

1. 시험방법의 요약

난소화성 말토덱스트린(RMD) 등을 함유한 식품에 인산완충액을 이용한 효소-중량법을 적용하여 에탄올에 의해 침전되는 고분자의 난소화성 말토덱스트린과 같은 수용성 식이섬유(HMWSDF)를 확인하고 에탄올에 녹는 저분자의 난소화성 말토덱스트린과 같은 수용성 식이섬유(LMWSDF)를 탈염 하여 농축한 후, 액체크로마토그래피로 확인하는 방법이다. 이 방법에서 총 식이섬유는 물불용성 식이섬유(IDF) 및 HMWSDF와 액체크로마토그래피로 확인한 LMWSDF의 합으로 계산되어진다. 즉 효소-중량법으로 구한 식이섬유의 함량에 알코올에 녹는 수용성 식이섬유의 함량을 합하여 총 식이섬유의 함량으로 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 저울 : 0.1 mg 까지 측정이 유효한 것

2.1.2 비커 : 500 mL Tall-form

2.1.3 진탕 항온수조 : $98\pm 2^{\circ}\text{C}$ 까지 가온하여 온도 유지가 가능하고 60°C 로 일정하게 온도를 유지할 수 있는 것

2.1.4 유리여과기 : 기공 $40\sim 60\ \mu\text{m}$ (ASTM 기준)의 용융 유리디스크가 있는 Pyrex 60 mL(Corning No. 36060 Buchner 또는 이와 동등한 것). 525°C 에서 하룻밤 동안 회화하고 회화로 온도가 130°C 까지 떨어지면 유리여과기를 상온에서 방냉한 후, 2% 세척액에 1시간 동안 담근 후 물로 씻고 증류수로 행군 다음 아세톤 15 mL을 사용하여 마지막으로 세척하고 바람을 불어 건조시킨다. 건조된 유리여과기에 규조토 약 1.0 g을 넣고 130°C 에서 항량한 후, 데시케이터에서 1시간 동안 실온에 방냉하여 규조토를 포함한 유리여과기의 무게를 0.1 mg까지 칭량하여 기록한다.

2.1.5 유리 또는 플라스틱 칼럼관 : 이온교환수지를 채우기 위한 것으로 $40\sim 70\ \text{cm} \times 15\ \text{mm}$ 내경의 칼럼관

- 2.1.6 유리막대 : 20 cm 길이로 끝을 열처리한 것.
- 2.1.7 일회용 주사기 : 10 mL
- 2.1.8 파스퇴르 피펫, 10 mL 정용피펫
- 2.1.9 저울 : 4,000 g 용량
- 2.1.10 테프론 막대 : 비커의 침전물을 모을 수 있는 것
- 2.1.11 용량플라스크 : 10, 50, 250 및 1,000 mL
- 2.1.12 감압농축기

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 시차굴절계(Refractive Index Detector)
- 2.2.3 칼럼오븐

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 액체크로마토그래피 머무름 시간 확인용 표준물질: 저분자의 난소화성 말토덱스트린에 해당하는 올리고당[DP(Degree of polymerization) ≥ 3]을 포함한 DE(Dextrose equivalent) 25 또는 16.5~19.5의 말토덱스트린(Sigma사 419699 또는 이와 동등한 것)

3.1.2 Glycerol

분자식 : $C_3H_8O_3$, 분자량 : 92.09, CAS No. : 56-81-5

3.2 일반시약

- 3.2.1 증류수 : 3차 증류수
- 3.2.2 에탄올 : 95% Technical grade
- 3.2.3 에탄올 수용액(78%)
1 L 정용 플라스크에 95% 에탄올 821 mL을 넣고 물을 표선까지 채워 조제한다.
- 3.2.4 인산수소나트륨(Na_2HPO_4) 및 인산이수소나트륨(NaH_2PO_4)
- 3.2.5 내열성 α -아밀라아제 용액 : Termamyl 120 또는 이와 동등한 것, 글리세롤이 없을 것, 0~5°C에서 보관하며 사용한다(Sigma사 Catalog No. A 3403 또는 이와 동등한 것).
- 3.2.6 프로테아제 효소용액 : 1.1.4.3. 가. 4)시약 및 시액 라)의 효소 분해능을 만족하는 것으로서 0~5°C에서 보관하고 인산

완충용액으로 희석하여 10 mg/mL로 사용 시 조제한다(Sigma사 Catalog No. P 3910 또는 이와 동등한 것).

3.2.7 아밀로글루코시다제 용액 : 0~5°C에서 보관하며 사용한다. 글리세롤이 없을 것(Sigma사 Catalog No. A 9913 또는 이와 동등한 것)

3.2.8 규조토(Diatomaceous earth): 산세척한 것(Sigma사 Catalog No. C 8656 또는 Fisher Scientific사 Catalog No. C-211, acid washed 또는 이와 동등한 것)

3.2.9 각 시료의 탈염을 위한 이온교환수지

(1) m-1 : 25 g Amberlite IRA-67 (OH-type) 또는 이와 동등한 것

(2) m-2 : 25 g Amberlite 200 CT(HG)H(H-type) 또는 이와 동등한 것

3.2.10 황산암모늄

3.2.11 텍스트로즈 : 액체크로마토그래피용, 순도 99.5% 이상

3.3 시액의 조제

3.3.1 인산 완충용액(0.08M, pH 6.0)

무수 인산수소나트륨 1.4 g(또는 2수화물 1.753 g)과 9.68 g 인산이수소나트륨·1수화물(또는 2수화물 10.94 g)을 700 mL 증류수에 녹인 후 증류수를 가하여 1 L로 조제한다. 이때 pH를 확인한다.

3.3.2 각 시료의 탈염을 위한 이온교환수지

(1) m-1 : 25 g Amberlite IRA-67(OH-type) 또는 이와 동등한 것

(2) m-2 : 25 g Amberlite 200 CT(HG)H(H-type) 또는 이와 동등한 것
각 시험 용액의 분석을 위해서 유리칼럼에 상기 2종의 수지를 잘 혼합하여 충전 한다.

- 총 이온교환능 : 1.74 meq/mL

- 유효 이온교환능(R-H 교환능) : 1.6 meq/mL(min.)

상기 2종의 수지를 혼합하여 충전하기 전 각 수지를 증류수로 세척 하고 세척액의 pH가 m-1은 7~8.8, m-2는 4~7의 값이 되도록 한다.

※ Amberlite 200 CT(HG)H가 없을 경우, Amberlite 200 (Na-type) 또는 Amberlite 200CT를 'H-type'으로 전환하여 사용한다. 이를 위해 Amberlite 200(Na-type) 600 mL (500 g)을 유리 또는

플라스틱 칼럼관(100 cm × 40 mm id)에 채우고 2배 부피의 증류수를 이용하여 60 mL/min의 속도로 세척하고 2배 부피의 10% 염산용액(1→3 w/w)을 재차 60 mL/min의 속도로 흘려준 후 수지의 3배 부피에 해당하는 증류수를 이용하여 60 mL/min의 속도로 세척하여 염산을 제거한다. 3~6배의 부피에 해당하는 증류수를 120 mL/min의 속도로 재차 세척하고 세척액의 pH가 4~7인지 확인하여 염산용액의 세척이 제대로 이루어졌는지 확인하여 사용한다.

3.3.3 수산화나트륨 수용액(0.274 N)

NaOH 11 g을 증류수 약 700 mL에 녹인 후 증류수를 가하여 1 L로 조제한다.

3.3.4 염산용액(0.325 N)

1 L 정용 플라스크에 1 N HCl 325 mL을 넣고 증류수를 가하여 1 L로 조제한다.

3.3.5 글리세롤 표준용액(10 mg/mL)

비커에 글리세롤(순도 99.5% 이상) 10 g을 달아 1L 정용플라스크로 물로 씻어 옮겨 표선까지 채워 조제한다.

3.3.6 덱스트로즈-글리세롤 반응계수 확인용 표준용액(100 mg/mL)

비커에 글리세롤(순도 99.5% 이상) 10 g을 달아 100 mL 정용플라스크에 물로 씻어 옮겨 표선까지 채워 조제한다.

4. 시험과정

4.1 시료 균질화

4.1.1 제 10, 1, 1.1, 1.1.4, 1.1.4.3. 식이섬유 가. 효소-중량법 6) 시험용액 조제 가)와 같이 준비한다. 당 함량이 높은 시료의 경우, LMWSDF의 손실을 고려하여 85% 에탄올 세척과정은 생략한다.

4.2 효소분해

4.2.1 4개의 500 mL tall-form 비커에 시료 1.000 ± 0.005 g을 정밀히 달아 2개의 검체(M1, M2)를 준비하고 2개의 공시험(B1, B2)을 준비한다. 이에 인산 완충용액 50 mL씩 가하고 초음파를 이용하여 시료가 멍치지 않고 완벽하게 분산시킨다. 내열성 α -아밀라아제 용액 100 μ L을 첨가한다. 비커를 알루미늄박으로 덮은 후 95°C

수욕에서 30분 동안 계속 진탕하면서 반응시킨다. 수욕의 온도가 95°C에 도달할 때부터 시작한다(보통 총 35분이면 충분하다). 수욕에서 모든 비커를 꺼내어 실온으로 식힌다. 알루미늄박을 제거하고 비커에 벽 또는 바닥에 생긴 겔 형태의 내용물을 시약스폰으로 긁어내어 용액 속에 분산시킨다. 비커 벽과 시약스폰을 10 mL의 물로 씻어준다. 0.275 N 수산화나트륨용액으로 pH를 7.5 ± 0.1 로 조정 한 후, 프로테아제 효소용액 0.5 mL를 각 비커에 첨가한다. 알루미늄박으로 비커를 덮고 60°C 수욕에서 30분간 계속해서 교반하여 반응시킨다. 수욕의 온도가 60°C에 도달한 후 반응을 시작한다. 실온으로 용액을 식힌 후, 알루미늄박을 제거한 후 비커를 잘 교반해주면서 0.325 N HCl로 용액의 pH를 4.5 ± 0.2 로 조정한다. 비커를 교반해주면서 아미노글루코시다제 용액 0.3 mL를 첨가하고 알루미늄박으로 덮은 후 60°C 수욕에서 지속적으로 흔들면서 30분간 항온한다. 수욕의 온도가 60°C에 도달할 때 반응을 시작한다.

4.3 물불용성 식이섬유(IDF) 및 HMWSDF의 함량 측정

4.3.1 60°C로 가열한 95% 에탄올을 60°C 수욕 상의 효소 분해된 각각의 시험용액에 가한다. 이때 에탄올과 시험용액의 부피의 비율은 4 : 1이 되어야 한다. 수욕에서 비커를 꺼내어 알루미늄박으로 덮고 실온에서 하룻밤 침전시킨다. 미리 규조토를 넣고 무게를 칭량한 유리여과기에 있는 78% 에탄올 15 mL을 가하여 규조토를 분산시킨 후 흡인 여과하여 규조토층이 고르게 형성되도록 한다. 에탄올 처리된 효소 분해물을 준비된 유리여과기로 여과하고 78% 에탄올이 들어있는 세척병과 고무재질의 시약 스폰을 이용하여 비커의 잔류물을 유리여과기로 옮긴다. 이때 효소분해물에 얹은 막이 생성될 경우, 시약스폰으로 생성된 막을 깨고 여과한다. 진공을 유지하면서 20 mL 78% 에탄올 3회, 10 mL 95% 에탄올로 2회, 10 mL 아세톤으로 2회씩 잔류물을 씻어낸다. 105°C에서 잔류물이 남아있는 유리여과기를 하룻밤 건조시키고, 유리여과기를 데시케이터에서 1시간 동안 항량한 후, 식이섬유 잔류물 및 규조토를 포함한 유리여과기의 무게를 0.1 mg 단위까지

칭량한다. 미리 칭량하여 확인한 구조토를 포함한 유리여과기의 무게를 빼서 식이섬유의 무게를 계산한다. 같은 두개의 시료 중 하나는 1.1.3.1 총질소 및 조단백질에 따라 단백질 함량을 측정한다. 이때 질소계수는 6.25를 사용한다. 다른 하나는 1.1.2. 회분에 따라 회분량을 확인한다. 이때 525°C에서 5시간 이상 회화하고 0.1 mg 단위까지 칭량한다. 미리 칭량하여 확인한 구조토를 포함한 유리여과기의 무게를 빼서 회분의 무게를 결정한다.

4.4 여액 회수 및 탈염

4.4.1 4.3의 여액을 감압농축기로 농축하여 완전 건조하고 잔류물을 소량의 물로 녹인 후, 이를 50 mL 정용플라스크에 정량적으로 옮긴다. 이에 글리세롤 표준용액 10 mL을 넣고 증류수로 표선까지 채워 50 mL로 조제한다. 이를 Amberlite IRA-67(m-1) 및 Amberlite 200CT (HG)H(m-2) 각 25 g을 완전히 혼합하여 채운 유리칼럼(75 cm × 15 mm id)에 통과시키고 이후, 250 mL 증류수로 칼럼을 통해 세척하며 추출한다. 이때 유속은 0.8 mL/min으로 조정한다. 이온교환 칼럼을 통과한 초기 용출액부터 250 mL를 모아 정량적으로 500 mL 둥근 플라스크에 옮기고 완전 건조될 때 까지 감압농축한다. 이를 10 mL 정용플라스크로 증류수를 이용하여 정량적으로 옮겨 10 mL로 조제한 후 10 mL 일회용 주사기에 옮겨 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과하여 액체크로마토그래피용 시험용액 으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 시험조작

5.1.1 액체크로마토그래프의 측정조건

- 분석칼럼 : TSK-GEL G2500PWX L, 7.8 mm id × 30 cm를 연속하여 2개를 연결한 것 또는 이와 동등한 것
- 가드 칼럼 : TSK guard column PWXL, 6.0 mm id × 4 cm 또는 이와 동등한 것
- 칼럼온도 : 80°C
- 이동상 : 증류수

- 유속 : 0.5 mL/min
- 주입량 : 20 μ L
- 검출기 : 시차굴절계검출기(RI), 40°C 유지

5.1.2 RMD와 액체크로마토그래피 반응이 동등한 덱스트로스로 반응계수 결정 RMD의 RI 검출기의 반응에 대한 평가와 표준화를 위해 글리세롤 표준물질을 사용한다. LC 분석에서 RI 검출기에서 얻은 RMD의 피크면적은 덱스트로스와 동등하며 내부표준물질인 글리세롤의 피크면적과 덱스트로스의 농도에 따른 피크면적을 비교한다. 이렇게 작성된 검량곡선으로부터 시험용액 중 RMD의 함량을 계산하는데 사용할 반응계수를 결정한다.

동량의 글리세롤과 3개 농도 수준으로 덱스트로스를 100 mL 정용플라스크에 각각 넣은 3개의 용액을 준비한다. 이를 위해 0.5, 1.0, 2.0 g의 덱스트로스를 3개의 구분된 100 mL 정용플라스크에 정확히 칭량하여 넣고 덱스트로스-글리세롤 반응계수 확인용 표준 용액 10 mL을 각 정용 플라스크에 첨가한 후 증류수를 채워 100 mL로 조제한다. 조제된 3개의 표준용액 20 μ L를 액체크로마토그래피에 주입하여 각 크로마토그래피에서 덱스트로스와 글리세롤의 피크면적을 확인하여 글리세롤의 피크면적에 대한 덱스트로스 피크면적 비(y-축)와 글리세롤 함량에 대한 덱스트로스 함량 비(x-축)를 비교하여 얻어진 기울기의 역수로부터 아래의 식과 같이 반응계수를 구한다.

$$\text{반응계수(Rf)} = 1/[(\text{PA-dex}/\text{PA-gly}) \times (\text{Wt-gly}/\text{Wt-dex})]$$

PA-dex : 덱스트로스 피크면적

PA-gly : 글리세롤 피크면적

Wt-dex : 표준용액 중 덱스트로스 함량

Wt-gly : 표준용액 중 글리세롤 함량

5.1.3 액체크로마토그래피의 크로마토그램

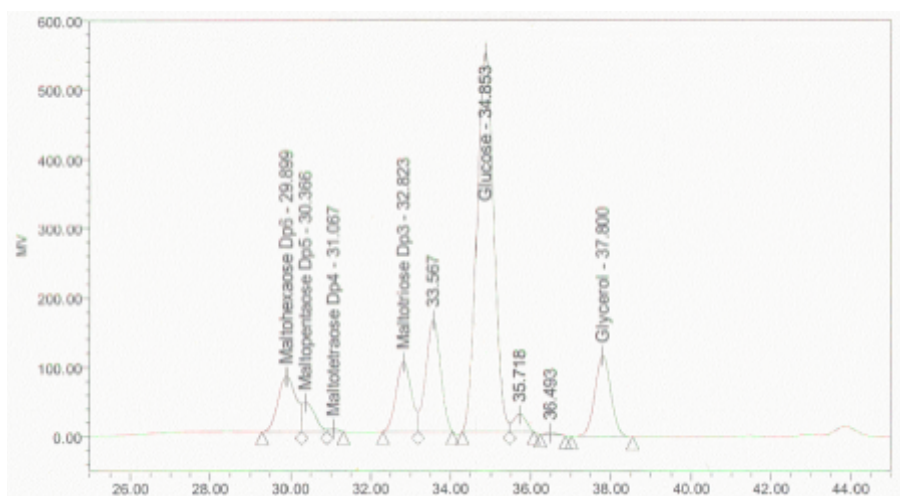
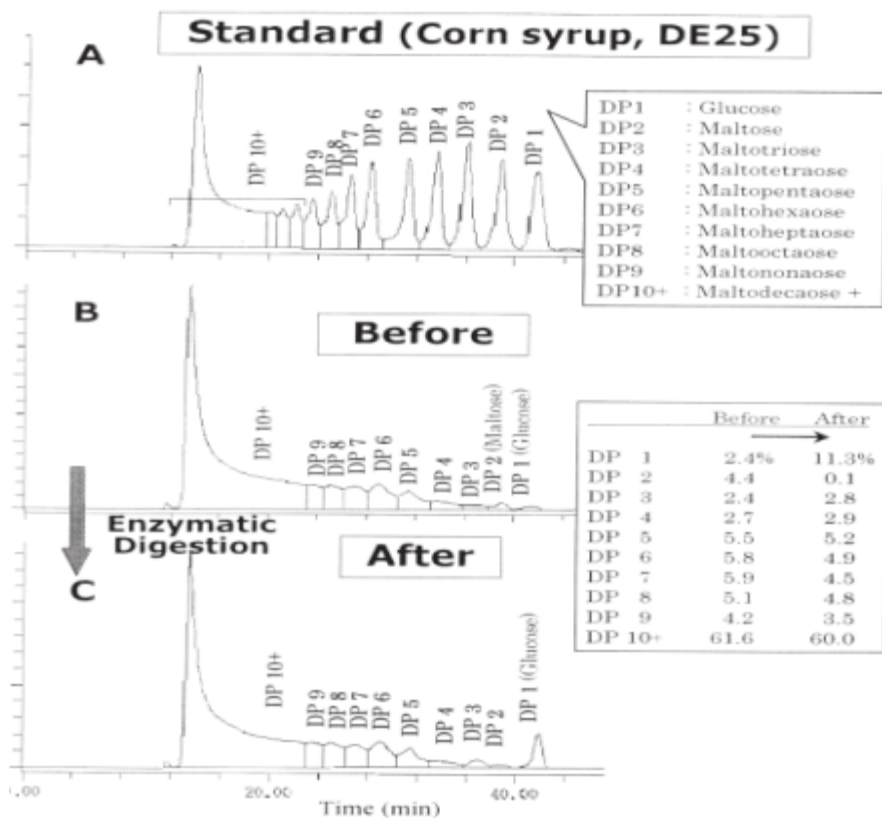


그림 1. 표준용액 및 시험용액의 크로마토그램

5.2 식이섬유 함량 계산

※ 총 식이섬유 함량(TDF)은 %(IDF+HMWSDF)와 LMWSDF의 평균 함량(%ALMWSDF)을 합하여 계산한다.

5.2.1 (IDF + HMWSDF)의 함량 계산

(1) 공시험 함량(B, mg) 측정:

$$B = [(B1R + B2R) / 2] - P_B - A_B$$

B1R, B2R: 공시험 2반복에 대한 잔사의 무게(mg)

P_B : 공시험(B1)의 단백질 무게(mg)

A_B : 공시험(B2)의 회분 무게(mg)

5.2.2 (IDF + HMWSDF) 평균 함량(g/100g) 측정:

$$\%(IDF + HMWSDF) = \frac{\frac{[M1R + M2R]}{2} - P - A - B}{\frac{(M1 + M2)}{2}} \times 100$$

M1R, M2R: 검체 2반복의 잔사 무게(mg)

P : 잔사(M1R) 중 단백질 무게(mg)

A : 잔사(M2R) 중 회분 무게(mg)

B : 공시험 함량(mg)

M1, M2 : 검체의 무게(mg)

5.2.3 LMWSDF의 평균 함량

5.2.3.1 LMWSDF(mg) 측정:

$$LMWSDF = \frac{PAS_LMWSDF \times WtS_gly \times Rf}{PAS_gly}$$

PAS_LMWSDF : 시험용액 중 LMWSDF(DP≥3)의 피크면적

PAS_gly : 시험용액 중 글리세롤의 피크면적

WtS_gly : 시험용액에 첨가한 글리세롤의 무게(mg)

Rf : 덱스트로즈-글리세롤 반응계수

5.2.3.2 각 시료의 LMWSDF의 함량(g/100g) 측정

$$\%LMWSDF = \frac{LMWSDF \times 100}{SW}$$

SW : 시료의 무게(mg)

5.2.3.3 LMWSDF의 평균 함량(g/100g)

$$\% \text{ALMWSDF} = \frac{\% \text{LMWSDF} + \% \text{LMWSDF}'}{2}$$

%LMWSDF, %LMWSDF' : 각 시료의 LMWSDF의 함량 (g/100 g)

3-27 총 다당체

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 다당체를 시료로부터 추출하여 페놀과 황산으로 발색시켜 분광광도계를 이용하여 정량하는 분석법이다. 이때, 만노오스를 표준물질로 하며 다당체, 페놀 및 황산의 상호작용으로 만들어진 화합물이 갖는 최대 흡수파장인 490 nm에서 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL, 50 mL, 100 mL)

2.1.2 원심분리기

2.1.3 원심분리 튜브

2.1.4 투석용 튜브(분자량 3,500Da)

2.1.5 시험관

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

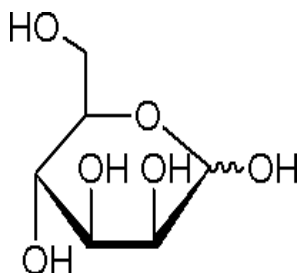
분광광도계는 측정 전에 켜서 충분히 안정화시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 만노오스(D-(+)-mannose, D-Mannopyranose)

분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 3458-28-4



3.2 일반시약

3.2.1 황산(Sulfuric acid)

3.3 시액의 조제

3.3.1 5% 페놀용액(Phenol)

페놀 5 g을 취하여 물을 가하여 100 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 만노오스 50 mg을 50 mL 부피플라스크에 넣는다(1 mg/mL).

4.1.2 표준원액을 증류수로 희석하여 농도별 표준용액을 만든다.

4.2 시료의 전처리

4.2.1 알로에겔 분말

4.2.1.1 시료가 0.1~0.5% 수용액이 되도록 시료를 취하여 2시간 이상 교반하여 충분히 용해시킨다.

4.2.1.2 위의 용액을 원심분리(8000 rpm, 30분)하여 상등액을 취하거나 감압필터(20~25 μ m)하여 불용성 물질을 제거한다.

4.2.1.3 용해액을 투석용 튜브에 옮긴다.

4.2.2 알로에겔 액상제품

4.2.2.1 시료(알로에겔분말로서) 약 100 mg이 되도록 취하여 증류수로 100 mL가 되도록 취한 후 2시간 이상 교반하여 충분히 용해시킨다.

4.2.2.2 위의 용액을 원심분리(8000 rpm, 30분)하여 상등액을 취하거나 감압필터(20~25 μ m)하여 불용성 물질을 제거한다.

4.2.3 알로에겔 정제

4.2.3.1 시료(알로에겔분말로서) 약 100 mg이 되도록 취하여 증류수로 100 mL가 되도록 취한 후 2시간 이상 교반하여 충분히 용해시킨다.

4.2.3.2 위의 용액을 원심분리(8000 rpm, 30분)하여 상등액을 취하거나 감압필터(20~25 μ m)하여 불용성 물질을 제거한다.

4.2.4 알로에겔 캡슐

4.2.4.1 시료가 7~8% 용액이 되도록 헥산에 용해시켜 지용성 성분을 용해시킨다.

4.2.4.2 사용된 헥산과 동일한 양의 증류수를 넣어 지용성 성분을 제거한다. 동량의 헥산을 2회 더 사용하여 지용성 성분을 충분히 제거한다.

4.2.4.3 위의 용액을 원심분리(8000 rpm, 30분)하여 상등액을 취하거나 감압필터(20~25 μ m)하여 불용성 물질을 제거한다.

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 전처리한 시료를 투석용 튜브에 넣고 튜브의 끝을 밀봉한다.

4.3.2 튜브를 증류수에 담고 24시간동안 투석 후 투석된 시료전체의 부피를 측정한다. 투석 시 증류수를 수시로 교환해 준다.

4.3.3 위의 용액의 일부를 총다당체 함량 측정을 위한 시험용액으로 한다.

4.4 시험조작

4.4.1 표준용액 및 시험용액 200 μ L를 각각 시험관에 넣는다.

4.4.2 5% 페놀용액 1 mL씩 넣어 혼합한다.

4.4.3 혼합액[4.4.2]에 진한 황산 5 mL을 넣어 20분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정한다.

4.4.4 이때 대조액은 시험용액 대신 증류수를 사용하여 동일한 조작을 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 흡광도 측정

5.1.1 파장 490 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

5.2.1 총다당체 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 검량선으로부터 얻은 시료의 농도(μ g/mL)

a : 투석된 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-28 콘드로이친황산

3-28-1 콘드로이친황산(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 hexuronic acid와 카바졸을 붉은색 화합물로 만들어 분광광도계로 분석하는 방법으로, 최대 흡수파장인 530 nm에서 발색정도를 측정하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 여과용 멤브레인 필터

2.1.2 비색관

2.1.3 부피플라스크(20 mL 및 100 mL)

2.1.4 항온수조

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

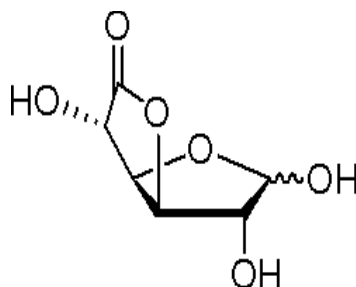
분광광도계는 측정 전에 켜서 충분히 안정화시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 δ-글루쿠로노락톤(D-+)-Glucurono-6,3-lactone, Glucuronolactone)

분자식 : $C_6H_8O_6$, 분자량 : 176.12, CAS No. : 32449-92-6



3.2 시액의 조제

3.2.1 카바졸시액

카바졸(Carbazol, $C_{12}H_9N$, 1급) 0.125 g에 무수에탄올 100 mL를 가해 용해한다(냉암소보관).

3.2.2 붕산나트륨황산시액

붕산나트륨(Sodium borate) 1 g에 정밀분석용 황산을 가해 200 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 δ -글루쿠로노락톤 0.04 g을 정밀히 취한다.

4.1.2 위의 시료를 100 mL 부피플라스크에 넣고 증류수를 표선까지 채운다.

4.1.3 이 액 1 mL를 정확히 취하여 20 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.4 증류수를 표선까지 채운다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 10 g을 수분이 흡수되지 않도록 빨리 분쇄 혼합한다.

4.2.2 그 중 0.1 g을 정밀히 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.3 증류수를 표선까지 채운다.

4.2.4 이 액 4 mL를 정확히 취하여 20 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.5 증류수를 표선까지 채우고, 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한다.

4.2.6 두개의 비색관에 붕산나트륨 5 mL씩 정밀히 달아 취한다.

4.2.7 위의 비색관을 얼음물로 충분히 냉각시킨다.

4.2.8 검액과 표준용액을 1 mL씩 취하여 시액[4.2.7] 위에 주의하여 가한다.

4.2.9 주의하여 냉각하면서 혼합시킨다.

4.2.10 각각에 카바졸시액 0.2 mL를 정확히 가하여 혼합한다.

4.2.11 수욕상에서 15분간 가열하고 얼음물로 실온까지 냉각한다.

4.2.12 증류수 1 mL를 사용하여 동일하게 조작한 것을 대조액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 흡광도 측정

5.1.1 파장 530 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

5.2.1 콘드로이친황산 함량 = 글루쿠론산 × 2.593

5.2.2 글루쿠론산(mg/g)

= 검액의 흡광도/표준물질의 흡광도 × 표준물질(mg)/시료
채취량(g) × 1/4 × 1.1023

2.593 : 콘드로이친황산 분자량 / 글루쿠론산 분자량

1.1023 : 글루쿠론산 분자량 / δ-글루쿠로노락톤의 분자량

3-28-3 콘드로이친황산(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 추출한 콘드로이친황산을 콘드로이티나아제 ABC를 이용하여 특이적으로 분해시켜 얻은 3가지 이당류(Di-0S, Di-6S 와 Di-4S)를 액체크로마토그래프를 사용하여 분석하는 방법이다. 음이온을 가진 이들 분해 산물을 음이온교환수지 칼럼을 이용하여 232 nm에서 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 환류냉각기
- 2.1.2 용매용 일회용 실린지
- 2.1.3 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.4 부피플라스크(1 L)
- 2.1.5 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 음이온교환수지칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 : 강염기성 암모늄 음이온교환수지로 코팅된 실리카겔), Hypercil-SAX 칼럼 또는 이와 동등한 것

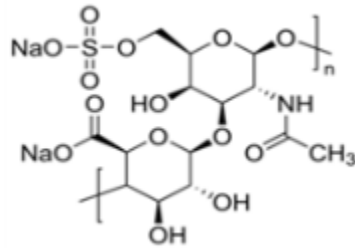
2.3 분석장비의 준비

이동상인 증류수(pH 3.5)를 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 콘드로이친황산 나트륨염(Chondroitin sulfate sodium salt)
분자식 : $(C_{14}H_{19}NNa_2O_{14}S)_n$, CAS No. : 9082-07-9



3.2 일반시약

3.2.1 콘드로이티나아제 ABC(Chondroitinase ABC)

3.2.2 트리스염(Tris base)

3.2.3 아세트산나트륨(Sodium acetate)

3.2.4 염화나트륨(Sodium chloride)

3.3 시액의 조제

3.3.1 50 mM Tris 완충용액

트리스염 6.06 g과 아세트산나트륨 4.92 g을 각각 취하여 900 mL 증류수에 녹인 후 pH 8.0으로 조절한 후 1 L로 한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 콘드로이친황산 나트륨염을 0.5~1 mg/mL가 되도록 증류수로 희석한다.

4.1.2 위의 용액 50 μ L에 0.001unit/ μ L 콘드로이티나아제 ABC 50 μ L와 50 mM Tris-buffer(pH 8.0) 400 μ L를 넣는다.

4.1.3 위의 용액을 37°C에서 30분간 반응 시킨다.

4.1.4 위의 용액을 100°C에서 5분간 가열한다.

4.1.5 0.2 μ m로 멤브레인 필터하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 0.1 g을 정밀히 취한다.

4.2.2 증류수 50 mL을 가하여 실온에서 10분동안 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 0.45 μ m로 여과한다.

4.2.4 위의 용액 50 μ L를 취한 후, 표준용액의 [4.1.2]이하의 과정을 동일하게 행한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼 온도	30℃
이동상	A : 증류수(pH 3.5), B : 1 M 염화나트륨용액(pH 3.5)
검출기 파장	232 nm
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A (%)	B(%)
0	100	0
5	100	0
15	50	50
20	50	50
21	100	0

5.2 계산

5.2.1 콘드로이친황산 나트륨 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중 콘드로이친황산 나트륨 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-29 키토산(총글루코사민으로서)

3-29-1 키토산(총글루코사민으로서)(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 키토산에 산을 첨가하여 단당류인 글루코사민으로 분해한 후 글루코사민과 p-디메틸아미노벤즈알데히드(p-dimethylaminobenzaldehyde)를 반응시켜 분광광도계를 이용하여 분석하는 방법으로, 530 nm에서 발색 정도를 측정하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 시험관

2.1.2 감압농축기

2.1.3 부피플라스크(100 mL)

2.1.4 가열기(heating block)

2.2 분석장비

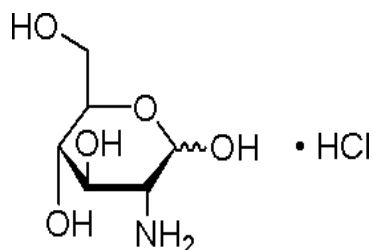
2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-글루코사민 염산염(D-glucosamine hydrochloride)

분자식 : $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, 분자량 : 215.63, CAS No. : 66-84-2



3.2 일반시약

3.2.1 염산(Hydrochloric acid)

3.2.2 에탄올(Ethanol)

3.2.3 아세틸아세톤(Acetyl acetone)

3.2.4 p-디메틸아미노벤즈알데히드(p-dimethylaminobenzaldehyde)

3.2.5 아세트산(Acetic acid)

3.3 시액의 조제

3.3.1 아세틸아세톤 시액

증류 정제한 무색 아세틸아세톤 1.5 mL에 1.2 N 탄산나트륨용액을 가하여 50 mL로 한다.

3.3.2 p-디메틸아미노벤즈알데히드 시액

p-디메틸아미노벤즈알데히드 1.6 g에 염산 30 mL를 가하여 녹이고, 96%(v/v) 에탄올 30 mL를 가하여 혼합한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 D-글루코사민염산염 50 mg을 정밀히 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 증류수를 표선까지 채운 다음 10 mL를 취한다(500 µg/mL).

4.1.3 이액에 염산 7 mL 및 증류수를 가하여 20 mL로 한다.

4.1.4 이액 5 mL를 시험관에 취한다.

4.1.5 탈기 밀봉하여 105°C, 24시간 분해한다(121°C 5시간, 130°C 3시간 또는 140°C 90분으로 조절 가능).

4.1.6 뚜껑을 열어 감압 농축기를 이용하여 염산 및 증류수를 제거한다.

4.1.7 잔류물에 증류수 5 mL를 가하여 녹인다. 단, 불용물이 있으면 여과한다.

4.1.8 여액 1 mL를 마개 있는 시험관에 취하고 아세틸아세톤 시액 2 mL를 가하여 혼합한다.

4.1.9 96°C에서 1시간 가열한 후 흐르는 물에서 냉각시킨다.

4.1.10 이 액에 96%(v/v) 에탄올 20 mL를 가하고 p-디메틸아미노벤즈알데히드 시액 2 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 방치한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 40 mg(키토산으로서)을 정밀히 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다. 필요한 경우 탈지하고 아세트산 1 mL를 첨가하여 시료를 모두 녹인 후 증류수를 가하여 100 mL로 하여 검액으로 한다. 단 원료를 이용하여 시험용액 조제 시 최대한 시료를 잘게 갈아서 사용 한다.

4.2.2 이 중 10 mL를 취하여 표준용액의 조제 [4.1.3]이하의 과정을 수행한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

파장 530 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 총글루코사민(mg/g)} = C \times \frac{A_S}{A_t} \times \frac{a}{S}$$

C : 표준용액의 농도(글루코사민으로서, $\mu\text{g/mL}$)

A_S : 시료의 흡광도

A_t : 표준용액의 흡광도

a : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(mg)

3-29-2 키토산(총글루코사민으로서)(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 키토산에 산을 첨가하여 단당류인 글루코사민으로 분해한 후 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법으로 시차굴절계 검출기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 시험관
- 2.1.2 감압농축기
- 2.1.3 가열기(heating block)
- 2.1.4 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.5 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.6 용매용 일회용 실린지

2.2 분석장비

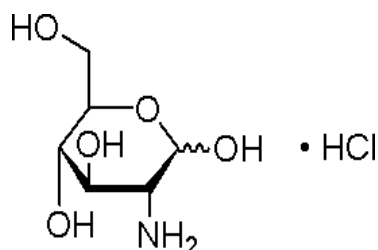
- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 시차굴절계 검출기
- 2.2.3 NH₂-60칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm)
또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 D-글루코사민 염산염(D-glucosamine hydrochloride)

분자식 : C₆H₁₃NO₅ · HCl, 분자량 : 215.63, CAS No. : 66-84-2



3.2 일반시약

3.2.1 염산(Hydrochloric acid)

3.2.2 아세트산(Acetic acid)

3.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 D-글루코사민염산염 50 mg을 시험관에 정밀히 취한다.

4.1.2 1%(v/v) 아세트산 2.5 mL, 염산 1.75 mL 및 증류수를 가하여 5 mL로 한다.

4.1.3 밀봉하여 130°C, 3시간 분해한다.

4.1.4 감압 농축기를 이용하여 염산 및 증류수를 제거한다.

4.1.5 잔류물에 50%(v/v) 아세토니트릴 5 mL를 가하여 녹인다.

4.1.6 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 40 mg(키토산으로서)을 시험관에 정밀히 취하여 표준용액의 조제 [4.1.2]이하의 과정을 수행한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 µL
칼럼 온도	40°C
이동상	증류수 : 아세토니트릴 (30 : 70)
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 총글루코사민 함량(mg/g)} = C \times \frac{a}{S} \times b$$

C : 시험용액 중의 글루코사민의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(mg)

3-30 키토올리고당

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 3-29 분광광도계를 이용한 총글루코사민 정량법에 의해 총글루코사민 함량을 구한 후, 3-23에 따라 유리 D-글루코사민의 함량을 구하여 그 차로서 키토올리고당 함량을 정량한다.

2. 분석 및 계산

2.1 계산

2.1.1 키토올리고당 = 총글루코사민 함량 - 유리 D-글루코사민 함량

3-31 프락토올리고당

3-31-1 프락토올리고당(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 증류수를 이용하여 시료로부터 프락토올리고당을 추출하고 아민칼럼을 사용하여 프락토올리고당을 분리하는 방법으로 시차굴절계 검출기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL, 20 mL 및 10 mL)

2.1.2 여과지(No.5B)

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 시차굴절계검출기(Refractive Index Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 아민칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 1-케스토즈(1-kestose, GF₂)

분자식 : C₁₈H₃₂O₁₆, 분자량 : 504.44, CAS No. : 470-69-9

3.1.2 니스토즈(nystose, GF₃)

분자량 : C₂₄H₄₂O₂₁, 분자식 : 666.58, CAS No. : 13133-07-8

3.1.3 F-프락토피루라노실니스토즈(1F-fructofuranosylnystose, GF₄)

분자량 : C₃₀H₅₂O₂₆, 분자식 : 828.73, CAS No. : 59432-60-9

3.1.4 내부표준물질(아라비노즈)

분자량 : C₅H₁₀O₅, 분자식 : 150.13, CAS No. : 5328-37-0

3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.3 시액의 조제

3.3.1 내부표준용액

아라비노스를 5 g 달아 100 mL 용량플라스크에 넣고 에탄올 50 mL를 넣어 용해시킨 후, 증류수를 표선까지 채운다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 1-케스토즈, 니스토즈, 1-F 프락토피라노실니스토즈를 0.4 g씩 달아 각각 20 mL의 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 10 mL의 증류수를 넣고 완전히 용해시킨 후, 증류수를 넣어 표선까지 채운다.

4.1.3 표준원액을 1, 2, 3, 4 및 5 mL를 정확히 취하여 각각 10 mL 부피플라스크에 옮겨 넣는다.

4.1.4 이에 내부표준용액 1 mL를 넣은 뒤 증류수를 표선까지 채운다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 프락토올리고당으로서 0.2~2 g이 함유되도록 시료를 정확히 달아 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 증류수 20 mL를 가하여 용해 또는 추출한다(산성인 채로 실험을 진행할 경우 가수분해의 우려가 있으므로 필요하면 중화하고, 가열하며 혼합 또는 초음파 처리한다).

4.2.3 완전히 용해된 후 내부표준용액 20 mL를 넣고, 표선까지 증류수를 채운다.

4.2.4 여과지 No.5B 또는 10,000 Da cut off 원심분리필터를 이용하여 여과한다.

4.2.5 여과액과 동량의 에탄올을 첨가하여 희석한다. 단, 침전 또는 탁한 것이 생겼을 경우 여과하고 여과액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
칼럼 온도	40°C
이동상	70% 아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 개별 프락토올리고당(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중 개별 프락토올리고당의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

5.2.2 프락토올리고당 함량(mg/g)

프락토올리고당 함량(mg/g) = GF2(mg/g) + GF3(mg/g) + GF4(mg/g)

3-31-2 프락토올리고당(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 프락토올리고당을 추출한 후 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법으로 증기화광산란검출기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용량플라스크(100 mL, 20 mL 및 10 mL)

2.1.2 여과지(No.5B)

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 증기화광산란검출기(Evaporative Light Scattering Detectors, ELSD)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 아민칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 1-케스토즈(1-kestose, GF₂)

분자식 : C₁₈H₃₂O₁₆, 분자량 : 504.44, CAS No. : 470-69-9

3.1.2 니스토즈(nystose, GF₃)

분자량 : C₂₄H₄₂O₂₁, 분자식 : 666.58, CAS No. : 13133-07-8

3.1.3 1F-프락토포라노실니스토즈(1F-fructofuranosylnystose, GF₄)

분자량 : C₃₀H₅₂O₂₆, 분자식 : 828.73, CAS No. : 59432-60-9

3.1.4 내부표준물질(아라비노즈)

분자량 : C₅H₁₀O₅, 분자식 : 150.13, CAS No. : 5328-37-0

3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.3 시액의 조제

3.3.1 내부표준용액

아라비노스를 5 g 달아 100 mL 용량플라스크에 넣고 에탄올 50 mL를 넣어 용해시킨 후, 증류수를 표선까지 채운다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 1-케스토즈, 니스토즈, 1-F 프락토피라노실니스토즈를 0.4 g씩 달아 각각 20 mL의 용량플라스크에 넣는다.

4.1.2 10 mL의 증류수를 넣고 완전히 용해시킨 후, 증류수를 표선까지 채운다.

4.1.3 표준원액을 1, 2, 3, 4 및 5 mL를 정확히 취하여 각각 10 mL 용량플라스크에 옮겨 넣는다.

4.1.4 이에 내부표준용액 1 mL를 넣은 뒤 증류수로 표선까지 채운다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 프락토올리고당으로서 0.2~2 g이 함유되도록 검체를 정확히 달아 100 mL 용량플라스크에 넣는다.

4.2.2 증류수 20 mL를 가하여 용해 또는 추출한다(산성인 채로 실험을 진행할 경우 가수분해의 우려가 있으므로 필요하면 중화하고, 가열하며 혼합 또는 초음파 처리한다).

4.2.3 완전히 용해된 후 내부표준용액 20 mL를 넣고, 증류수를 표선까지 채운다.

4.2.4 여과지 No.5B 또는 10,000 Da cut off 원심분리필터를 이용하여 여과한다.

4.2.5 여과액과 동량의 에탄올을 첨가하여 희석한다. 단, 침전 또는 탁한 것이 생겼을 경우 여과하고 여과액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	40°C
Nebulization Temp.	70%
Pressure (N ₂ gas)	40psi
Drift tube Temp.	85°C
이동상	70% Acetonitrile
유속	1.0 mL/min

5.2 계산

5.2.1 개별 프락토올리고당(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중 개별 프락토올리고당의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 검체량(g)

5.2.2 프락토올리고당 함량(mg/g)

= GF2(mg/g) + GF3(mg/g) + GF4(mg/g)

3-32 지방산

3-32-1 지방산(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 0.5 N 메탄올성수산화나트륨과 14% 트리플루오르보란메탄올을 이용하여 메틸에스테르화시켜 분석하는 방법으로 내부표준물질의 면적과 비교하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 균질기

2.1.2 환류냉각기

2.1.3 수욕조

2.1.4 환저플라스크(100 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 100% dimethylpolysiloxane (길이 50 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.5 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 각종 지방산

3.2 내부표준물질

3.2.1 C_{11:0} triundecanoic acid

분자식 : C₃₆H₆₈O₆, 분자량 : 596.92, CAS No. : 13552-80-2

3.3 일반시약

3.3.1 트리플루오르보란(Boron trifluoride)

3.3.2 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.3.3 헵탄(Heptane, GC 급) 또는 이소옥탄(Isooctane, GC 급)

3.3.4 염화나트륨 포화용액

3.3.5 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)

3.3.6 메탄올(Methanol)

3.4 시액의 조제

3.4.1 14% 트리플루오르보란메탄올용액 : 125 g BF_3 를 1 L의 메탄올에 녹인다.

3.4.2 0.5 N 메탄올성수산화나트륨용액(0.5 N Sodium hydroxide/MeOH)
수산화나트륨 2 g을 메탄올 100 mL에 녹인다.

3.4.3 내부표준용액

10 mg의 $\text{C}_{11:0}$ triundecanoin을 이소옥탄에 녹여 10 mL가 되게 한다(1 mg/mL).

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 지방산 표준물질 약 100 mg을 100 mL 환저플라스크에 정밀히 취한다.

4.1.2 0.5 N 메탄올성수산화나트륨용액 4 mL를 가한다.

4.1.3 내부표준용액은 지방산 표준물질 농도보다 높은 농도로 조절하여 환저플라스크에 넣어 사용한다.

4.1.4 플라스크 위에 환류냉각기를 설치하고 5~10분간 수욕상에서 균질한 용액이 얻어질 때까지 가열한다.

4.1.5 그 후 14% BF_3 용액 5 mL를 환류냉각기를 통해 가하고 2분 동안 계속 가열한다.

4.1.6 마지막으로 헵탄 5 mL를 냉각기를 통해 가하고 1분간 더 가열한다.

4.1.7 욕조와 냉각기를 제거하고 염화나트륨 포화용액을 가하여 플라스크를 휘저은 후 염화나트륨 포화용액을 더 가하여 플라스크 목 부분까지 올라오게 한다.

4.1.8 상층에서 약 1 mL의 헵탄을 취한 후 소량의 무수황산나트륨을 가하여 탈수시킨 것을 표준용액으로 한다.

※ 공액리놀레산의 경우 70~80°C에서 가열한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 지방 및 유지

4.2.1.1 시료를 환저플라스크에 정밀히 취하고 0.5 N 메탄올성 수산화 나트륨용액 4 mL을 가한다.

4.2.1.2 시험용액의 내부표준물질 농도와 표준용액의 내부표준물질 농도가 동일한 농도가 되도록 내부표준용액 농도를 조절하여 환저플라스크에 넣는다.

4.2.1.3 4.1.4 이하의 과정을 동일하게 수행한다.

4.2.2 지방산

4.2.2.1 시료를 환저플라스크에 정밀히 취한다.

4.2.2.2 시험용액의 내부표준물질 농도와 표준용액의 내부표준물질 농도가 동일한 농도가 되도록 내부표준용액 농도를 조절하여 환저플라스크에 넣는다.

4.2.2.3 4.1.4 이하의 과정을 동일하게 수행한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250℃
칼럼 온도	180℃(1분)-10℃/분-230℃(1분)
검출기 온도	250℃
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분
Split ratio	10 : 1

※ 탄소수가 12이하인 경우에는 칼럼온도가 더 낮아야 하며, 탄소수가 20이상인 경우에는 주입부, 칼럼, 검출기의 온도가 높아야 한다. 다양한 탄소수의 지방산을 한번에 분석할 경우에는 칼럼온도의 승온조건 조작이 필요하다.

5.2 계산

5.2.1 지방산 함량(mg/g)

$$= STc \times (SAfa/STfa) \times (STis/SAis) \times (V/S) \times (1/1,000)$$

STc : 표준물질용액의 농도(μg/mL)

SAfa : 시험용액내 표준물질의 피크면적
STfa : 표준물질의 피크면적
STis : 표준물질용액내 내부표준물질 피크면적
SAis : 시험용액내 내부표준물질 피크면적
V : 최종희석용액(mL)
S : 시료 채취량(g)
1/1,000 : 단위 환산 계수

3-32-2 지방산(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 유지를 메탄올성 수산화나트륨용액으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란메탄올 용액을 가하고 가열하여 에스테르화한다. 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 분석을 행한다. 개별 지방산의 함량 및 대표적인 지방산의 합을 계산한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 유리튜브
- 2.1.2 균질기
- 2.1.3 질소 충전기
- 2.1.4 환류냉각기
- 2.1.5 가열기(heating block)

2.2 분석장비

- 2.2.1 가스크로마토그래프
- 2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 poly(biscyanopropylsiloxane) (100 m × 0.25 mm, 0.2 μm) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

분석시작 전에 주입부 및 검출기 온도, 유량, 칼럼 온도를 분석조건에 맞게 조작하고, 가스크로마토그래프를 충분히 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 분석하고자 하는 지방산의 메틸 에스테르

3.2 내부표준물질

- 3.2.1 Undecanoic acid methyl ester

3.3 시약

- 3.3.1 트리플루오르보란(Boron trifluoride)
- 3.3.2 수산화나트륨(Sodium hydroxide)
- 3.3.3 이소옥탄(Isooctane, GC급)
- 3.3.4 염화나트륨 포화용액
- 3.3.5 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)
- 3.3.6 메탄올(Methanol)

3.4 시액의 제조

- 3.4.1 14% 트리플 루오르보란메탄올용액
125 g BF_3 를 1 L의 메탄올에 녹인다.
- 3.4.2 0.5N 메탄올성수산화나트륨용액
수산화나트륨 2 g을 메탄올 100 mL에 녹인다.
- 3.4.3 내부표준용액 : triundecanoin ($\text{C}_{11}\text{:O}$) 0.01 g을 이소옥탄용액에 녹여 10 mL가 되게 한다(1 mg/mL).
- 3.4.4 염화나트륨 포화용액

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

- 4.1.1 분석하고자 하는 지방산 메틸 에스테르와 내부표준물질 undecanoic acid 메틸 에스테르를 이소옥탄에 녹여 각각 0.5 mg/mL이 되도록 조제한다.

4.2 시험용액의 제조

- 4.2.1 시료 25 mg을 유리튜브에 정밀히 취하고, 3.4.3용액을 1 mL 첨가한다.

고시 제2023-50호(2023.7.24.), 시행일(2024.1.1.)

※ 싼팔메토 열매 추출물의 경우 내부표준물질 첨가한 시험용액(A) 및 내부표준물질을 첨가하지 않은 시험용액(B)을 각각 실험하여 비교한다.

- 4.2.2 이어 0.5N 메탄올성 수산화나트륨 1.5 mL를 가하고 질소 충전하고 즉시 뚜껑을 덮고 혼합한다.
- 4.2.3 이어 100°C heating block에서 5분간 가온한다.
- 4.2.4 이를 냉각한 후 14% 트리플루오르보란메탄올용액 2 mL을 가하고 질소를 충전한 후 뚜껑을 덮고 혼합하고 100°C에서 30분간

가열한다 (이때 공액리놀레산의 경우, 70~80℃에서 가온한다).

4.2.5 이어 30~40℃로 냉각하여 이소옥탄 1 mL을 가하여 질소를 불어 넣은 후 뚜껑을 덮고 30초간 격렬히 진탕한다.

4.2.6 즉시 염화나트륨 포화용액 5 mL을 가하고 질소를 불어넣은 후 뚜껑을 덮고 진탕한다.

4.2.7 상온으로 냉각한 후 수층으로부터 분리된 이소옥탄층을 무수황산 나트륨으로 탈수하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	225℃
칼럼 온도	100℃(4분) → 3℃/분 → 240℃(15분)
검출기 온도	285℃
캐리어 가스 및 유량	헬륨, 0.75 mL/분
Split ratio	200 : 1

5.2 계산

5.2.1 시험용액 및 표준용액에서 얻은 각 지방산의 피크면적, 내부표준 물질의 피크면적으로부터 다음과 같이 정량을 한다.

5.2.1.1 개별 지방산 메틸 에스테르의 함량 계산

$$W_{FAMEi} = \frac{Pt_i \times W_{t_{C_{11:0}}} \times 1.0067}{Pt_{C_{11:0}} \times R_i}$$

W_{FAMEi} : 지방산 i의 메틸 에스테르로서의 양(mg)

Pt_i : 시험용액 중 지방산 i의 피크면적

$W_{t_{C_{11:0}}}$: 시험용액 중 내부표준물질($C_{11:0}$ triundecanoin) 첨가량(mg)

1.0067 : 내부표준물질($C_{11:0}$ triundecanoin)의 트리글리세라이드로 부터 지방산 메틸 에스테르로의 전환계수

$Pt_{C_{11:0}}$: 시험용액 중 내부표준물질(undecanoic acid methyl

ester)의 피크면적

고시 제2023-50호(2023.7.24.), 시행일(2024.1.1.)

※ 내부표준물질을 첨가하지 않은 시험 용액(B) 에서 내부표준 물질(C_{11:0}) 의 피크가 나타나는 경우, PtC_{11:0}은 시험용액 (A)의 피크면적에서 시험용액 (B)의 피크면적 값을 감하여 보정한다.

시험용액(A)의 PtC_{11:0} - [시험용액 (B)의 (PtC_{11:0}/ 시험용액(B)의 W_{spl}) × 시험용액(A)의 W_{spl}]

5.2.1.2 지방산 i의 반응계수(response factor, R_i)의 계산

$$※ R_i = \frac{P_{si}}{P_{sC11:0}} \times \frac{WC_{11:0}}{W_i}$$

P_{si} : 표준용액 중 지방산 메틸 에스테르 i의 피크면적

P_{sC11:0} : 표준용액 중 내부표준물질(undecanoic acid methyl ester)의 피크면적

W_{C11:0} : 표준용액 중 내부표준물질(undecanoic acid methyl ester)의 양(mg)

W_i : 표준용액 중 지방산 메틸 에스테르 i의 양(mg)

※ 공액리놀레산의 경우 리놀레산 메틸에스테르의 반응계수를 사용할 수 있다.

5.2.1.2 개별 지방산 함량 계산

$$\text{지방산(g/100 g)} = \frac{W_{FAi} \times 100}{W_{spl}}$$

$$W_{FAi} = W_{FAMEi} \times f_{FAi}$$

f_{FAi} : 지방산 i(메틸 에스테르로서)의 지방산 전환계수(표 1.)

W_{spl} : 검체량(mg)

표 1. 지방산 메틸에스테르로부터 지방산으로의 전환계수

지방산명		f_{FAi}
C4:0	Butyric acid	0.8627
C6:0	Caproic acid	0.8923
C8:0	Caprylic acid	0.9114
C10:0	Capric acid	0.9247
C11:0	Undecanoic acid	0.9300
C12:0	Lauric acid	0.9346
C13:0	Tridecanoic acid	0.9386
C14:0	Myristic acid	0.9421
C14:1	Tetradecenenoic	0.9417
C15:0	Pentadecanoic acid	0.9453
C15:1	Pentadecenoic acid	0.9449
C16:0	Palmitic acid	0.9481
C16:1	Hexadecenoic acid	0.9477
C17:0	Margaric acid	0.9507
C17:1	Margaroleic acid	0.9503
C18:0	Stearic acid	0.9530
C18:1	Octadecenoic acid	0.9527
C18:2	Octadecadienoic acid	0.9524
C18:3	Linolenic acid	0.9520
C20:0	Arachidic acid	0.9570
C20:1	Eicosenic acid	0.9568
C20:2	Eicosadienoic acid	0.9565
C20:3	Eicosatrienoic acid	0.9562
C20:4	Arachidonic acid	0.9560
C20:5	Eicosapentaenoic acid	0.9557
C21:0	Heneicosanoic acid	0.9588
C22:0	Behenic acid	0.9604
C22:1	Docosaenoic acid	0.9602
C22:2	Docosadienoic acid	0.9600
C22:3	Docosatrienoic acid	0.9598
C22:4	Docosatetraenoic acid	0.9595
C22:5	Docosapentaenoic acid	0.9593
C22:6	Docosahexaenoic acid	0.9590
C23:0	Tricosanoic acid	0.9620
C24:0	Lignoceric acid	0.9563
C24:1	Nervonic acid	0.9632

3-32-3 지방산(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 지방산의 에틸에스테르 형태(EPA, DHA 등)를 메틸에스테르화하지 않고 직접 분석하는 방법으로 내부표준물질의 면적과 비교하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 균질기

2.1.2 시험관

2.1.3 가스크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 100% dimethylpolysiloxane(길이 30 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.25 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 EPA 에틸 에스테르(Eicosapentaenoic acid ethyl ester)

3.1.2 DHA 에틸 에스테르(Docosahexaenoic acid ethyl ester)

3.2 내부표준물질

3.2.1 메틸 트리코사노에이트(Methyl tricosanoate)

3.3 일반시약

3.3.1 이소옥탄 용액 : 부틸하이드록시톨루엔(Butylhydroxytoluene) 50 mg/이소옥탄 1L

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

4.1.1 DHA 표준품 60 mg, EPA 표준품 90 mg, 내부표준물질 70 mg을 이소옥탄에 녹이고 같은 용매로 희석하여 용액의 부피를 10 mL로 맞춘다.

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 표 1 에 따라 칭량된 시료와 내부표준물질 70 mg을 이소옥탄에 녹이고 같은 용매로 희석하여 용액의 부피를 10 mL로 맞춘다.

표 1. 분석에 사용될 시료의 양(예)

EPA와 DHA 함량의 합(%)	사용할 시료의 양(g)
30 - 50	0.4 - 0.5
50 - 70	0.3
70 - 90	0.25

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 표준용액 및 시험용액을 표 2와 같은 조건으로 가스크로마토 그래프를 이용하여 분석한다.

표 2. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250℃
칼럼 온도	170℃(0~2분), 170→240℃(2~25.7분), 240℃(25.7~28분)
검출기 온도	270℃
캐리어 가스 및 유량	헬륨 또는 질소, 3.0 mL/분
Split ratio	100:1~200:1

5.2 계산

5.2.1 DHA 및 EPA의 함량(%)

$$= A_x \times (A_3/m_3) \times (m_1/A_1) \times (m_{x,r}/A_{x,r}) \times (1/m_2) \times 100$$

m_1 : 시험용액 중의 내부표준물질의 양(mg)

m_2 : 시험용액 중의 시료의 양(mg)

m_3 : 표준용액 중의 내부표준물질의 양(mg)

$m_{x,r}$: 표준용액 중의 EPA 또는 DHA 에틸에스테르 표준품의 양(mg)

A_x : 시험용액 중의 EPA 또는 DHA 에틸에스테르의 피크면적

$A_{x,r}$: 표준용액 중의 EPA 또는 DHA 에틸에스테르의 피크면적

A_1 : 시험용액 중의 내부표준물질의 피크면적

A_3 : 표준용액 중의 내부표준물질의 피크면적

3-33 인지질(아세톤불용물로서)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 지질을 충분히 추출하여 지질의 양을 측정하고 이들 지질 중 인지질을 아세톤 불용물로서 분리하여 무게를 측정하여 인지질 함량을 정량 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 등근바닥플라스크
- 2.1.2 원심분리관(50 mL)
- 2.1.3 감압농축기
- 2.1.4 건조기(Dry oven)
- 2.1.5 원심분리기

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

- 3.1.1 석유에테르
- 3.1.2 에틸에테르
- 3.1.3 헥산
- 3.1.4 아세톤(Acetone, 0~5°C로 냉각)

4. 시험과정

4.1 시료 약 2 g(W_1 , 수분을 함유한 경우 미리 80°C 전후로 가온하여 감압하에 탈수 건조한다)을 석유에테르, 헥산 등으로 용해한 후 여과한다. 캡슐제품의 경우 중양을 절단한 후 삼각플라스크에 넣고 에틸에테르 약 40 mL를 넣어 10분간 진탕시켜 내용물을 완전히 용해 추출시키고 캡슐 기제를 제거하여 여과한다.

4.2 지질 이외의 성분이 제거된 여액은 미리 항량한 등근바닥플라스크에 넣어 잔존하는 용제를 감압하에 제거하여 자연건조 후 시험용 시료(W_2)로 한다.

※ 지질이외의 성분 제거 조작 시 클로로포름/메탄올, 클로로포름/헥산 등의 혼합액을 사용하여 환류할 수 있다.

4.3 시험용 시료(W_2)를 석유에테르 3 mL에 녹여 50 mL 눈금의 원심분리관에 넣고 아세톤 15 mL를 가해 잘 혼합하고 얼음물 중에 15분간 방치한다.

4.4 이에 미리 0~5°C로 냉각한 아세톤을 가해 50 mL로 하여 다시 얼음물 중에 15분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 미리 항량한 플라스크에 취한다.

4.5 원심분리관의 침전물에 0~5°C의 아세톤을 가해 50 mL로 하고, 얼음 중에서 냉각시키면서 잘 혼합한 후 4.4와 동일하게 원심분리하여 상층액을 4.4의 플라스크에 합하여 수욕 상에서 감압농축한다.

4.6 잔류물은 105°C에서 한 시간 건조 후 함량을 구한다(W_3)

5. 분석 및 계산

5.1 인지질 함량(mg/g) = $(W_2 - W_3)/W_1$

W_1 : 시료 채취량(g)

W_2 : 시험용 시료량(mg)

W_3 : 아세톤 가용물 중량(mg)

3-34 인지질 중 포스파티딜콜린의 함량

3-34-1 인지질 중 포스파티딜콜린의 함량(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 인지질 중 포스파티딜콜린을 박층크로마토그래프판(Thin layer chromatography plate)을 이용해 분리한 후 습식 분해하여 인을 추출 정량하는 방법으로, 발색시약을 사용하여 640 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 박층크로마토그래프판
- 2.1.2 원추형 플라스크(100 mL)
- 2.1.3 시계접시
- 2.1.4 비커
- 2.1.5 분액여두(100 mL)
- 2.1.6 진탕기

2.2 분석장비

- 2.2.1 분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

- 3.1.1 헥산(*n*-Hexane)
- 3.1.2 클로로포름(Chloroform)
- 3.1.3 메탄올(Methanol)
- 3.1.4 암모니아수(Ammonia solution)
- 3.1.5 과염소산(Perchloric acid)
- 3.1.6 질산(Nitric acid)
- 3.1.7 수산화나트륨(Sodium hydroxide)
- 3.1.8 *p*-니트로페놀 용액(*p*-nitrophenol)

- 3.1.9 7몰리브덴산(6-)암모늄염4수화물(Ammonium molybdate tetrahydrate)
- 3.1.10 주석산 칼륨(Potassium tartrate)
- 3.1.11 황산(Sulfuric acid)
- 3.1.12 아마이드 황산암모늄(ammonium sulfamate)
- 3.1.13 인산2수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate)
- 3.1.14 아스코브산(Ascorbic acid)
- 3.1.15 디이소부틸케톤(Diisobutyl ketone, 2,6-Dimethyl-4-heptanone)
- 3.2 시액의 조제
 - 3.2.1 몰리브덴산 암모늄 용액
7몰리브덴산(6-)암모늄염4수화물 6 g과 주석산 칼륨 0.24 g을 증류수 300 mL에 녹이고, 이에 황산(2+1)120 mL를 가한 후 아마이드 황산암모늄 5 g을 녹인 후 증류수를 가해 500 mL로 한다.
 - 3.2.2 4% 수산화나트륨
 - 3.2.3 0.1% p-니트로페놀 용액
 - 3.2.4 클로로포름 : 메탄올 : 7 N 암모니아수(130 : 60 : 8, v/v/v)의 혼합액
 - 3.2.5 1% 아스코브산 용액

4. 시험과정

- 4.1 표준용액의 조제
 - 4.1.1 1.0982 g의 인산2수소칼륨(KH_2PO_4)을 증류수에 용해하여 250 mL로 하고 이 용액 5.0 mL를 1000 mL로 희석하고, 검량선 작성용 표준인산용액으로 한다(인으로서 5.0 $\mu\text{g/mL}$).
- 4.2 시험용액의 조제
 - 4.2.1 시료 0.2~0.5 g을 정확히 달아 헥산에 녹여 50 mL로 한다.
- 4.3 포스파티딜콜린 중 인의 정량
 - 4.3.1 이 중 100 μL 를 취하여 박층판의 우하단 및 우변에서 2 cm 위치에 점적하여 클로로포름 : 메탄올 : 7 N 암모니아수(130 : 60 : 8, v/v/v)의 혼합액을 전개용매로 하여 2차 전개시킨다.
 - 4.3.2 전개 후 박층판을 풍건하고 요오드 증기를 사용하여 인지질의 반점을 발색시켜 포스파티딜콜린의 반점을 확인한다.
 - 4.3.3 반점을 긁어 100 mL의 원추형 플라스크에 취하고, 과염소산 2 mL

- 및 질산 2~3방울 가하고 시계접시를 덮개로 하여 가열 분해한다.
- 4.3.4 식힌 후 비커 및 시계접시를 증류수로 씻어 여과한다.
- 4.3.5 여액 및 세액을 합하여 증류수로 50 mL가 되게 한다.
- 4.3.6 인으로서 1~10 μg 을 함유하는 일정량을 100 mL 분액 여두에 정확히 취한 후, 4% 수산화나트륨 용액으로 중화한다(지시약 : 0.1% p-니트로페놀용액).
- 4.3.7 증류수로 전량을 약 40 mL가 되게 하고 몰리브덴산 암모늄용액 5 mL를 가해 진탕혼합하고, 이어 1% 아스코브산 용액 1 mL를 넣어 흔들어 혼화한 후 15분간 진탕 혼합하여 15분간 방치한다.
- 4.3.8 디이소부틸케톤 5 mL를 가해 5분간 진탕 혼합한다.
- 4.3.9 정치 후 용매층을 취한다.
- 4.4 인지질 중 인의 정량
- 4.4.1 시험용액에서 100 μL 를 원추형비커에 취하고 핵산을 제거한다.
- 4.4.2 [4.3]포스파티딜콜린 중 인의 정량과 동일한 조작으로 인지질의 인 함량을 구한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

- 5.1.1 640 nm에서 흡광도를 측정한다.

단, 표준인산용액(인으로서 5.0 $\mu\text{g/mL}$)을 이용하여 검량선을 작성하여 정량한다.

5.2 계산

- 5.2.1 포스파티딜콜린 조성비(%) = $A/B \times 100$

A : 포스파티딜콜린 중 인 함량(mg/g)

B : 인지질 중 인 함량(mg/g)

3-34-2 인지질 중 포스파티딜콜린의 함량(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 인지질 중 포스파티딜콜린을 박층크로마토그래프판을 이용해 분리한 후 습식 분해하여 인을 추출하는 방법으로 유도결합플라즈마분광광도계를 사용하여 인을 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 박층크로마토그래프판(Thin layer chromatography plate)

2.1.2 원추형 플라스크(100 mL)

2.1.3 시계접시

2.1.4 비커

2.1.5 원추형 비커

2.2 분석장비

2.2.1 유도결합플라즈마분광광도계(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, ICP)

2.3 분석장비의 준비

분석 전 ICP를 충분히 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

3.1.1 헥산(n-Hexane)

3.1.2 클로로포름(Chloroform)

3.1.3 메탄올(Methanol)

3.1.4 암모니아수(Ammonia solution)

3.1.5 과염소산(Perchloric acid)

3.1.6 질산(Nitric acid)

3.2 시액의 조제

3.2.1 4% 수산화나트륨

3.2.2 0.1% p-니트로페놀 용액

3.2.3 클로로포름 : 메탄올 : 7 N 암모니아수(130 : 60 : 8, v/v/v)의 혼합액

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 ICP용 인 표준용액(1000 ppm)을 질산으로 희석하여 0.5, 1, 5 ppm 용액을 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 0.2~0.5 g을 정확히 달아 헥산에 녹여 50 mL로 한다.

4.3 포스파티딜콜린 중 인의 정량

4.3.1 이 중 100 μ L를 취하여 박층판의 우하단 및 우변에서 2 cm 위치에 점적하여 클로로포름 : 메탄올 : 7 N 암모니아수(130 : 60 : 8, v/v/v)의 혼합액을 전개용매로 하여 2차 전개시킨다.

4.3.2 전개 후 박층판을 풍건하고 요오드 증기를 사용하여 인지질의 반점을 발색시켜 포스파티딜콜린의 반점을 확인한다.

4.3.3 반점을 긁어 100 mL의 원추형 플라스크에 취하고, 과염소산 2 mL 및 질산 2~3방울 가하고 시계접시를 덮개로 하여 2~3시간동안 가열하여 분해한다.

4.3.4 식힌 후 비커 및 시계접시를 증류수로 씻어 여과한다.

4.3.5 여액 및 세액을 합하여 증류수로 50 mL가 되게 한다.

4.3.6 인으로서 1~10 μ g을 함유하는 일정량을 2% 질산용액으로 20 mL로 하여 시험용액으로 한다.

4.4 인지질 중 인의 정량

4.4.1 시험용액에서 100 μ L를 원추형 비커에 취하고 헥산을 제거한다.

4.4.2 [4.3] 포스파티딜콜린 중 인의 정량과 동일한 조작을 행한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. ICP 분석조건(예)

항목	조건
RF power(kW)	1.2
Carrier gas flow	0.7 mL/분
Coolant gas flow	14.0 mL/분
Plasma gas flow	1.2 mL/분
Wavelength	213.6 nm

5.2 계산

5.2.1 포스파티딜콜린 조성비(%) = $A/B \times 100$

A : 포스파티딜콜린 중 인 함량(mg/g)

B : 인지질 중 인 함량(mg/g)

3-34-3 인지질 중 포스파티딜콜린의 함량(제3법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 포스파티딜콜린을 추출한 후 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법으로 시차굴절계검출기(Refractive Index Detector)를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(50 mL)
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.3 용매용 일회용 실린지
- 2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

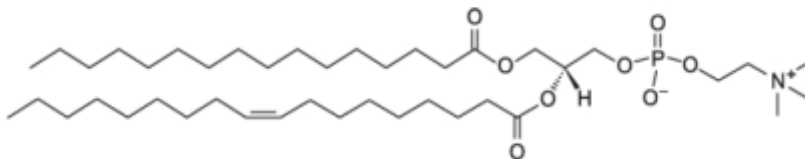
- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 시차굴절계검출기
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 HILIC 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m)
또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 포스파티딜콜린(L- α -Phosphatidylcholine, L- α -Lecithin)

CAS No. : 8002-43-5(대두 또는 난황)(원재료에 따라 검체의 표준품을 선택하여 사용한다.)



3.2 일반시약

3.2.1 헥산(*n*-Hexane)

3.2.2 이소프로판올(Isopropanol)

3.2.3 물(Water)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 포스파티딜콜린 100 mg을 정밀하게 칭량하고 헥산 : 이소프로판올 : 물(30 : 60 : 10, v/v/v)로 녹여 5 mL로 한 것을 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 헥산 : 이소프로판올 : 물(30 : 60 : 10, v/v/v)로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 포스파티딜콜린으로서 500 mg을 정확히 달아 헥산 : 이소프로판올 : 물(30 : 60 : 10, v/v/v)에 녹여 50 mL로 하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼 온도	40°C
이동상	헥산 : 이소프로판올 : 증류수(30 : 60 : 10, v/v/v)
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 포스파티딜콜린 함량(%) = $C \times (a \times b) / S \times 100 / 1,000,000$

C : 시험용액 중 포스파티딜콜린 함량(μ g/mL)

S : 시료 채취량(g)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

100/1,000,000 : 단위 환산 계수

5.2.2 포스파티딜콜린 조성비(%) = $A/B \times 100$

A : 포스파티딜콜린 함량(g/100 g)

B : 인지질 함량(g/100 g), 인지질(아세톤 불용물로서) 시험법으로 계산

3-35 콜레스테롤

1. 시험방법의 요약

검체 중 지질을 고온에서 수산화칼륨 에탄올 용액으로 비누화한다. 콜레스테롤을 헥산으로 추출하고 트리메틸실릴(TMS) 에테르화하여 유도체화 한 다음 이를 기체크로마토그래피로 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 원심분리관 : 15 mL, Pyrex No. 13.

※ 유도체화를 위해서 원심분리관을 실란화하여 사용한다. 이를 위해 원심분리관을 시판되는 실란화 시약으로 제품별 절차에 따라 처리한 후 사용한다. 원심분리관을 재사용하기 전에 물, 에탄올, 헥산 및 아세톤으로 세척하고 100°C 오븐에 건조하여 사용한다. 강알칼리로 시험관을 세척한 것이 아니라면 실란화를 다시 하지 않고 시험관을 다시 사용할 수 있으나 적어도 6개월에 한번은 실란화하여 사용한다.

2.1.2 감압농축기

2.1.3 자석교반-가열기

2.1.4 교반기(Vortex mixer)

2.1.5 둥근바닥플라스크(250 mL)

2.1.6 부피플라스크

2.1.7 분액여두(500 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프/불꽃이온화검출기(GC-FID)

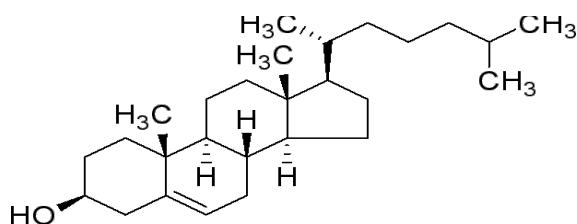
2.2.2 칼럼 : HP-5(25 m × 0.32 mm × 0.17 μm 또는 이와 동등 제품(5%-phenyl-methyl polysiloxane)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 콜레스테롤(Cholesterol)

분자식 : $C_{27}H_{46}O$, 분자량 : 386.65, CAS No. : 57-88-5



3.2 내부표준물질

3.2.1 5α-콜레스탄(5α-Cholestane)

3.3 일반시약

3.3.1 디메틸포름아미드(Dimethyl formamide, DMF) : 기체크로마토그래피용

3.3.2 헥사메틸디실라잔(Hexamethyl disilazane, HMDS)

3.3.3 수산화칼륨

3.3.4 트리메틸클로로실란(Chloro trimethylsilane, TMCS)

3.3.5 헥산(*n*-Hexane) : 잔류농약급 또는 이와 동등한 것

3.3.6 헵탄

3.3.7 무수황산나트륨

3.4 시액의 조제

3.4.1 5α-콜레스탄 내부표준물질용액

5α-콜레스탄 100 mg을 헥산에 녹여 100 mL로 한다(1 mg/mL).

3.4.2 수산화칼륨 용액

3.4.2.1 50%(w/v) : 수산화칼륨 500 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.2 1M : 수산화칼륨 56 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.3 0.5M : 1M 수산화칼륨 용액을 증류수로 희석하여 조제한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 콜레스테롤 20 mg을 정밀하게 달아 헥산 10 mL에 녹여 표준용액으로 한다.

4.1.2 표준원액을 헥산으로 희석하여 0.0025 ~ 0.2 mg/mL 범위에서 6개 농도로 표준용액을 조제한다.(0.0025, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2

mg/mL로 조제한다.)

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 비누화 과정

4.2.1.1 검체 약 2 g을 정밀히 달아 둥근바닥플라스크에 취하여 자석 막대(마그네틱바)를 둥근바닥플라스크에 넣고 내부표준물질 용액 1.2 mL, 95%(v/v) 에탄올 40 mL와 50%(w/v) 수산화칼륨용액 8 mL를 가한다(95% 에탄올 40 mL 중 일정량을 50% 수산화 칼륨용액 첨가 후 잔류물 세척에 사용하여 플라스크와 콘덴서가 같이 붙어서 떨어지지 않는 것을 방지할 수 있다.)

4.2.1.2 콘덴서를 설치하고 자석교반-가열기를 이용하여 교반하면서 가열하여 70 ± 10 분간 환류 시킨다. 비누화를 위해 시료를 지속적으로 관찰하면서 덩어리가 생길 경우 유리봉으로 분산 시키거나 교반하면서 50% 수산화칼륨용액을 추가하여 시험용액을 교반한다.

4.2.1.3 환류가 완료되면 가열기를 끄고 교반 중에 콘덴서의 상부를 통해 95%(v/v) 에탄올 60 mL을 조심하여 첨가하고 15분간 방치 한다.

4.2.1.4 콘덴서를 플라스크에서 제거하고 플라스크에 마개를 막아 실온으로 냉각시킨다.

4.2.2 추출

4.2.2.1 비누화가 끝난 시험용액을 500 mL 분액여두로 옮기고 헥산 100 mL를 첨가하고 소량의 헥산으로 둥근바닥플라스크에 남아있는 잔류물을 씻어 분액여두에 합한다.

4.2.2.2 1 M 수산화칼륨용액 110 mL를 넣고 10초간 강렬하게 진탕 하여 정치하고 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.3 0.5M 수산화칼륨용액 40 mL를 분액여두에 넣고 분액여두를 뒤집은 후 천천히 내용물이 소용돌이가 생기도록 10초간 섞어준 후 정치하여 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.4 헥산 층을 증류수 40 mL로 천천히 분액여두를 돌려주며 수세한 후 정치하여 분리된 아래층을 버리고 수세과정을 3회 이상 반복한다. 이 때 수세과정이 반복될수록 더욱 강렬하게

진탕 하며, 만약 에멀전이 발생하면 소량의 95%(v/v) 알코올을 첨가하여 분액여두의 내용물이 회오리가 생기도록 섞어준 후 정치하여 층을 분리한다. 헥산 층이 맑게 보일 때까지 수세 과정을 계속한다.

4.2.2.5 약 20 g의 무수황산나트륨을 여과지(Silicon treated filter paper)에 넣고 유리깔때기를 통해 수세한 헥산을 250 mL 둥근바닥플라스크로 흘려주고, 추가로 분액여두에 남아있는 잔류물에 소량의 헥산을 가하여 흘려주어 탈수한다.

4.2.2.6 추출한 헥산 층을 $40\pm3^{\circ}\text{C}$ 에서 약 80 mL로 감압 농축한 후 농축액을 매스실린더 옮기고 용기를 헥산으로 씻어 전량을 100 mL로 한다.

4.2.2.7 이 액 25 mL를 둥근바닥플라스크에 취하고 이를 $40\pm3^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축하여 완전 건조한다.

4.2.2.8 잔류물을 3 mL DMF에 녹여 시험용액으로 한다. 이 때 시험용액의 농도는 콜레스테롤 표준용액의 농도범위 안에 있어야 한다(이 때 정량한계는 0.01 mg/g이다).

4.2.3 유도체화

4.2.3.1 6개 농도의 콜레스테롤 표준용액 1.0 mL와 내부표준물질용액 0.1 mL를 원심분리관에 넣고 질소 건조 후 잔류물을 1 mL DMF로 녹여 유도체화를 위한 표준용액으로 한다.

4.2.3.2 따로 시험용액 1.0 mL를 원심분리관에 취한다.

4.2.3.3 표준용액 및 시험용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1 mL를 가하여 마개를 닫고 이를 강렬하게 30초간 교반하거나 손으로 흔들어 혼합하고 15분간 정치한다.

4.2.3.4 각각의 원심분리관에 헵탄 1.0 mL와 증류수 10 mL를 넣은 후 마개를 닫고 30초간 강렬하게 교반하고 이를 $1,600 \times g$ 에서 2분간 원심분리한다.

4.2.3.5 상층의 헵탄 층을 취하여 기체크로마토그래프 측정용 시험용액으로 한다. 이 때 유도체화 된 표준용액과 시험용액은 24시간 내에 분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250°C
컬럼 온도	190°C(2분)-20°C/분-230°C(3분)-40°C/분-270°C(25분)
검출기 온도	300°C
캐리어 가스 및 유량	질소 또는 헬륨, 2.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 검량선의 작성

유도체화한 6개의 콜레스테롤 표준용액을 1 μ L 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 콜레스테롤 피크면적을 5 α -콜레스탄 피크 면적으로 나눈 값(Y축)과 콜레스테롤 농도(mg/mL, X축)로 검량선을 작성한다. 이 때 시험용액의 농도에 따라 0.01~0.2 mg/mL 범위의 고농도 콜레스테롤 표준용액 4개를 이용하여 검량선을 작성하거나 0.0025~0.05 mg/mL 범위의 저농도 콜레스테롤 표준용액 4개를 이용하여 검량선을 작성할 수 있다.

5.2.2 표준품의 크로마토그램

분석에 사용한 컬럼 특성에 따라 5 α -콜레스탄과 콜레스테롤이 각각 11~13분 및 16~18분에 용출되도록 유속 및 오븐온도를 조정한다.

5.2.3 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

5.2.4 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크면적법에 따라 정량한다.

5.3 계산

$$5.3.1 \text{ 콜레스테롤 함량(mg/g)} = C \times \frac{V_1}{S} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C : 검량선에서 구한 시험용액의 농도(mg/mL)

S : 검체량(g)

V₁ : 추출에 사용한 헥산의 양(100 mL)

V₂ : 농축에 사용된 헥산 추출액의 양(25 mL)

V₃ : 유도체화 전 잔사를 녹이는 데 사용한 DMF의 양(3 mL)

3-36 구연산

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 물로 시료를 추출하고 C₁₈ 카트리지로 불순물을 제거하여 옥타데실릴화한 칼럼을 통하여 구연산을 분리하는 방법으로 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 사용하여 구연산의 최대흡수 파장인 214 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL, 50 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실릴화한 칼럼 (안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

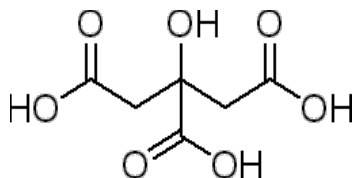
이동상은 제일인산칼륨(KH₂PO₄) 27.2 g을 증류수 950 mL에 용해시킨 후 인산으로 pH 2.4로 조절하여 용매를 분당 0.8 mL를 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 구연산(Citric acid, 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid)

분자식 : C₆H₈O₇, 분자량 : 192.12, CAS No. : 77-92-9



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.2 제일인산칼륨(Monopotassium phosphate)

3.3 시액의 조제

3.3.1 0.2 M 인산완충액(pH 2.4)

제일인산칼륨(KH_2PO_4) 27.2 g을 증류수 950 mL에 용해시킨 후
인산으로 pH 2.4가 되도록 조절한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 구연산 200 mg을 정밀하게 달아 증류수 100 mL에 녹여
표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 약 1~10 g(구연산으로서 약 100 mg이 되도록)을 정밀하게
취하여 증류수로 50 mL로 한다.

4.2.2 C_{18} 카트리지에 아세토니트릴/증류수(1 : 1) 용액 10 mL를
유출시켜 활성화 시킨다.

4.2.3 카트리지 내 용액을 제거한다.

4.2.4 이어서 [4.2.1]의 시료 중 10 mL를 가하여 초기 용출액 4~5 mL을
제거한 후 나머지 용출액을 분취한다.

4.2.5 멤브레인 필터(0.45 μm)로 여과후 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μL
칼럼 온도	40°C
이동상	0.2 M 인산완충액(pH 2.4)
검출기파장	214 nm
유속	0.8 mL/분

5.2 계산

5.2.1 구연산 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 구연산 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-37 스쿠알렌

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 헥산을 이용하여 스쿠알렌을 시료로부터 추출하여 가스크로마토 그래프로 분석하는 방법으로, 내부표준물질과 표준물질의 면적비를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL, 200 mL)

2.1.2 시험관

2.1.3 원심분리기

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

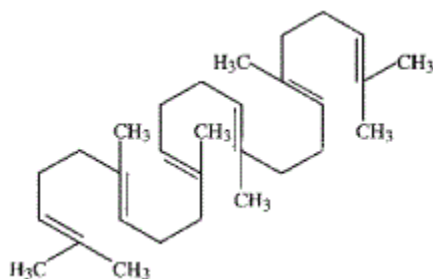
2.2.4 100% dimethylpolysiloxane(길이 50 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.5 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 스쿠알렌(Squalene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-tetracosahex-2,6,10,14,18,22-ene)

분자식 : $C_{30}H_{50}$, 분자량 : 410.72, CAS No. : 111-02-4



3.2 내부표준물질

3.2.1 콜레스테롤(Cholesterol)

3.3 일반시약

3.3.1 클로로포름(Chloroform)

3.3.2 헥산(n-Hexane)

3.4 시액의 조제

3.4.1 내부표준용액

콜레스테롤 200 mg을 정밀히 달아 클로로포름으로 200 mL가 되도록 한다(1,000 mg/L).

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 스쿠알렌 표준물질 100 mg을 정밀히 달아 소량의 헥산으로 녹인 다음 헥산을 가하여 100 mL로 한 것을 표준원액(1,000 mg/L)으로 한다.

4.1.2 표준원액 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 및 8.0 mL를 각각의 시험관에 취하여 콜레스테롤 내부 표준물질 용액 2.0 mL씩 가하여 헥산으로 정확히 10 mL가 되게 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 약 50 mg을 정밀히 달아 내부표준용액 20 mL와 헥산을 넣어 녹이고 정확히 100 mL가 되게 하여 시험용액으로 한다. 필요한 경우 원심분리 또는 여과하여 사용한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250°C
칼럼 온도	190°C(2분)-15°C/분-260°C(5분)-15°C/분-300°C(10분)
검출기온도	300°C
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 계산

5.2.1 스쿠알렌 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 스쿠알렌의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-38 식물스테롤

고시 제2023-50호(2023.7.24.), 시행일(2024.1.1.)

3-38-1 식물스테롤(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 검화시킨 후 식물스테롤 성분을 추출하여 가스크로마토 그래프로 분석하는 방법으로 내부표준물질과 표준물질의 면적비를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 감압농축기

2.1.2 자석교반-가열기

2.1.3 교반기(Vortex mixer)

2.1.4 분석저울 : 0.0001 g까지 측정이 가능한 것

2.1.5 초자기구 : 삼각플라스크(250 mL), 환저 플라스크(250 mL), 피펫, 메스실린더, 분획여두(500 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector, FID)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 100% dimethylpolysiloxane (안지름 0.32 mm, 길이 50 m, 필름두께 0.5 μ m thickness) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

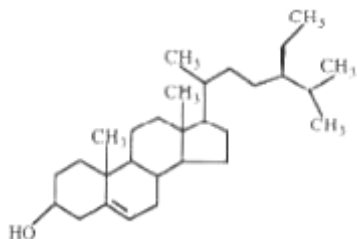
분석시작 전에 주입부 및 검출기 온도, 유량, 칼럼 온도를 분석조건에 맞게 조작하고, 가스크로마토그래프를 충분히 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

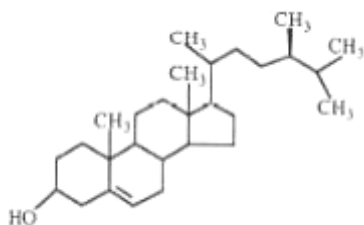
3.1.1 베타시토스테롤(β -sitosterol)

분자식 : $C_{29}H_{50}O$, 분자량 : 414.71, CAS No. : 83-46-5



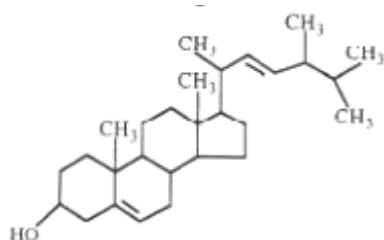
3.1.2 캠페스테롤(campesterol)

분자식 : $C_{28}H_{48}O$, 분자량 : 400.68, CAS No. : 474-62-4



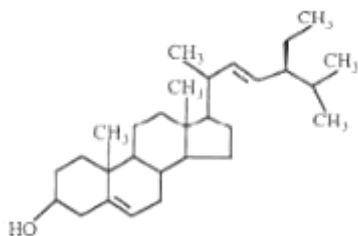
3.1.3 브라시카스테롤(brassicasterol)

분자식 : $C_{28}H_{46}O$, 분자량 : 398.66, CAS No. : 474-67-9



3.1.4 스티그마스테롤(stigmasterol)

분자식 : $C_{29}H_{48}O$, 분자량 : 412.69, CAS No. : 83-48-7



3.2 일반시약

3.2.1 톨루엔(Toluene) : 잔류농약급 또는 이와 동등한 것

3.2.2 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

3.2.3 헥산(n-Hexane)

3.2.4 염화나트륨(Sodium chloride)

3.2.5 클로로포름(Chloroform) : 기체크로마토그래피용

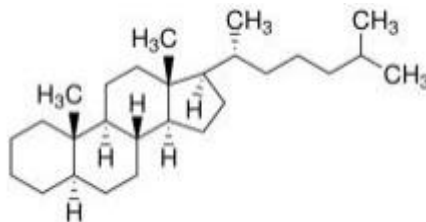
3.2.6 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)

3.2.7 유리솜

3.3 내부표준물질

3.3.1 5 α -콜레스탄(5 α -Cholestane)

분자식 : C₂₇H₄₈, 분자량 : 372.67, CAS No.:481-21-0



3.4 시액의 제조

3.4.1 내부표준용액

5 α -콜레스탄 20 mg을 클로로포름에 녹여 20 mL로 한다(1 mg/mL).

3.4.2 수산화칼륨용액

3.4.2.1 50%(w/w) : 수산화칼륨 500 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.2 1 N : 수산화칼륨 56 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.3 0.5 N : 1 N 수산화칼륨 용액을 증류수로 희석하여 조제한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

4.1.1 4종의 표준물질을 각각 10 mg씩 정밀하게 달아 내부표준용액 10 mL에 녹여 만든다(1 mg/mL).

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 비누화 과정

4.2.1.1 베타-시토스테롤, 브라시카스테롤, 스티그마스테롤, 캄페스테롤의 합계량으로서 25~100 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 환저플라스크에 정밀하게 단다.

4.2.1.2 자석막대를 삼각플라스크에 넣고 95% 에탄올 40 mL과 50%

수산화칼륨용액 8 mL을 가한다(95% 에탄올 40 mL 중 일정량을 50% 수산화칼륨용액 첨가 후 잔류물 세척에 사용하여 플라스크와 콘덴서가 같이 붙어서 떨어지지 않는 것을 방지할 수 있다).

4.2.1.3 콘덴서를 설치하고 자석교반-가열기를 이용하여 교반하면서 가열하여 70 ± 10 분간 환류 시킨다. 비누화를 위해 시료를 지속적으로 관찰하면서 덩어리가 생길 경우 유리봉으로 분산시키거나 교반하면서 50% 수산화칼륨용액을 추가하여 시험 용액을 교반한다.

4.2.1.4 환류가 완료되면 가열기를 끄고 교반 중에 콘덴서의 상부를 통해 95% 에탄올 60 mL을 첨가하고 15분간 방치한다.

4.2.1.5 콘덴서를 플라스크에서 제거하고 플라스크에 마개를 막아 실온으로 냉각시킨 후 12시간 이상(24시간 이내) 동안 정치하여 시험용액을 안정화한다.

4.2.2 추출

4.2.2.1 비누화가 끝난 시험용액을 교반하면서 톨루엔 100 mL을 첨가하고 마개를 하여 30초 이상 교반한다.

4.2.2.2 이를 세척과정 없이 500 mL 분액여두로 옮기고 1 N 수산화칼륨용액 110 mL을 넣고 10초간 강렬하게 진탕하여 정치하고 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.3 0.5 N 수산화칼륨용액 40 mL을 분액여두에 넣고 분액여두를 천천히 내용물이 소용돌이가 생기도록 10초간 섞어준 후 정치하여 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.4 톨루엔 층을 증류수 40 mL로 천천히 분액여두를 돌려주며 수세한 후 정치하여 분리된 아래층을 버리고 수세과정을 3회 이상 반복한다. 이 때 수세과정이 반복될수록 더욱 강렬하게 진탕하며, 만약 에멀전이 발생하면 소량의 95% 알코올을 첨가하여 분액여두의 내용물이 회오리가 생기도록 섞어준 후 정치하여 층을 분리한다. 톨루엔 층이 맑게 보일 때까지 수세과정을 계속한다.

4.2.2.5 유리솜과 약 20 g의 무수황산나트륨이 채워진 유리깔때기를 통해 수세한 톨루엔 층을 약 2 g 무수황산나트륨이 채워진

삼각플라스크로 흘려주어 탈수한다.

4.2.2.6 삼각플라스크에 마개를 막고 15분 이상 정치한다. 이 때 마개의 막음상태가 완벽하더라도 24시간 이상 방치하여서는 안된다.

4.2.2.7 추출한 톨루엔 총 20 mL을 250 mL 환저 플라스크에 취하고 이를 50±3°C에서 감압 농축하여 건조하고 잔류물에 아세톤 약 3 mL을 가한 후 다시 감압 농축하여 완전 건조한다.

4.2.2.8 잔류물을 5 mL 내부표준용액에 녹여 여과한 뒤 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	270°C
칼럼 온도	200(2분)→5°C/분→300°C(5분)
검출기 온도	300°C
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 계산

5.2.1 개별식물스테롤 함량(mg/g)

$$= ST_c \times (SA_{fa}/ST_{fa}) \times (ST_{is}/SA_{is}) \times V/S$$

ST_c : 표준물질용액의 농도(mg/mL)

SA_{fa} : 시험용액내 표준물질의 피크면적

ST_{fa} : 표준물질의 피크면적

ST_{is} : 표준물질용액 내 내부표준물질 피크면적

SA_{is} : 시험용액 내 내부표준물질 피크면적

V : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(g)

5.2.2 식물스테롤 함량(mg/g)의 정량

식물스테롤 함량(mg/g) = 베타-시토스테롤 + 브라시카스테롤 +
스티그마스테롤 + 캄페스테롤

3-38-2 식물스테롤(제2법)고시 제2023-50호(2023.7.24.), 시행일
(2024.1.1.)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 검화시킨 후 톨루엔으로 식물스테롤 성분을 추출하고 트리메틸실릴(TMS) 에테르화하여 유도체화 한 다음 가스크로마토그래프/불꽃이온화검출기를 이용하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 감압농축기

2.1.2 자석교반-가열기

2.1.3 교반기(Vortex mixer)

2.1.4 분석저울 : 0.0001 g까지 측정이 가능한 것

2.1.5 초자기구 : 삼각플라스크(250 mL), 환저 플라스크(250 mL), 메스 실린더, 분액여두(500 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

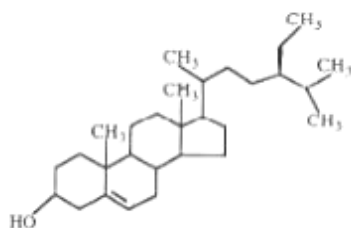
2.2.4 5%-phenyl-methyl polysiloxane(길이 25 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.17 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

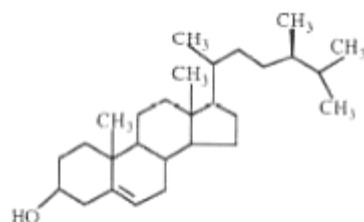
3.1.1 베타-시토스테롤(β -sitosterol)

분자식 : $C_{29}H_{50}O$, 분자량 : 414.71, CAS No. : 83-46-5



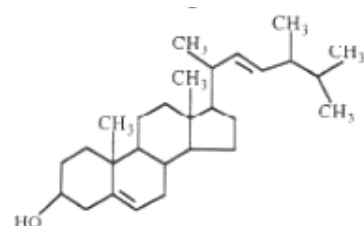
3.1.2 캠페스테롤(campesterol)

분자식 : $C_{28}H_{48}O$, 분자량 : 400.68, CAS No. : 474-62-4



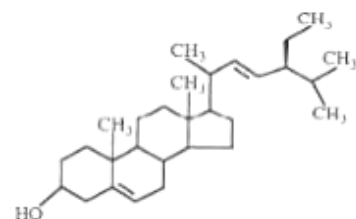
3.1.3 브라시카스테롤(brassicasterol)

분자식 : $C_{28}H_{46}O$, 분자량 : 398.66, CAS No. : 474-67-9



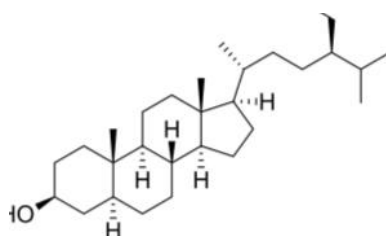
3.1.4 스티그마스테롤(stigmasterol)

분자식 : $C_{29}H_{48}O$, 분자량 : 412.69, CAS No. : 83-48-7



3.1.5 스티그마스타놀(stigmastanol)

분자식 : $C_{29}H_{52}O$, 분자량 : 416.72, CAS No. : 19466-47-8



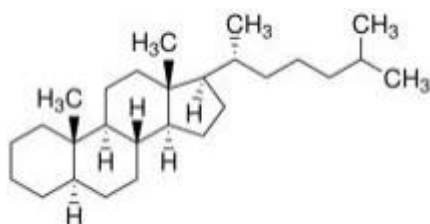
3.2 일반시약

- 3.2.1 톨루엔(Toluene)
- 3.2.2 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- 3.2.3 에탄올(Ethanol)
- 3.2.4 헵탄(Heptane, GC grade)
- 3.2.5 디메틸포름아미드(Dimethyl formamide, DMF)
- 3.2.6 헥사메틸디실라잔(Hexamethyl disilazane, HMDS)
- 3.2.7 트리메틸클로로실란(Chlorotrimethylsilane, TMCS)
- 3.2.8 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)
- 3.2.9 유리솜

3.3 내부표준물질

3.3.1 5α-콜레스탄(5α-Cholestane)

분자식 : $C_{27}H_{48}$, 분자량 : 372.67, CAS No. : 481-21-0



3.4 시액의 제조

3.4.1 내부표준용액

5α-콜레스탄 20 mg을 톨루엔에 녹여 20 mL로 한다.(1 mg/mL)

3.4.2 수산화칼륨용액

3.4.2.1 50%(w/w) : 수산화칼륨 500 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.2 1 M : 수산화칼륨 56 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.3 0.5 M : 1 M 수산화칼륨 용액을 증류수로 희석한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 5종의 표준물질을 각각 10 mg을 정밀하게 달아 톨루엔 10 mL에 녹여 만든다.(1 mg/mL)
- 4.1.2 위의 용액을 톨루엔으로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.(0.5 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)
- 4.1.3 표준용액 1.0 mL와 내부표준물질용액 0.1 mL를 원심분리관에 넣고 질소 건조 후 잔류물을 1 mL DMF로 녹여 유도체화를 위한 표준용액으로 한다.
- 4.1.4 위의 용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1 mL를 가하여 마개를 닫고 이를 강력하게 30초간 교반하거나 손으로 흔들어 혼합하고 15분간 정치한다.
- 4.1.5 각각의 원심분리관에 헵탄 1.0 mL와 증류수 10 mL를 넣은 후 마개를 닫고 30초간 강력하게 교반하고 이를 1,600 × g에서 2분간 원심분리한다.
- 4.1.6 상층의 헵탄 층을 취하여 기체크로마토그래프 측정용 표준용액으로 한다. 이 때 유도체화 된 표준용액과 시험용액은 24시간 내에 분석한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 비누화 과정

- 4.2.1.1 시료 0.5 ~ 2 g을 정밀하게 칭량하여 환저 플라스크에 취한다.
- 4.2.1.2 자석막대를 삼각플라스크에 넣고 내부표준물질 용액 1.2 mL, 95% 에탄올 40 mL과 50% 수산화칼륨용액 8 mL을 가한다 (95% 에탄올 40 mL 중 일정량을 50% 수산화칼륨용액 첨가 후 잔류물 세척에 사용하여 플라스크와 콘덴서가 같이 붙어서 떨어지지 않는 것을 방지할 수 있다.)
- 4.2.1.3 콘덴서를 설치하고 자석교반-가열기를 이용하여 교반하면서 가열하여 70±10분간 환류시킨다. 비누화를 위해 시료를 지속적으로 관찰하면서 덩어리가 생길 경우 유리봉으로 분산시키거나 교반하면서 50% 수산화칼륨용액을 추가하여 시험용액을

교반한다.

4.2.1.4 환류가 완료되면 가열기를 끄고 교반 중에 콘덴서의 상부를 통해 95% 에탄올 60 mL을 첨가하고 15분간 방치한다.

4.2.1.5 콘덴서를 플라스크에서 제거하고 플라스크에 마개를 막아 실온으로 냉각시킨 후 시험용액을 안정화한다.

4.2.2 추출

4.2.2.1 비누화가 끝난 시험용액을 교반하면서 톨루엔 100 mL을 첨가하고 마개를 하여 30초 이상 교반한다.

4.2.2.2 이를 세척과정 없이 500 mL 분액여두로 옮기고 1 M 수산화칼륨용액 110 mL을 넣고 10초간 강렬하게 진탕하여 정치 후 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.3 0.5 M 수산화칼륨용액 40 mL을 분액여두에 넣고 분액여두를 천천히 내용물이 소용돌이가 생기도록 10초간 섞어준 후 정치하여 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.4 톨루엔 층을 증류수 40 mL로 천천히 분액여두를 돌려주며 수세한 후 정치하여 분리된 아래층을 버리고 수세과정을 3회 이상 반복한다. 이 때 수세과정이 반복될수록 더욱 강렬하게 진탕하며, 만약 에멀전이 발생하면 소량의 95% 에탄올을 첨가하여 분액여두의 내용물이 회오리가 생기도록 섞어준 후 정치하여 층을 분리한다. 톨루엔 층이 맑게 보일 때까지 수세과정을 계속한다.

4.2.2.5 유리솜과 약 20 g의 무수황산나트륨이 채워진 유리깔대기를 통해 수세한 톨루엔 층을 약 2 g 무수황산나트륨이 채워진 삼각플라스크로 흘려주어 탈수한다.

4.2.2.6 삼각플라스크에 마개를 막고 15분 이상 정치한다. 이 때 마개의 막음상태가 완벽하더라도 24시간 이상 방치하여서는 안된다.

4.2.2.7 추출한 톨루엔 층 25 mL을 환저 플라스크에 취하고 이를 $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축하여 건고한다. 잔류물에 아세톤 약 3 mL을 가한 후 다시 감압 농축하여 완전 건고한다.

4.2.2.8 잔류물을 3 mL DMF에 녹여 시험용액으로 한다. 이 때 시험용액의 농도는 식물스테롤 표준용액의 농도범위 안에 있어야

한다.

4.2.3 유도체화

4.2.3.1 시험용액 1.0 mL를 원심분리관에 취한다.

4.2.3.2 위의 용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1 mL를 가하여 마개를 닫고 이를 강력하게 30초간 교반하거나 손으로 흔들어 혼합하고 15분간 정치한다.

4.2.3.3 각각의 원심분리관에 헵탄 1.0 mL와 증류수 10 mL를 넣은 후 마개를 닫고 30초간 강력하게 교반하고 이를 $1,600 \times g$ 에서 2분간 원심분리한다.

4.2.3.4 상층의 헵탄 층을 취하여 기체크로마토그래프 측정용 시험용액으로 한다. 이 때 유도체화 된 표준용액과 시험용액은 24시간 내에 분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250°C
칼럼 온도	190°C(2분)-20°C/분-230°C(3분)-40°C/분-270°C(25분)
검출기 온도	300°C
캐리어 가스 및 유량	헬륨, 0.7 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 결과 분석

5.2.1 검량선의 작성

유도체화한 5개의 식물스테롤 표준용액을 1 μ L 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 식물스테롤 피크면적을 5 α -콜레스탄 피크면적으로 나눈 값(Y축)과 식물스테롤 농도(mg/mL, X축)로 검량선을 작성한다.

5.2.2 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

5.2.3 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크면적법에 따라 정량한다.

5.3 계산

$$5.3.1 \text{ 개별 식물스테롤 함량(mg/g)} = C \times (V_1 / S) \times (V_3 / V_2)$$

C : 검량선에서 구한 개별 식물스테롤 시험용액의 농도(mg/mL)

S : 검체량(g)

V₁ : 추출에 사용한 톨루엔의 양(100 mL)

V₂ : 농축에 사용된 톨루엔 추출액의 양(25 mL)

V₃ : 유도체화 전 잔사를 녹이는 데 사용한 DMF의 양(3 mL)

$$5.3.2 \text{ 식물스테롤 함량(mg/g)} = \text{베타-시토스테롤} + \text{캄페스테롤} + \text{브라시카스테롤} + \text{스티그마스테롤} + \text{스티그마스타놀}$$

3-39 유리식물스테롤

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 헥산으로 추출·농축하여 시료 중에 유리 된 식물스테롤을 가스크로마토그래프로 분석하여 내부표준물질과 표준물질의 면적비를 이용 하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 환저플라스크

2.1.2 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector, FID)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 100% dimethylpolysiloxane (길이 50 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

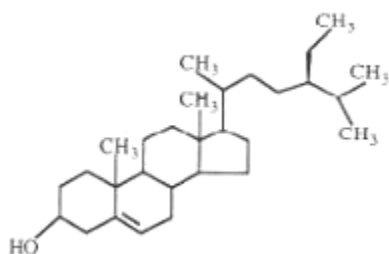
분석시작 전에 주입부 및 검출기 온도, 유량, 칼럼 온도를 분석조건에 맞게 조작하고, 가스크로마토그래프를 충분히 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

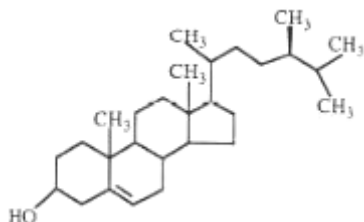
3.1.1 베타시토스테롤(β -sitosterol)

분자식 : $C_{29}H_{50}O$, 분자량 : 414.71, CAS No. : 83-46-5



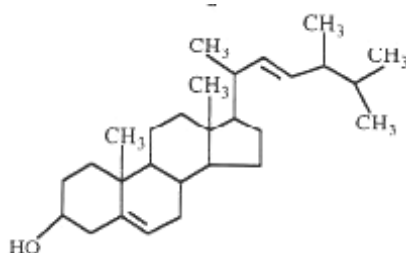
3.1.2 캄페스테롤(campesterol)

분자식 : $C_{28}H_{48}O$, 분자량 : 400.68, CAS No. : 474-62-4



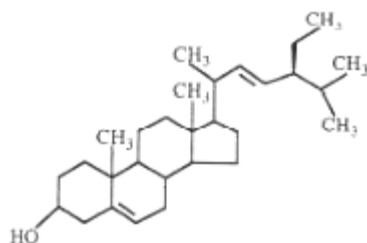
3.1.3 브라시카스테롤(brassicasterol)

분자식 : $C_{28}H_{46}O$, 분자량 : 398.66, CAS No. : 474-67-9



3.1.4 스티그마스테롤(stigmasterol)

분자식 : $C_{29}H_{48}O$, 분자량 : 412.69, CAS No. : 83-48-7



3.2 일반시약

3.2.1 클로로포름(Chloroform) : 기체크로마토그래피용

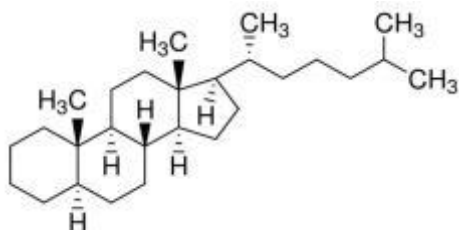
3.2.2 헥산(n-Hexane)

3.2.3 염화나트륨(Sodium chloride)

3.3 내부표준물질

3.3.1 5 α -콜레스탄(5 α -Cholestane)

분자식 : $C_{27}H_{48}$, 분자량 : 372.67, CAS No. : 481-21-0



3.4 시액의 제조

3.4.1 내부표준용액

5α-콜레스탄 20 mg을 클로로포름에 녹여 20 mL로 한다(1 mg/mL).

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 4종의 표준물질을 각각 10 mg을 정밀하게 달아 내부표준용액 10 mL에 녹여 만든다(1 mg/mL).

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 베타-시토스테롤, 브라시카스테롤, 스티그마스테롤, 캄페스테롤의 계량으로서 25 mg~100 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 환저 플라스크에 정밀하게 단다.

4.2.2 100 mL 헥산과 잘 혼합한다.

4.2.3 추출한 헥산층 20 mL를 감압 농축한다.

4.2.4 내부표준용액을 5 mL를 넣은 후 여과한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	270°C
칼럼 온도	200(2분)→5°C/분→300°C(5분)
검출기 온도	300°C
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 계산

5.2.1 개별식물스테롤 함량(mg/g)

$$= ST_c \times (SA_{fa}/ST_{fa}) \times (ST_{is}/SA_{is}) \times 5 \times V/S$$

ST_c : 표준물질용액의 농도(mg/mL)

SA_{fa} : 시험용액 내 표준물질의 피크면적

ST_{fa} : 표준물질의 피크면적

ST_{is} : 표준물질용액 내 내부표준물질 피크면적

SA_{is} : 시험용액 내 내부표준물질 피크면적

V : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(g)

5.2.2 식물스테롤 함량(mg/g)의 정량

식물스테롤 함량(mg/g) = 베타-시토스테롤 + 브라시카스테롤 +
스티그마스테롤 + 캄페스테롤

3-40 알콕시글리세롤

1. 시험방법의 요약

시료를 검화하여 불검화물을 추출하고, 그 양을 측정한 다음 불검화물 중 스쿠알렌의 양을 감하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 환류냉각기

2.1.2 환저플라스크(250 mL)

2.1.3 분액여두(250 mL)

2.1.4 부피플라스크(50 mL, 100 mL, 200 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

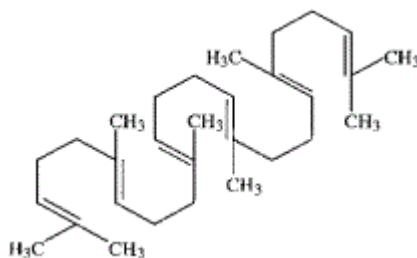
2.2.4 100% dimethylpolysiloxane (안지름 0.32 mm, 길이 50 m, 필름두께 0.5 μm thickness) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 스쿠알렌(Squalene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl- tetracosahex-2,6,10,14,18,22-ene)

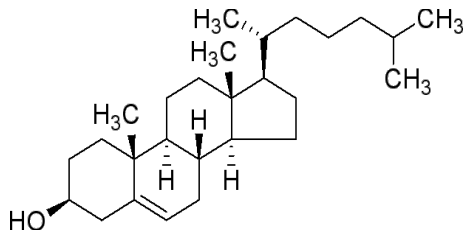
분자식 : $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, 분자량 : 410.72, CAS No. : 111-02-4



3.2 내부표준물질

3.2.1 콜레스테롤(Cholesterol)

분자식 : $C_{27}H_{46}O$, 분자량 : 386.65, CAS No. : 57-88-5



3.3 일반시약

3.3.1 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.3.2 에틸에테르(Ethyl ether)

3.3.3 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)

3.3.4 에탄올(Ethanol)

3.3.5 클로로포름(Chloroform)

3.3.6 헥산(n-Hexane)

3.4 시액의 조제

3.4.1 1 N 에탄올성 수산화나트륨

수산화나트륨 4 g을 소량의 증류수에 녹인 후 에탄올을 가하여 100 mL로 한다.

3.4.2 내부표준용액

콜레스테롤 200 mg을 정밀히 달아 클로로포름으로 녹여 정확히 200 mL가 되게 한다.

4. 시험과정

4.1 비비누화량

4.1.1 알콕시글리세롤 1 g을 정밀히 취하여 환저플라스크에 넣는다.

4.1.2 1 N 에탄올성 수산화나트륨 50 mL를 가한다.

4.1.3 환류냉각기를 이용하여 100°C에서 1시간 30분 동안 검화한 후 에탄올을 증발시킨다.

4.1.4 증류수 50 mL를 가한 다음 분액여두로 옮긴다.

4.1.5 이 용액에 에틸에테르 50 mL를 첨가하고 혼합한 후 정치하여

에틸에테르층을 취한다.

4.1.6 물층은 다시 에틸에테르 50 mL를 가해 세척하여 이전의 에틸에테르층에 합한다(3회 반복).

4.1.7 에틸에테르층에 증류수 50 mL를 가해 교반한 후 증류수층을 제거한다(페놀프탈레인 시액으로 붉은색이 나타나지 않을 때 까지 반복한다).

4.1.8 에틸에테르층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수하여 증발 건조한 후 칭량한 것을 비비누화량(불검화물량)으로 한다.

4.2 스쿠알렌량

4.2.1 표준용액의 조제

4.2.1.1 스쿠알렌 표준물질 50 mg을 정밀히 달아 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.1.2 소량의 헥산으로 녹인 다음 표선까지 헥산을 채워 표준원액으로 한다(1,000 mg/L).

4.2.1.3 표준원액과 내부표준용액을 적절히 희석하여 표준용액으로 한다(내부표준용액 200 mg/L).

4.2.2 시험용액의 조제

4.2.2.1 [4.1.8] 과정에서 만들어진 불검화물 50 mg을 정밀히 달아 내부표준용액 10 mL와 헥산을 넣어 정확히 50 mL가 되도록 하여 시험용액을 만든다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250°C
칼럼 온도	190(2분)-15°C/분-260°C(5분) -15°C/분-300°C(10분)
검출기 온도	300°C
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 계산

5.2.1 알코시글리세롤의 함량(%) =

$$(\text{불검화물의 양(g)} - \text{스쿠알렌의 양(g)}) / \text{시료 채취량(g)} \times 100$$

※ 단, 토코페롤 첨가제품은 토코페롤 양을 추가로 빼준다.

3-41 바틸알콜

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 비누화시켜 비비누화물을 추출한 후 박층 크로마토 그래프(TLC)에 전개시켜 표준품과의 반점위치를 비교하여 정성분석하거나 가스 크로마토그래프/질량검출기로 분석하여 정성하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 환류냉각기

2.1.2 분액여두

2.1.3 박층크로마토그래프판(Thin layer chromatograph plate)

2.1.4 환저플라스크

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프/질량검출기

2.2.2 칼럼오븐

2.2.3 HP-5MS 칼럼(길이 30 m, 안지름 0.25 mm, 필름두께 0.25 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

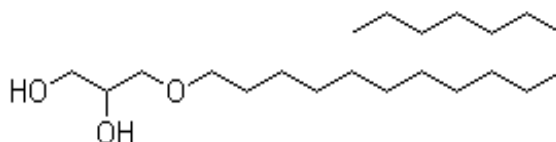
분석시작 전에 주입부 온도, 유량 및 칼럼 온도를 분석조건에 맞게 조작하고, 가스크로마토그래프/질량검출기를 충분히 안정화시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 바틸알콜(DL-Batyl alcohol)

분자식 : $C_{21}H_{44}O_3$, 분자량 : 344.57, CAS No. : 544-62-7



3.2 일반시약

3.2.1 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.2 에틸에테르(Ethyl ether)

3.2.3 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)

3.2.4 헥산(n-Hexane)

3.2.5 초산에틸(Ethyl acetate)

3.2.6 에탄올(Ethanol)

3.3 시액의 조제

3.3.1 1 N 에탄올성 수산화나트륨

수산화칼륨 4 g을 소량의 증류수에 녹인 후 에탄올을 가하여 100 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 비비누화물 추출

4.1.1 알콕시글리세롤로서 1 g에 해당하는 시료를 정밀히 취하여 환저플라스크에 넣는다.

4.1.2 1 N 에탄올성 수산화나트륨 50 mL를 가한다.

4.1.3 환류냉각기를 이용하여 100°C에서 1시간 30분 동안 혼화한 후 에탄올을 증발시킨다.

4.1.4 열수를 가한 다음 분액여두로 옮긴다.

4.1.5 이 용액에 에틸에테르를 첨가하고 혼합한 후 정치하여 에틸에테르층을 취한다.

4.1.6 물층은 다시 에틸에테르를 가해 세척하여 이전의 에틸에테르층에 합한다(3회 반복).

4.1.7 에틸에테르층에 증류수 30 mL를 가해 교반한 후 증류수층을 제거한다(페놀프탈레인 시액으로 붉은색이 나타나지 않을 때 까지 반복한다).

4.1.8 에틸에테르층을 무수황산나트륨으로 탈수시켜 증발 건조한 후 비비누화물로 한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 박층크로마토그래프

DL-바틸알콜 표준물질 50 mg을 취하여 에테르에 녹여 10 mL로 한다.

4.2.2 가스크로마토그래프/질량검출기

DL-바틸알콜 표준물질 50 mg을 취하여 헥산에 녹여 10 mL로 한 후 헥산으로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 박층크로마토그래프

비비누화물을 에테르 10 mL에 녹여 시험용액으로 한다.

4.3.2 가스크로마토그래프/질량검출기

비비누화물을 헥산 10 mL에 녹여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 박층크로마토그래프 분석

표 1. 박층크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
흡착제	실리카겔 60F 254
전개용매	헥산·초산에틸·에탄올(10 : 8 : 1)
점적량	5 μ L
발색제	0.1% 로다민B 에탄올 용액

5.2 기기분석

표 2. 가스크로마토그래프/질량검출기 분석(예)

항목	조건
주입부 온도	260℃
컬럼 온도	160℃(2분)-5℃/분-240℃(8분)-30℃/분-320℃(10분)
검출기 온도	250℃
캐리어가스 및 유량	헬륨, 1.5 mL/분
주입량	1 μ L
Split ratio	20 : 1
이온	m/z 113, 253, 283

3-42 옥타코사놀

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 옥타코사놀을 초산에틸로 추출한 후 가스크로마토그래프/불꽃이온화검출기를 이용하여 정성·정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 메스실린더(100 mL)

2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

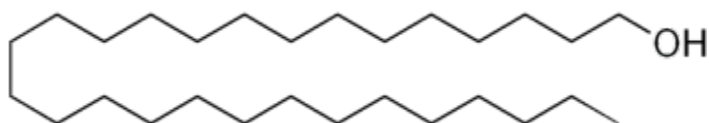
2.2.4 100% dimethylpolysiloxane(안지름 0.32 mm, 길이 50 m, 필름 두께 0.5 μ m thickness) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 옥타코사놀(1-Octacosanol)

분자식 : $C_{28}H_{58}O$, 분자량 : 410.76, CAS No. : 557-61-9



3.2 일반시약

3.2.1 초산에틸(Ethyl acetate)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 옥타코사놀 10 mg을 정밀하게 칭량하고 초산에틸 10 mL에 녹여 표준원액으로 한다.

4.1.2 옥타코사놀 표준원액을 초산에틸로 단계별로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 옥타코사놀로서 약 20~50 mg을 플라스크에 정밀하게 칭량한다.

4.2.2 초산에틸 30 mL를 넣고 60°C 수욕상에서 20분간 추출한다.

4.2.3 실온에서 식힌 다음 50 mL 부피플라스크에 넣은 후 초산에틸로 정용한다.

4.2.4 위의 용액을 초산에틸을 이용하여 적정농도로 단계별 희석한 후 0.45 µm의 멤브레인 필터로 여과한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	260°C
칼럼 온도	180°C(1분)-10°C/분-250°C-300°C(3분)-5°C/분-310°C (1분)
검출기 온도	280°C
캐리어 가스 및 유량	질소, 3.0 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 계산

5.2.1 옥타코사놀 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 옥타코사놀의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

3-43 총(-)-Hydroxycitric acid

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 10 mM 황산용액을 이용하여 시료 중 Hydroxycitric acid를 충분히 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 자외부흡광광도검출기를 이용하여 정성 및 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

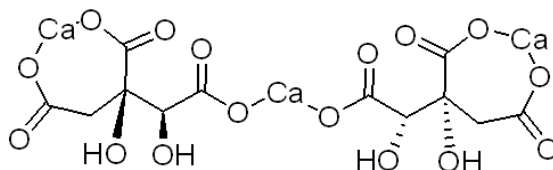
이동상인 10 mM 황산용액을 이용하여 용매를 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

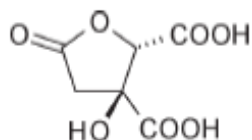
3.1.1 (-)-threo-Hydroxycitric acid calcium

분자식 : $C_{12}H_{10}Ca_3O_{16}$, 분자량 : 530.43



3.1.2 (-)-Hydroxycitric acid lactone

분자식 : $C_6H_6O_7$, 분자량 : 190.11, CAS No. : 27750-13-6



3.2 일반시약

3.2.1 황산(Sulfuric acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 각각의 표준물질 일정량(2 mg/mL)을 정밀하게 달아 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 증류수를 표선까지 채워 완전히 용해한다

4.1.3 이를 증류수로 희석하여 표준용액으로 한다(냉장보관)

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 0.5~1 g을 정밀하게 달아 100 mL부피플라스크에 넣는다

4.2.2 증류수를 표선까지 채워 용해한다

4.2.3 위 용액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
검출기 파장	210 nm
이동상	10 mM 황산용액 (증류수를 사용하여 pH를 2.4로 조절)
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 (-)-Hydroxycitric acid free 함량(mg/g)

$$= A \times (B/S) \times P \times (410.20/530.43) \times (1/1,000)$$

A : 시험용액 중 (-)-Hydroxycitric acid calcium의 농도($\mu\text{g/mL}$)

B : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(g)

P : 표준품의 순도

410.20 : (-)-Hydroxycitric acid free 분자량 $\times 2$

530.43 : (-)-Hydroxycitric acid calcium 분자량

5.2.2 (-)-Hydroxycitric acid lactone 함량(mg/g) = $A \times (B/S) \times P \times (1/1,000)$

A : 시험용액 중 (-)-Hydroxycitric acid lactone의 농도($\mu\text{g/mL}$)

B : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(g)

P : 표준품의 순도

5.2.3 총(-)-Hydroxycitric acid 함량(mg/g) = (-)-Hydroxycitric acid free 함량 + (-)-Hydroxycitric acid lactone 함량

3-44 루테인

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 증류수로 분산시킨 루테인 원료를 에틸아세테이트로 추출하고 에탄올로 희석한 용액을 자외분광광도계 446 nm에서 총 카로티노이드 함량을 구하고 고속액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 446 nm에서 검출하여 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 원심분리관(PP, 50 mL)
- 2.1.2 용량 피펫(30 mL)
- 2.1.3 부피플라스크(갈색, 50 mL)
- 2.1.4 피펫(1000 μ L, 250 μ L)
- 2.1.5 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.6 부피플라스크(100 mL)
- 2.1.7 질소농축기
- 2.1.8 질소가스
- 2.1.9 초음파 추출기
- 2.1.10 Quartz cuvette(3 mL, 1 cm)
- 2.1.11 원심분리기

2.2 분석장비

- 2.2.1 자외분광광도계(UV/Visible Spectrophotometer)
- 2.2.2 고속액체크로마토그래프
- 2.2.3 자외부흡광광도검출기
- 2.2.4 silica 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 silica gel, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
- 2.2.5 컬럼오븐

2.3 분석장비의 준비

이동상은 헥산과 에틸아세테이트를 70:30으로 혼합한 용액을 분당 1.5

mL씩 충분한 시간동안 흘려서 안정화 시킨다.

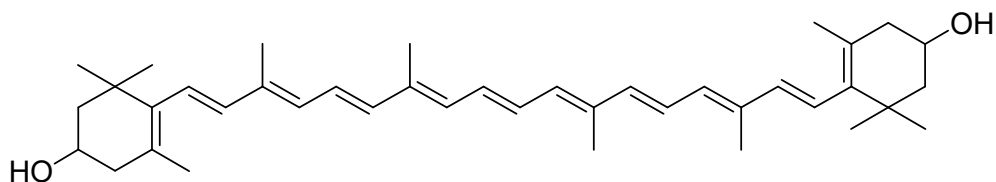
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 루테인(Lutein)

Lutein (3R,3'R,6''R-β,ε-carotene-3,3'-diol, l-trans-lutein, 5'didehydro-5'6'dihydro-beta, beta-carotene-3,3'diol)

분자식 : $C_{40}H_{56}O_2$ 분자량 : 568.871, CAS No. : 127-40-2



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 헥산(Hexane)

3.2.3 염화나트륨(Sodium chloride)

3.2.4 증류수(Water)

3.2.5 에틸아세테이트(Ethyl acetate)

4. 시험과정

4.1 추출용액 제조

4.1.1 아래와 같이 시료를 정밀하게 칭량하여 원심분리관에 옮겨담는다.

※ 루테인 원료 : Lutein 5%, Lutein 10% : 약 30 mg, Lutein 15% : 약 15 mg, 루테인 제품 : 약 70 mg

4.1.2 준비된 원심분리관에 증류수 15 mL을 첨가한다.

4.1.3 30분간 초음파 처리하여 시료를 완전히 분산시킨다.

4.1.4 30 mL 에틸아세테이트를 정용피펫으로 첨가한다.

4.1.5 원심분리관에 염화나트륨 약 3 g을 넣고 마개를 한 후, 진탕하여 추출한다.

4.1.6 2,000 rpm으로 5분간 원심분리한다.

4.1.7 이때 상층액은 주황색임을 확인하고 하층액이 옅은 노랑색 혹은 무색이 되어야 한다. 필요 시 진탕과 원심분리를 다시 반복한다.

4.2 자외분광광도계(UV/Visible Spectrophotometer) 분석

4.2.1 추출용액 중 상층액 1 mL을 취하여 25 mL 에탄올이 채워진 50 mL 정용플라스크에 취하고 이에 에탄올을 가하여 표선까지 채워 희석한다.

4.2.2 이를 20초간 진탕하여 혼합하고 에탄올을 대조액으로 하여 446 nm 에서 그 흡광도를 자외분광광도계로 측정한다.

4.3 액체크로마토그래피 분석

4.3.1 4.1.7의 상층액 250 μ L을 갈색 HPLC 바이알에 옮겨 질소가스를 이용하여 완전히 건조시킨 후 이동상 1 mL을 넣고 마개를 한 후 30초간 초음파로 진탕하여 녹인 후 이를 액체크로마토그래피로 분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	30 $^{\circ}$ C
이동상	헥산:에틸아세테이트 (70:30)
검출기 파장	446 nm
유량	1.5 mL/분
분석시간	25분

5.2 계산

5.2.1 총카로티노이드 함량(%)= $(A \times V_d \times V_e \times 100) / (\alpha \times V_a \times 1 \times m)$

A : 446 nm에서 측정한 흡광도

V_d : 희석용매의 부피(mL) ; 50 mL

V_e : 추출용매의 부피(mL) ; 30 mL

α : 흡광도 계수(255 mL/mg·cm)

※ 1% 루테인 에탄올 용액(10 mg/mL)의 흡광도 : 2550

1 : Quartz cuvette의 규격(1 cm)

Va : 희석 시 사용한 추출용매의 부피(mL) ; 1 mL

m : 검체량(mg)

$$5.2.2 \text{ 루테인 함량(\%)} = \text{총 카로티노이드 함량(\%)} \times (\text{루테인 peak 면적(\%)} / 100)$$

3-45 아스타잔틴

3-45-1 아스타잔틴(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 아세톤으로 녹여 추출하고 cholesterol esterase를 넣어 아스타잔틴에 붙어있는 ester기를 분리시킨 후 정제하여 아세톤으로 녹인 용액을 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 474nm에서 검출하여 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색부피플라스크(25 mL, 100 mL, 200 mL)

2.1.2 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터

2.1.5 원심분리기

2.1.6 원심분리관(15 mL)

2.1.7 초음파진탕기

2.1.8 항온수조

2.1.9 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 자외분광광도계(UV/Visible Spectrophotometer)

2.2.2 고속액체크로마토그래프

2.2.3 자외부흡광광도검출기

2.2.4 YMC Carotenoid 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자 크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

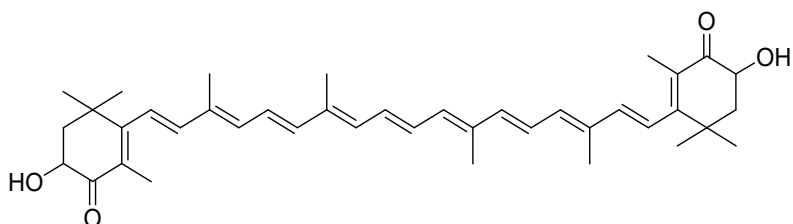
3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 아스타잔틴(Astaxanthin)

Astaxanthin(3,3'-Dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione)

분자식 : $C_{40}H_{52}O_4$, 분자량 : 596.84, CAS No. : 19044-06-5



3.2 일반시약

- 3.2.1 Cholesterol esterase
- 3.2.2 아세톤(Acetone)
- 3.2.3 석유 에테르(petroleum ether)
- 3.2.4 메탄올(Methanol)
- 3.2.5 MTBE(t-buthylmethylether)
- 3.2.6 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)
- 3.2.7 황산나트륨(Sodium sulfate decahydrate)
- 3.2.8 인산(Phosphoric acid)
- 3.2.9 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)

4. 시험과정

4.1 Cholesterol esterase 용액의 조제(사용직전에 조제)

- 4.1.1 Cholesterol esterase가 4 unit/mL이 되도록 50 mM Tris-HCl 완충액(pH7.0)에 용해 시킨다.

4.2 내부표준용액의 조제

- 4.2.1 내부표준용액(trans- β -apo-8'-Carotenal) 1 mg/mL 농도의 용액 7.5 mL를 200 mL 갈색부피플라스크에 정밀히 취한다.
- 4.2.2 아세톤 100 mL를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 방냉한다.
- 4.2.3 아세톤을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.3 표준원액의 조제

- 4.3.1 아스타잔틴 표준품 5 mg을 200 mL 갈색부피플라스크에 정밀히 취한다.
- 4.3.2 100 mL의 아세톤을 넣고 10분간 초음파 처리하여 용해 후

방냉한다.

4.3.3 아세톤을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.4 표준용액 농도산출을 위한 시험

4.4.1 25 mL 갈색부피플라스크에 표준 원액 1.5 mL 3.0 mL, 3.6 mL를 정밀히 취한다.

4.4.2 아세톤을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.4.3 4.4.2용액을 아세톤을 대조액으로 하여 474 nm에서 흡광도를 측정한다.

4.5 HPLC 측정을 위한 표준용액 조제

4.5.1 25 mL 갈색부피플라스크에 표준원액 1.5 mL 3.0 mL, 3.6 mL를 정밀히 취한다.

4.5.2 내부표준용액 10 mL를 넣는다.

4.5.3 아세톤을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.6 시험용액의 조제

4.6.1 시료를 60~70°C 수욕 상에서 가온하여 시료를 용해시킨다.

(시료가 응고되어 있거나 침전물 발생시)

4.6.2 용해된 시료(아스타잔틴으로서) 약 2~5 mg을 100 mL 갈색부피 플라스크에 정밀히 취한다.

4.6.3 아세톤 50 mL를 넣어 완전히 용해시킨 후 표선까지 맞춘다

4.6.4 4.6.3용액을 아세톤으로 10배 희석한 것을 시험용액으로 한다.

4.6.5 15 mL 원심분리관에 시험용액 3 mL 내부표준용액 1 mL, Cholesterol esterase 용액 3 mL를 넣는다.

4.6.6 37°C 수욕상에서 5~15분마다 흔들어주면서 45분간 반응시킨다.

4.6.7 효소 분해 후 황산나트륨 1 g과 석유 에테르 4 mL를 첨가한다.

4.6.8 위 용액을 30초간 혼합 후 2,000 × g로 3분간 원심 분리한다.

4.6.9 석유에테르층을 취한 것에 무수황산나트륨 1 g을 넣어 탈수한다.

4.6.10 탈수된 석유 에테르층을 감압 농축하여 건조 후 아세톤 3 mL를 넣어 초음파 처리하여 용해시킨다.

4.6.11 위 용액을 0.45μm 멤브레인필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
칼럼온도	25°C
이동상	A : 메탄올, B : MTBE, C : 1% 인산용액
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	474 nm

표 2. 이동상 조건(예)

시간	A용액 (%)	B용액 (%)	C용액 (%)
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
27.1	81	15	4
35	81	15	4

5.2 계산

5.2.1 아스타잔틴의 농도(μ g/mL) = (474 nm흡광도 \times 10,000)/2,100

2,100 : 474 nm에서 1 cm cuvette의 1% 아스타잔틴의 기준 흡광도값

5.2.2 내부표준물질 대비 아스타잔틴 이성질체 RT

(이성질체의 상대머무름시간 = 각 아스타잔틴 이성체의 머무름시간/ 내부표준물질 머무름시간)

아스타잔틴의 이성질체명	상대머무름시간
13-cis 아스타잔틴	0.545
trans 아스타잔틴	0.606
9-cis 아스타잔틴	0.800

$$5.2.3 \text{ 면적비} = (P_{\text{trans}} + (1.3 \times P_{13\text{-cis}}) + (1.1 \times P_{9\text{-cis}})) / P_{i,s}$$

P_{trans} : trans 아스타잔틴의 피크면적

$P_{13\text{-cis}}$: 13-cis 아스타잔틴의 피크면적

$P_{9\text{-cis}}$: 9-cis 아스타잔틴의 피크면적

1.3 : 13-cis를 trans 아스타잔틴으로 전환계수

1.1 : 9-cis를 trans 아스타잔틴으로 전환계수

$$5.2.4 \text{ 아스타잔틴의 함량(\%)} = C \times \frac{a}{S} \times b \times \frac{100}{1,000}$$

C : 시험용액중의 아스타잔틴 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(mg)

3-45-2 아스타잔틴(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 아스타잔틴을 아세톤으로 녹여 추출하고 cholesterol esterase를 넣어 아스타잔틴에 붙어있는 ester기를 분리시킨 후 정제하여 이동상으로 녹인 용액을 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기 및 순상 컬럼을 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수파장인 474 nm에서 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 갈색부피플라스크(100 mL)
- 2.1.2 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.3 용매용 일회용 실린지
- 2.1.4 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.5 원심분리기
- 2.1.6 원심분리관(15 mL)
- 2.1.7 시험관(15 mL)(사용되는 초자는 갈색의 유리기구를 사용한다)
- 2.1.8 초음파진탕기
- 2.1.9 항온수조
- 2.1.10 질소농축기

2.2 분석장비

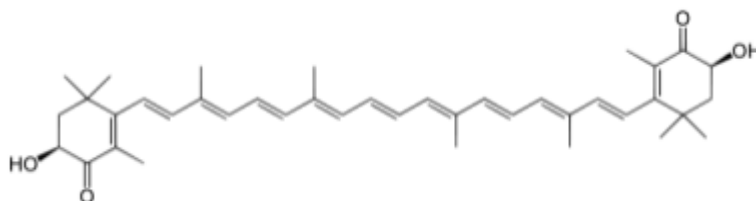
- 2.2.1 자외분광광도계(UV/Visible Spectrophotometer)
- 2.2.2 고속액체크로마토그래프
- 2.2.3 자외부흡광광도 검출기(UV Detector)
- 2.2.4 Silica 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m)
또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 아스타잔틴(Astaxanthin)

분자식 : $C_{40}H_{52}O_4$, 분자량 : 596.84, CAS No. : 19044-06-5



3.2 일반시약

- 3.2.1 헥산(Hexane)
- 3.2.2 클로로포름(Chloroform)
- 3.2.3 아세톤(Acetone)
- 3.2.4 석유 에테르(Petroleum ether)
- 3.2.5 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)
- 3.2.6 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)
- 3.2.7 Cholesterol esterase

4. 시험과정

4.1 Cholesterol esterase 용액의 조제(사용직전에 조제)

- 4.1.1 Cholesterol esterase가 4 unit/mL(1 unit : pH 7.0, 37°C에서 1분당 1 μ mole 콜레스테롤을 만드는데 필요한 효소의 양)이 되도록 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 용해시킨다.

4.2 표준원액의 조제

- 4.2.1 아스타잔틴 표준품 3 mg을 100 mL 갈색부피플라스크에 정밀히 취한다.
- 4.2.2 클로로포름 10 mL를 넣고 녹인다.
- 4.2.3 헥산으로 표선까지 맞춘다.

4.3. 표준용액 조제

- 4.3.1 100 mL 갈색부피플라스크에 표준원액 5, 10, 15 mL를 정밀히 취한다.
- 4.3.2 클로로포름 4 mL를 넣어 녹인다.
- 4.3.3 헥산으로 표선까지 맞춘다.
- 4.3.4 헥산을 대조액으로 하여 474 nm에서 4.3.3 용액의 흡광도를 측정 한다.
- 4.3.5 4.3.3용액을 표준용액으로 하여 고속액체크로마토그래프로

분석한다.

4.4. 시험용액 조제

4.4.1 시료(아스타잔틴으로서) 약 1.5 mg을 100 mL 갈색부피플라스크에 정밀히 취한다.

4.4.2 아세톤 100 mL를 넣어 완전히 용해시킨 후 표선까지 맞춘다.

4.4.3 4.4.2용액을 아세톤으로 5배 희석한 것을 시험용액으로 한다.

4.4.4 원심분리관에 시험용액 3 mL, Cholesterol esterase 용액 3 mL를 넣는다.

4.4.5 37°C 수욕상에서 45분 동안 계속 교반하면서 반응시킨다.

4.4.6 효소 분해 후 무수황산나트륨 1 g과 석유에테르 4 mL를 첨가하여 30초간 혼합한다.

4.4.7 2,000 × g에서 3분간 원심분리하여 석유에테르층을 시험관에 옮긴다.

4.4.8 물층에 석유에테르 4 mL를 가하여 1회 반복 추출하여 석유에테르층을 합한다.

4.4.9 탈수된 석유에테르층을 질소가스를 이용하여 완전히 건조시킨 후, 이동상 3 mL를 넣고 용해시킨다.

4.4.10 위 용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μL
칼럼온도	25°C
이동상	헥산 : 아세톤 (82 : 18)
검출기 파장	474 nm
유속	1.2 mL/분

5.2 계산

5.2.1 아스타잔틴 농도 (ug/mL) = (474 nm 흡광도 × 10,000) / 2,100

2,100 : 474 nm에서 1 cm cuvette 의 1% 아스타잔틴의 기준 흡광도값

5.2.2 아스타잔틴 이성질체 용출 순서

trans 아스타잔틴, 9-cis 아스타잔틴, 13-cis 아스타잔틴 순으로 용출된다.

5.2.3 총 피크면적 = $P_{\text{trans}} + (1.2 \times P_{9\text{-cis}}) + (1.6 \times P_{13\text{-cis}})$

P_{trans} : trans 아스타잔틴의 피크면적

$P_{9\text{-cis}}$: 9-cis 아스타잔틴의 피크면적

$P_{13\text{-cis}}$: 13-cis 아스타잔틴의 피크면적

1.2 : 9-cis를 trans 아스타잔틴으로 전환계수

1.6 : 13-cis를 trans 아스타잔틴으로 전환계수

5.2.4 아스타잔틴 함량(%) = $C \times \frac{a}{S} \times b \times \frac{100}{1,000}$

C : 시험용액중의 아스타잔틴 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(mg)

3-46 카테킨

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 카테킨을 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수파장인 275 nm에서 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL 및 100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

2.2.3 칼럼오븐

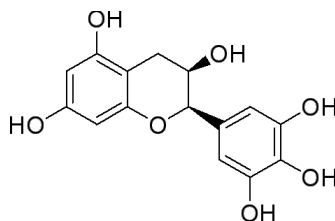
2.2.4 YMC-triart C₁₈(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm)
컬럼 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

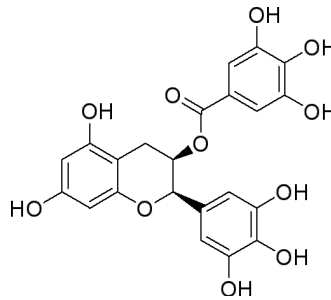
3.1.1 에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin, EGC)

분자식 : C₁₅H₁₄O₇, 분자량 : 306.27, CAS No. : 970-74-1



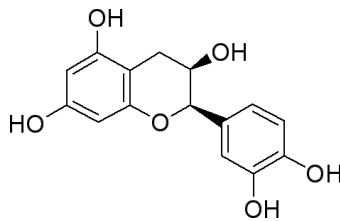
3.1.2 에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin-gallate, EGCG)

분자식 : C₂₂H₁₈O₁₁, 분자량 : 458.37, CAS No. : 989-51-5



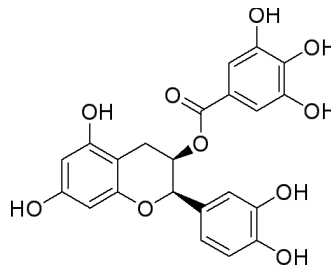
3.1.3 에피카테킨((-)-epicatechin, EC)

분자식 : $C_{15}H_{14}O_6$, 분자량 : 290.27, CAS No. : 490-46-0



3.1.4 에피카테킨갈레이트((-)-epicallocatechin-gallate, ECG)

분자량 : $C_{22}H_{18}O_{10}$, 분자식 : 442.37, CAS No. : 1257-08-5



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.3 인산(Phosphoric acid)

3.2.4 인산이수소칼륨(Potassium phosphate monobasic)

4. 시험과정

4.1 희석용매 조제

4.1.1 20 mM 인산이수소칼륨 용액 : 인산이수소칼륨 2.7 g을 증류수에 녹이고 전량을 1 L가 되게 한다.

4.1.2 20 mM 인산이수소칼륨 용액 700 mL에 메탄올 약 250 mL를 가한 후 인산으로 pH 2.1이 되도록 조정하고 메탄올을 가하여 1 L가 되게 한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 표준물질(EGC, EGCG, EC, ECG) 각각 50 mg씩 50 mL 부피 플라스크에 넣는다.

4.2.2 메탄올을 표선까지 채운다.

4.2.3 희석용매로 적당량 희석하여 표준용액으로 사용한다(표준용액은 사용 시 조제한다)

※ 단, 사용칼럼에 따라 표준물질의 용출 순서가 바뀔 수 있으므로, 분석 전에 각각의 표준물질의 머무름시간을 확인하고 표준용액은 사용 시 조제한다.

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 에피갈로카테킨(EGC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨(EC) 및 에피카테킨갈레이트(ECG)의 합으로서 5~10 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 100 mL 부피플라스크에 달아 희석용매를 가하여 20분간 초음파 추출을 행한다.

4.3.2 실온까지 식힌 후 희석용매로 표선까지 채운 다음, 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한다. 되도록 시험용액은 조제 후 즉시 기기분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기 파장	275 nm
칼럼 온도	35°C
이동상	A : 0.1% 인산용액, B : 0.1% 인산이 함유한 아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	90	10
5	90	10
10	87	13
20	85	15
25	70	30
30	70	30
31	90	10
35	90	10

5.2 계산

5.2.1 개별카테킨(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중 개별카테킨의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

5.2.2 카테킨 함량(mg/g) = $\text{EGC}(\text{mg/g}) + \text{EGCG}(\text{mg/g}) + \text{EC}(\text{mg/g}) + \text{ECG}(\text{mg/g})$

3-47 안트라퀴논계화합물(무수바바로인으로서)

고시 제2023-91호(2023.12.27.), 시행일(2025.1.1.)

< 삭 제 >

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올 및 증류수를 이용하여 안트라퀴논계물질을 추출한 후, hydroxyanthracene 유도체성분으로 분광광도계를 이용하여 분석하는 방법이다. 유도체의 최대 흡수파장인 512 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(200 mL)

2.1.2 환류냉각기

2.1.3 분액여두

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

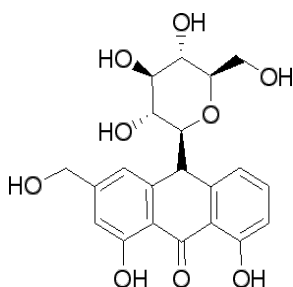
분광광도계는 분석 전에 충분히 안정화시켜둔다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 무수바바로인(Aloin A)

분자식 : $C_{21}H_{22}O_9$, 분자량 : 418.39, CAS No. : 1415-73-2



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 디클로로메탄(Dichloromethane)

3.2.3 염산(Hydrochloric acid)

3.3 시액의 조제

3.3.1 60% 염화제2철용액(Ferric chloride)

3.3.2 1 N 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.3.3 0.5% 메탄올초산마그네슘용액(Magnesium acetate)

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 안트라퀴논계화합물로서 6 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취하여 메탄올 10 mL를 첨가한 후 실온의 증류수 10 mL를 가하여 혼합한다.

4.1.2 이후 증류수 75 mL를 가하여 30분간 진탕한다.

4.1.3 증류수로 200 mL 정용하여 원심분리($2,000 \times g$, 3분)한다.

4.1.4 여액 10 mL를 취하여 60% 염화제2철용액 1 mL와 진한 염산 6 mL가 들어 있는 용기에 가한 후 환류냉각기를 설치하여 끓는 수욕조에서 1 시간 동안 환류시킨다.

4.1.5 이를 식힌 후 분액여두에 옮기고 냉각기 및 수기를 증류수 5 mL로 세척하고 분액여두에 합한다.

4.1.6 이에 1 N 수산화나트륨 4 mL, 디클로로메탄 20 mL를 가해 추출하여 디클로로메탄층을 다른 분액여두에 모은다(충분히 진탕하여 3회 반복).

4.1.7 분취한 디클로로메탄층을 증류수 10 mL로 세척한 다음 디클로로메탄을 이용하여 100 mL로 한다.

4.1.8 이 액 20 mL를 수욕 상에서 증발건조한 후 그 잔류물에 0.5% 메탄올초산마그네슘용액 10 mL를 가하여 용해한 것을 시험용액으로 한다.

4.2 시험조작

4.2.1 메탄올을 대조액으로 하여 512 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 계산

5.1.1 안트라퀴논계물질(무수바바로인으로) 함량(mg/g)

$$= A/240 \times 10 \times 100/20 \times 200/10 \times 1/S \times 10$$

A : 시험용액의 흡광도

S : 시료 채취량(g)

3-48 총 플라보노이드

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 에탄올을 이용하여 시료로부터 플라보노이드계물질을 추출하여 분광광도계를 이용하는 분석법으로, 플라보노이드의 최대 흡수파장인 415 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL, 100 mL)

2.1.2 분액여두

2.1.3 원심분리기

2.1.4 시험관

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

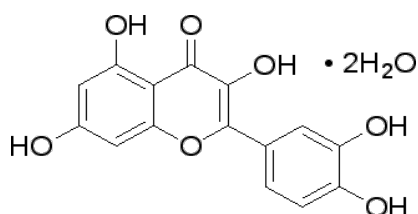
분광광도계는 분석 전에 충분히 안정화시켜둔다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.3 일반시액

3.3.1 10% 질산알루미늄용액(Aluminum nitrate)

질산알루미늄 $\{Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O\}$ 17.6 g을 정확히 달아 증류수로 용해하여 100 mL로 한다.

3.3.2 1 M 초산칼륨액(Potassium acetate, CH_3COOK)

초산칼륨 9.815 g을 정확히 달아 증류수로 용해하여 100 mL로 한다.

3.3.3 80% 에탄올

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 프로폴리스추출물

4.1.1.1 총 플라보노이드로서 2~5 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취하고 80% 에탄올 20 mL를 가하여 용해한다. 과립상, 정제상의 제품은 시료를 충분히 파쇄하여 사용한다. 또한 젤라틴 등을 포함한 제품은 내용물을 꺼내어 사용한다.

4.1.1.2 원심분리(1,600 × g, 10분)를 하여 상층액을 취한다.

4.1.1.3 잔류물에 80% 에탄올 8 mL로 3회 추출한다.

4.1.1.4 전 추출액을 합하여 80% 에탄올을 사용하여 전량을 50 mL로 한다.

4.1.2 프로폴리스추출물이 기능성 원료인 최종제품

4.1.2.1 총 플라보노이드로서 2~5 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취한다.

4.1.2.2 80% 에탄올 20 mL를 가하여 용해시킨다.

4.1.2.3 원심분리(1,600 × g, 10분)하여 상층액을 취한다. 단, 당을 함유한 시료인 경우 시료를 취하여 증류수 10 mL에 용해하고 에탄올 10 mL를 가하여 원심분리(1,600 × g, 10분)한다.

4.1.2.4 잔류물에 80% 에탄올 8 mL를 가하여 3회 추출한다.

4.1.2.5 전 추출액을 합하여 80% 에탄올을 사용하여 전량을 50 mL로 한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 퀘르세틴 이수화물을 무수물로 혼합하여 50 mg을 정확히 달아 50

mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 에탄올을 표선까지 채운다.

4.2.3 에탄올을 가하여 100, 20, 10배로 희석한다(예, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL).

4.3 시험조작

4.3.1 표준용액 및 시험용액을 각각 0.5 mL씩 공시험용과 시험용으로 두개의 시험관에 취한다.

4.3.2 에탄올 1.5 mL, 10% 질산알루미늄용액 0.1 mL, 1 M 초산칼륨 용액 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반한다. 각 농도별 표준물질 및 시료의 공시험은 10% 질산알루미늄 대신 증류수 0.1 mL를 가한다.

4.3.3 실온에서 40분간 정치 후 액층을 10 mm 셀(cell)을 사용하여 물을 대조액으로 하여 415 nm에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 결과 분석

5.1.1 표준물질의 농도별 흡광도와 각 농도별 공시험의 흡광도의 차를 이용하여 표준물질의 검량선을 작성한다.

5.1.2 시료의 흡광도와 시료의 공시험 흡광도의 차를 검량선에 적용시켜 시료 중 총 플라보노이드의 함량을 구한다.

5.2 계산

5.2.1 총 플라보노이드 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액중의 총 플라보노이드 함량(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g 또는 mL)

3-49 파라(p)-쿠마르산(Coumaric acid), 계피산(Cinnamic acid)

3-49-1 파라(p)-쿠마르산(Coumaric acid), 계피산(Cinnamic acid)(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 에탄올을 이용하여 시료 중 파라-쿠마르산 및 계피산을 충분히 추출한 후 액체크로마토그래프/자외분광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 각각 최대 흡수파장인 310 nm와 280 nm에서 정성 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(20 mL)
- 2.1.2 용매용 일회용 실린지
- 2.1.3 여과용 멤브레인 필터(0.45 μ m)
- 2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 자외분광광도검출기
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

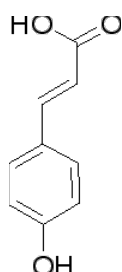
이동상인 0.5% 초산용액과 메탄올을 이용하여 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

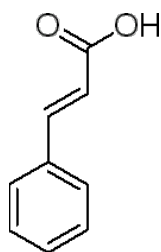
- 3.1.1 파라-쿠마르산(p-coumaric acid, *trans*-4-Hydroxycinnamic acid)

분자식 : $C_9H_8O_3$, 분자량 : 164.16, CAS No. : 501-98-4



3.1.2 계피산(Cinnamic acid, *trans*-3-Phenylacrylic acid)

분자식 : $C_9H_8O_4$, 분자량 : 148.16, CAS No. : 140-10-3



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 메탄올(Methanol)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 파라-쿠마르산용액

4.1.1.1 파라-쿠마르산 100 mg을 정확히 달아 80% 에탄올로 용해한 후 적절히 희석하여 사용한다.

4.1.2 계피산용액

4.1.2.1 계피산 100 mg을 정확히 달아 80% 에탄올로 용해하고 100 mL로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 2 g을 정확히 달아 80% 에탄올로 희석한 후 30분간 초음파 추출하여 20 mL로 한다.

4.2.2 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한다.

※ 단, 필요하면 소량의 물로 용해한 후 99.5% 에탄올을 가하여 전체 용량을 20 mL로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μL
검출기 파장	310 nm(파라-쿠마르산), 280 nm(계피산)
칼럼 온도	40°C
이동상	A : 0.5% 초산용액, B : 메탄올
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	55	45
15	50	50
15.01	0	100
25	0	100
25.01	55	45
35	55	45

5.2 정성시험

5.2.1 시험한 크로마토그램에서 표준 쿠마르산 또는 계피산과의 동일한 머무름시간의 피크를 확인한다.

3-49-2 파라(p)-쿠마르산(Coumaric acid) 확인(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 파라-쿠마르산을 20% 아세토니트릴에 용해한 후 초음파 추출하여, 액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정성 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 시험관

2.1.2 부피 플라스크

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.5 용매용 일회용 실린지

2.1.6 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래피

2.2.2 질량검출기

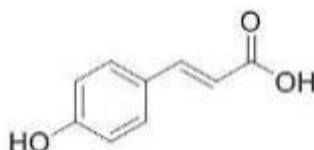
2.2.2.1 옥타데실실릴화한 칼럼(C₁₈, 안지름 2.1 mm, 길이 50 mm, 충전제 octadecyl silica, 충전입자크기 1.7 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 파라-쿠마르산(p-Coumaric acid, *trans*-4-Hydroxycinnamic acid)

분자식 : C₉H₈O₃, 분자량 : 164.16, CAS No. : 501-98-4



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.2 개미산(Formic acid, HPLC grade)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 파라-쿠마르산 5 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 20% 아세토니트릴을 가하여 정용한다.

4.1.2 위의 표준원액을 20% 아세토니트릴로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다(10~300 µg/L).

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 2 g을 시험관에 정확히 달아 20% 아세토니트릴 20 mL로 용해한다.

4.2.2 위의 용액을 30분간 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 20% 아세토니트릴로 적절히 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기

표 1. 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항목	조건
이동상	A용액 : 0.1% 개미산 수용액 B용액 : 0.1% 개미산이 첨가된 아세토니트릴
칼럼온도	40°C
유속	0.3 mL/분
주입량	2 µL
이온화	ESI, Negative
Capillary voltage	1.0 kV
Corn voltage	40 V
Desolvation temperature	350°C
Monitor ions(m/z)	163(precursor ion), 119(fragment ion)

표 2. 고속액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 이동상 조건(예)

시간(분)	이 동 상 (%)	
	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
0.5	80	20
2	20	80
2.5	20	80
2.6	80	20
4	80	20

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 파라-쿠마르산의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{s} \times b \times \frac{1}{1,000}$$

C : 시험용액중의 파라-쿠마르산의 농도(ng/mL)

a : 시험용액 전량(mL)

b : 희석배수

s : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-49-3 계피산(Cinnamic acid) 확인(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 계피산을 20% 아세토니트릴에 용해한 후 초음파 추출하고, 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정성 분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피 플라스크(50 mL)
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.3 용매용 일회용 실린지
- 2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

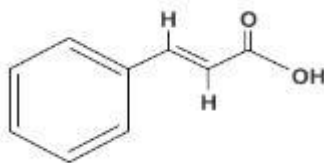
- 2.2.1 액체크로마토그래프
- 2.2.2 질량검출기(Mass Selective Detector)
- 2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전제 octadecyl silica, 충전입자크기 1.7 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 계피산(Cinnamic acid, *trans*-3-Phenylacrylic acid)

분자식 : $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, 분자량 : 148.16, CAS No. : 140-10-3



3.2 일반시약

- 3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 3.2.2 개미산(Formic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 계피산 10 mg을 정밀하게 50 mL 부피플라스크에 취한 후 20% 아세토니트릴을 가하여 정용한 후 이를 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 20% 아세토니트릴로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.(10~500 ng/mL)

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 약 2 g을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취하여 20% 아세토니트릴로 정용한다.

4.2.2 위의 용액을 30분간 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 20% 아세토니트릴로 적절히 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기

표 1. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항목	조건
이동상	A: 0.1 % 개미산용액 B: 0.1 % 개미산을 함유한 아세토니트릴
칼럼온도	40°C
유속	0.3 mL/분
주입량	2 µL
이온화	ESI, Positive
Capillary voltage	3.0 kV
Cone voltage	26 V
Desolvation temperature	350°C
Monitor ions(m/z)	149(precursor ion), 103, 77(product ion)

표 2. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	80	20
0.1	80	20
3	5	95
4	5	95
4.1	80	20
6	80	20

5.2 정성확인

5.2.1 시험한 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)으로 계피산을 확인한다.

3-50 다이드제인 및 제니스테인

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올로 시료를 추출하고, 옥타데실실릴화한 칼럼을 통하여 다이드제인과 제니스테인을 분석하는 방법으로, 다이드제인과 제니스테인의 흡수파장인 260 nm에서 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 삼각플라스크(250 mL)
- 2.1.2 항온수조
- 2.1.3 원심분리기
- 2.1.4 용매용 일회용 실린지
- 2.1.5 여과용 멤브레인 필터(0.45 μ m)
- 2.1.6 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.7 부피플라스크(50 mL)
- 2.1.8 와동(Vortex) 믹서

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

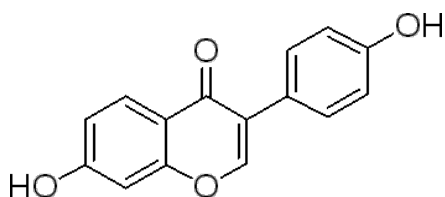
이동상은 2% 초산용액과 2% 초산을 함유한 메탄올을 이용하여 용매를 분당 1.0 mL를 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

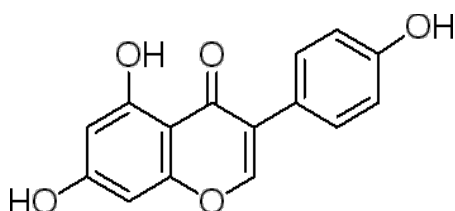
3.1.1 다이드제인(Daidzein)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_4$, 분자량 : 254.24, CAS No. : 486-66-8



3.1.2 Genistein(Genistein)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_5$, 분자량 : 270.24, CAS No. : 446-72-0



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 초산(Acetic acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 각 20 mg을 정밀하게 취한다.

4.1.2 위의 표준물질을 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.3 메탄올을 표선까지 맞춘다(20 mg/50 mL → 400 ppm).

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 10 g을 정밀히 취한다.

4.2.2 위의 시료를 250 mL 삼각플라스크에 넣는다.

4.2.3 여기에 80% 메탄올 40 mL를 넣은 후 호일을 씌운다.

4.2.4 65°C 항온수조에서 2시간 추출한다.

4.2.5 냉각시킨 후 2 M 수산화나트륨용액 3 mL를 넣는다.

4.2.6 이를 상온에서 10분간 회전 교반한 후 빙초산 1 mL를 넣는다.

4.2.7 80% 메탄올을 사용하여 50 mL로 하여 하고 혼합한다.

4.2.8 여액 5 mL에 증류수 4 mL를 넣고 메탄올을 사용하여 10 mL로 한다.

4.2.9 원심분리(5,000 rpm, 5분)한 상징액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
검출기 파장	260 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	A : 2% 초산용액 B : 2% 초산용액이 함유된 메탄올
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	60	40
20	40	60
21	0	100
35	0	100
36	60	40
50	60	40

5.2 다이드제인 및 제니스테인 확인

5.2.1 대두단백 확인

표준용액 중 제니스테인, 다이드제인과 머무름시간이 일치하는 피크가 시험용액 중에서 확인되어야 한다.

3-51 총 모나콜린 K

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 75% 에탄올과 초음파 처리를 이용하여 시료 중 모나콜린 K를 충분히 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석 하는 방법으로 최대 흡수파장인 237 nm에서 정량분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL)

2.1.2 4 mL 바이알

2.1.3 원심분리기

2.1.4 용매용 일회용 실린지

2.1.5 여과용 멤브레인 필터

2.1.6 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

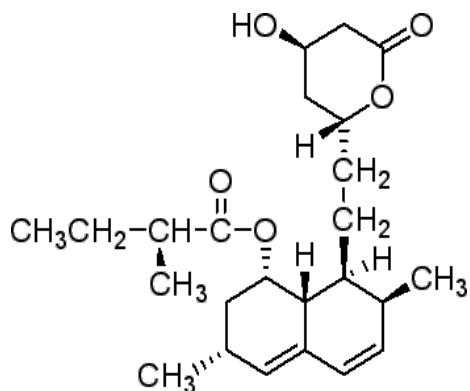
2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자 크기 5 μ m, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

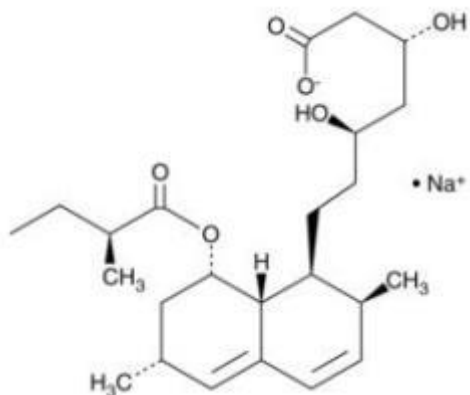
3.1.1 비활성형 모나콜린 K(mevinolin, lovastatin)

분자식 : $C_{24}H_{36}O_5$, 분자량 : 404.54, CAS No. : 75330-75-5



3.1.2 활성형 모나콜린 K(mevinolin sodium salt, lovastatin hydroxy acid sodium salt)

분자식 : $C_{24}H_{37}NaO_6$, 분자량 : 444.54, CAS No. : 75225-50-2



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.3 인산(Phosphoric acid)

3.3 시액

3.3.1 75% 에탄올

3.3.2 0.05 N 수산화나트륨 용액

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 비활성형 모나콜린 K 표준원액

4.1.1.1 표준물질 10 mg을 정밀하게 달아 75% 에탄올 50 mL에 녹인다(200 µg/mL).

4.1.2 활성형 모나콜린 K 표준원액

4.1.2.1 비활성형 모나콜린 K를 표준물질로 사용하는 경우

4.1.2.1.1 비활성형 모나콜린 K 표준물질 10 mg을 정밀하게 달아 75%(v/v) 에탄올 50 mL에 녹인다.

4.1.2.1.2 위의 용액 2 mL를 4 mL 바이알에 취하여 0.05 N 수산화나트륨 용액 0.5 mL와 혼합한다.

4.1.2.1.3 실온에서 최소 30분 방치하여 표준용액으로 사용한다(167 µg/mL).

4.1.2.2 활성형 모나콜린 K를 표준물질로 사용하는 경우

4.1.2.2.1 활성형 모나콜린 K 표준물질 10 mg을 정밀하게 달아 75%(v/v) 에탄올 50 mL에 녹인다(190 µg/mL).

4.1.2.3 활성형 모나콜린 K 표준원액은 4.1.2.1.3 또는 4.1.2.2.1을 선택하여 사용한다.

4.1.3 표준용액

4.1.3.1 비활성형 모나콜린 K 표준원액과 활성형 모나콜린 K 표준원액을 75%(v/v) 에탄올로 적절히 희석하여 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 총모나콜린 K로서 1~4 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 달아 10 mL 원심분리관에 넣고 75%(v/v) 에탄올 10 mL를 넣은 후 1시간 초음파 처리를 한다.

4.2.2 실온으로 냉각한 후 원심분리(1,600 × g, 10분)를 행하여 0.45 µm 멤브레인필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
검출기 파장	237 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	A : 0.2% 인산용액, B : 아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	65	35
20	25	75
21	0	100
35	0	100
36	65	35
50	65	35

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ (비)활성형 모나콜린 } K \text{ (mg/g)} = C \times \frac{a}{S} \times b$$

C : 시험용액 중 (비)활성형 모나콜린 K의 농도(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

$$5.2.2 \text{ 총 모나콜린 } K(\text{mg/g}) = \text{활성형 모나콜린 } K + \text{비활성형 모나콜린 } K$$

3-52 코엔자임Q10

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 코엔자임Q10을 헥산·무수에탄올혼합액으로 용액으로 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 280nm에서 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인필터 및 디스크형 멤브레인필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 부피플라스크

2.1.5 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6mm, 길이 150mm, 충전제 Octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

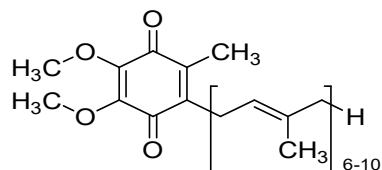
이동상을 이용하여 용매를 분당 1.0 mL를 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 코엔자임Q10(Coenzyme Q10, Ubiquinone, Ubidecarenone)

분자식 : $C_{59}H_{90}O_4$, 분자량 : 863.37, CAS No. : 303-98-0



3.2 일반시약

3.2.1 헥산(n-Hexane)

3.2.2 에탄올(Ethanol)

3.2.3 무수염화제이철(Ferric chloride, anhydrous)

3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.5 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)

3.3 시액의 조제

3.3.1 1% 무수염화제이철용액

무수염화제이철 1 g에 에탄올을 가하여 100 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질인 코엔자임Q10 10 mg을 정밀히 칭량하여 10 mL 부피 플라스크에 넣어 헥산·무수에탄올혼합액(5 : 2)으로 용해한 후 표선 까지 정용한다.

4.1.2 위의 표준원액을 헥산·무수에탄올혼합액(5 : 2)으로 적정농도로 단계별 희석한다.

4.1.3 4.1.2의 희석한 표준원액 10 mL를 취하여 1% 무수염화제이철용액 2.5 mL를 넣은 다음 무수에탄올로 정확하게 25 mL로 하여 표준 용액으로 한다.

4.2 시험용액 제조

4.2.1 시료 약 10 mg(코엔자임Q10으로서)을 정밀히 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 헥산·무수에탄올혼합액(5 : 2)을 넣어 시료가 전부 용해될 때까지 초음파 진탕기로 용해시킨 후 표선까지 정용한다.

4.2.3 이 액 10 mL를 취하여 25 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.4 여기에 1% 무수염화제이철용액 2.5 mL를 넣은 다음 무수에탄올을 넣어 25 mL가 되게 정용한다.

4.2.5 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	아세토니트릴 : 테트라하이드로퓨란 : 물(55 : 40 : 5)
검출기 파장	280 nm
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

$$\text{코엔자임Q10(mg/g)} = C \times (a/S) \times P \times (1/1,000)$$

C : 시험용액 중의 코엔자임Q10 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료채취량(g)

P : 표준품의 순도

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-53 대두이소플라본

3-53-1 이소플라본(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 80% 메탄올을 이용하여 시료 중 이소플라본을 추출하고 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기(최대흡수파장 260 nm) 또는 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용하여 이소플라본 중 배당체 및 비배당체를 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL, 50 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

2.2.1.1 액체크로마토그래프

2.2.1.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

2.2.1.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기

2.2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2.2 질량검출기(Mass Selective Detector)

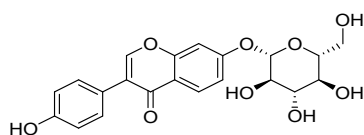
2.2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

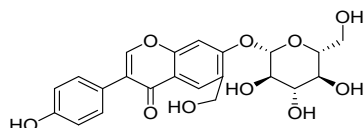
3.1.1 다이드진(Daidzin)

분자식 : $C_{21}H_{20}O_9$, 분자량 : 416.38, CAS No. : 552-66-9



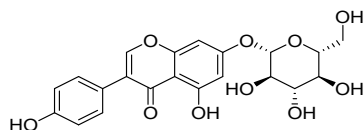
3.1.2. 글리시틴(Glycitin)

분자식 : $C_{22}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 446.41, CAS No. : 40246-10-4



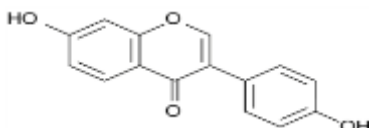
3.1.3. 제니스틴(Genistin)

분자식 : $C_{21}H_{20}O_{10}$, 분자량 : 432.38, CAS No. : 529-59-9



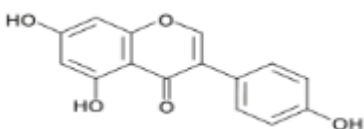
3.1.4. 다이드제인(Daidzein)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_4$, 분자량 : 254.23, CAS No. : 486-66-8



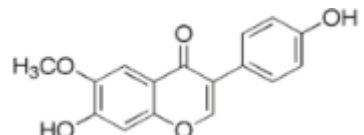
3.1.5. 제니스테인(Genistein)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_5$, 분자량 : 270.24, CAS No. : 446-72-0



3.1.6. 글리시테인(Glycitein)

분자식 : $C_{16}H_{12}O_5$, 분자량 : 284.26, CAS No. : 40957-83-3



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.3 초산(Acetic acid)

3.2.4 디메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide)

3.2.5 개미산(Formic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액 조제

4.1.1 각 이소플라본(Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준물질 50 mg을 정밀히 측정한다.

4.1.2 정밀히 측정한 표준물질을 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.3 배당체(Daidzin, Genistin, Glycitin) 표준품은 메탄올을 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 한다.

4.1.4 비배당체(Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준품은 Dimethylsulfoxide를 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 한다.

4.1.5 위의 용액을 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다(표준용액 농도 범위 0.1~80 µg/mL).

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 분말형제품

4.2.1.1 균질화한 시료 일정량(검량선 내 들어갈 수 있도록)을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취하여 80% 메탄올로 정용한다.

4.2.1.2 30분간 초음파 처리한다.

4.2.1.3 0.45 µm의 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4.2.2 유지형제품

4.2.2.1 균질화한 시료 일정량(검량선 내 들어갈 수 있도록)을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취한다.

4.2.2.2 클로로포름 2 mL을 넣어 충분히 분산시킨다.

4.2.2.3 80% 메탄올로 정용한 후 30분간 초음파 처리한다.

4.2.2.4 0.45 µm의 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	5 μ L
칼럼온도	40°C
이동상	A : 0.1% 초산용액
	B: 0.1% 초산을 함유한 메탄올
	시간(분) 이동상(%)
	A B
	0 80 20
	15 50 50
	25 30 70
	30 80 20
검출기 파장	260 nm
유량	1.0 mL/분

표 2. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항목	조건
주입량	2 μ L
유량	0.3 mL/분
칼럼온도	40°C
이동상	A : 0.1% 개미산용액
	B: 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴
	시간(분) 이동상(%)
	A B
	0 95 5
	5.0 5 95
	5.5 95 5
	6.0 95 5
이온화	ESI, positive
Capillary Voltage	3.5 kV
Source Temp.	120°C
Desolvation Temp.	350°C

표 3. 질량검출기 분석을 위한 이온

성분	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	Cone(V)
Daidzin	417	<u>255</u>	25
Glycitin	447	<u>285</u>	25
Genistin	433	<u>271</u>	30
Daidzein	255	<u>199</u> , 137	30
Glycitein	285	<u>242</u> , 270	50
Genistein	271	<u>153</u> , 149	25

5.2 계산

5.2.1 각 이소플라본(비배당체) 함량(mg/g)= $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중의 각 이소플라본(비배당체) 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

* 이소플라본 배당체일 경우 1/1.6(0.625) 전환계수 적용함

3-53-2 이소플라본(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료에 존재하는 아세틸과 말로닐 이소플라본을 염기성가수 분해하여 아세틸기와 말로닐기가 제거된 이소플라본으로 전환시켜 함께 정량할 수 있는 방법으로, 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기(최대 흡수파장 260 nm) 또는 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용 하여 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL, 50 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

2.2.1.1 액체크로마토그래프

2.2.1.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

2.2.1.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기

2.2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2.2 질량검출기(Mass Selective Detector)

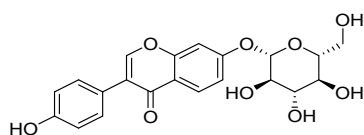
2.2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

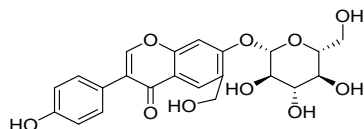
3.1.1 다이드진(Daidzin)

분자식 : $C_{21}H_{20}O_9$, 분자량 : 416.38, CAS No. : 552-66-9



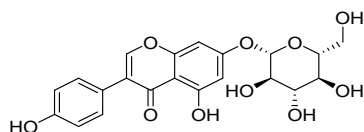
3.1.2. 글리시틴(Glycitin)

분자식 : $C_{22}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 446.41, CAS No. : 40246-10-4



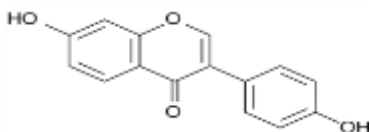
3.1.3. 제니스틴(Genistin)

분자식 : $C_{21}H_{20}O_{10}$, 분자량 : 432.38, CAS No. : 529-59-9



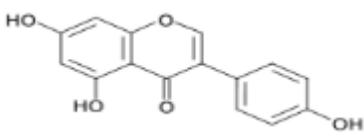
3.1.4. 다이드제인(Daidzein)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_4$, 분자량 : 254.23, CAS No. : 486-66-8



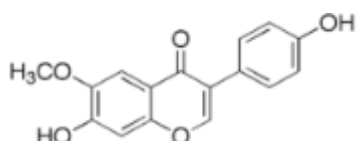
3.1.5. 제니스테인(Genistein)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_5$, 분자량 : 270.24, CAS No. : 446-72-0



3.1.6. 글리시테인(Glycitein)

분자식 : $C_{16}H_{12}O_5$, 분자량 : 284.26, CAS No. : 40957-83-3



3.2 일반시약

- 3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- 3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 3.2.3 초산(Acetic acid)
- 3.2.4 디메틸설폭시드(Dimethylsulfoxide)
- 3.2.5 개미산(Formic acid)
- 3.2.6 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 각 이소플라본(Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준물질 50 mg을 정밀히 측정한다.
- 4.1.2 정밀히 측정한 표준물질을 50 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.3 배당체(Daidzin, Genistin, Glycitin) 표준품은 메탄올을 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 한다.
- 4.1.4 비배당체(Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준품은 Dimethyl sulfoxide를 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 한다.
- 4.1.5 위의 용액을 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다(표준용액 농도 범위 0.1~80 µg/mL).

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 분말형제품

- 4.2.1.1 균질화한 시료 일정량(검량선 내 들어갈 수 있도록)을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취한다.
- 4.2.1.2 80% 메탄올 40 mL를 넣은 후 30분간 초음파 추출한다.
- 4.2.1.3 2M 수산화나트륨용액 3 mL를 넣고 상온에서 10분간 회전 교반한다.
- 4.2.1.4 초산 1 mL를 넣고 80% 메탄올을 사용하여 50 mL로 정용한다.

4.2.1.5 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4.2.2 유지형제품

4.2.2.1 균질화한 시료 일정량(검량선 내 들어갈 수 있도록)을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취한다.

4.2.2.2 클로로포름 2 mL을 넣어 충분히 분산시킨다.

4.2.2.3 80% 메탄올 40 mL를 넣은 후 30분간 초음파 추출한다.

4.2.2.4 2M 수산화나트륨용액 3 mL를 넣고 상온에서 10분간 회전 교반한다.

4.2.2.5 초산 1 mL를 넣고 80% 메탄올을 사용하여 50 mL로 정용한다.

4.2.2.6 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건		
주입량	5 μ L		
칼럼온도	40°C		
이동상	A : 0.1% 초산용액		
	B: 0.1% 초산을 함유한 메탄올		
	시간(분)	이동상(%)	
		A	B
	0	80	20
	15	50	50
	25	30	70
	30	80	20
검출기 파장	260 nm		
유량	1.0 mL/분		

표 2. 액체 크로마토그래프/질량분석기/질량분석기 조건(예)

항목	조건
주입량	2 μ L
유량	0.3 mL/분
칼럼온도	40°C
	A : 0.1% 개미산용액 B: 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴
이동상	시간(분) — 이동상(%)
	A B
	0 95 5
	5.0 5 95
	5.5 95 5
	6.0 95 5
이온화	ESI, positive
Capillary Voltage	3.5 kV
Source Temp.	120°C
Desolvation Temp.	350°C

표 3. 질량검출기 분석을 위한 이온

성분	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)
Daidzin	417	<u>255</u>
Glycitin	447	<u>285</u>
Genistin	433	<u>271</u>
Daidzein	255	<u>199</u> , 137
Glycitein	285	<u>242</u> , 270
Genistein	271	<u>153</u> , 149

5.2 계산

5.2.1 각 이소플라본(비배당체) 함량(mg/g)= $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중의 각 이소플라본(비배당체) 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

* 이소플라본 배당체일 경우 1/1.6(0.625) 전환계수 적용함

3-54 진세노사이드

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 증류수 및 유기용매를 이용하여 시료로부터 진세노사이드 성분을 추출한 후 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기 또는 액체크로마토 그래프/질량분석기/질량분석기를 이용하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(20 mL 및 50 mL)

2.1.2 원심분리기

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.5 C₁₈ 카트리지(6cc, 1,000 mg) 또는 이와 동등한 것

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.2.1 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전 입자크기 5 µm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.2.3 질량분석기

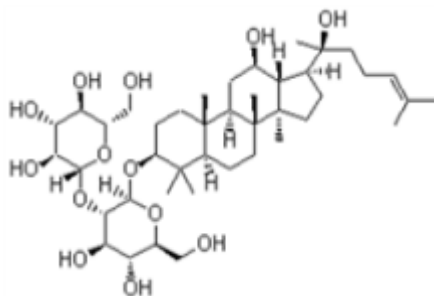
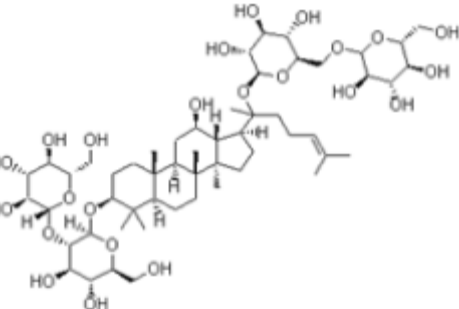
2.2.3.1 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전 입자크기 1.7 µm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 진세노사이드 Rb1(ginsenoside Rb1)

분자식 : C₅₄H₉₂O₂₃, 분자량 : 1,109.29, CAS No. : 41753-43-9



4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(S)를 각각 50 mg씩 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 소량의 70%(v/v) 메탄올을 넣어 완전히 녹인 후 동일 용액으로 정용 하여 표준원액으로 한다(1 mg/mL).

4.1.3 70%(v/v) 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액을 만든다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 분말시료 및 농축액 분말의 시료

4.2.1.1 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3 합으로서 약 6 mg에 해당하는 시료를 취하여 50 mL 원심분리관에 취한다.

4.2.1.2 70%(v/v) 메탄올 25 mL를 넣은 다음 15분간 진탕 후 동일 용액으로 정용한다.

4.2.1.3 4°C에서 $1,600 \times g$ 로 10분간 원심분리 하여 상등액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과 후 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

4.2.2 농축액

4.2.2.1 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3 합으로서 약 6 mg에 해당하는 시료를 취하여 50 mL 부피 플라스크에 취한다.

4.2.2.2 70%(v/v) 메탄올 약 25 mL로 완전히 용해시키고 동일용액으로 정용한 후 멤브레인 필터(0.45 μm)로 여과한 것을 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

4.2.3 인삼·홍삼성분함유제품

4.2.3.1 시료 3~4 g을 정밀히 달아 70%(v/v) 메탄올 50 mL에 완전히 용해시킨다.

4.2.3.2 여과(0.45 μm)하고 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

4.2.4 젤리시료제품

4.2.4.1 잘게 분쇄한 시료를 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3 합으로서 약 0.6~0.8 mg 취하여 분액여두에 넣고 헥산 100 mL 및 70% 메탄올 100 mL를 가하여 3시간동안 진탕 추출한다.

4.2.4.2 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 다음 하층을 환저플라스크에 취하여 수욕 중에서 감압농축한다.

4.2.4.3 농축물을 70%(v/v) 메탄올 10 mL에 용해한 후 여과(0.45 μm)

하고 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

4.2.5 지용성물질이 포함된 시료

4.2.5.1 시료 3~4 g을 분액여두에 취하고 헥산 100 mL 및 70%(v/v) 메탄올 100 mL를 가하여 3시간 동안 진탕 추출한다.

4.2.5.2 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 다음 하층을 환저 플라스크에 취하여 수욕 중에서 감압농축하고 농축물을 70%(v/v) 메탄올 10 mL에 용해한 후 여과(0.45 μ m)하고 적절히 희석하여 시험 용액으로 한다.

4.3 정제

4.3.1 C₁₈ 카트리지에 메탄올 5 mL와 증류수 10 mL를 연속으로 통과시켜 활성화시킨 후 시험용액 5 mL를 흡착시킨다.

4.3.2 카트리지(4.3.1)에 25 mL의 증류수와 25%(v/v) 메탄올 10 mL로 세척(분당 2~3 mL)한 후 메탄올 4 mL로 용출한다.

4.3.3 용출액은 5 mL 부피플라스크에 모으고 메탄올로 표선까지 정용한 것을 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

※ 시료에 부형제 등이 포함되어 정제 과정이 더 필요한 경우 진행한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 액체크로마토그래프 측정 조건

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기 파장	203 nm
칼럼 온도	30°C
이동상	A : 증류수, B : 아세트니트릴
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A 용액	B 용액
0	80	20
5	80	20
20	77	23
25	70	30
45	60	40
55	50	50
65	50	50
70	80	20
75	80	20

5.1.2 액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기 측정 조건

표 3. 고속액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기 조건(예)

항목	조건
주입량	1 μ L
유속	0.3 mL/분
칼럼온도	40°C
이동상	A : 증류수, B : 아세트니트릴
이온화	ESI, Negative
Monitor ions (m/z)	Rg1: 799(precursor ion), 161, 475, 637(product ion) Rb1: 1,107(precursor ion), 179(product ion) Rg3: 783(precursor ion), 101, 161, 621(product ion)

표 4. 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A 용액	B 용액
0	80	20
0.1	80	20
12	20	80
13	0	100
13.1	80	20
15	80	20

5.2 계산

5.2.1 진세노사이드 Rb1(또는 Rg1, Rg3) 함량(mg/g) = $C \times \frac{a}{S} \times b \times \frac{1}{1,000}$

C : 시험용액중의 개별 진세노사이드의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료무게(g)

$\frac{1}{1,000}$: 단위 환산 계수

3-55 총 엽록소

3-55-1 총 엽록소(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 엽록소를 알칼리성 피리딘을 이용하여 충분히 추출하여 비색법으로 분석하는 방법으로, 최대 흡광파장인 419 nm와 454 nm에서 총 엽록소를 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 공전시험관

2.1.2 원심분리관

2.1.3 원심분리기

2.1.4 갈색부피플라스크(10 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

분석 전 분광광도계를 충분히 안정화시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 일반시약

3.1.1 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.1.2 피리딘(Pyridine)

3.2 시액의 조제

3.2.1 알칼리성피리딘 용액

수산화나트륨 1.4 g을 증류수 40~60 mL에 용해하고 피리딘 16.6 g을 가한 다음 증류수를 가하여 100 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 시료 약 5~10 mg(클로렐라 건조물로서)을 차광한 공전시험관에 취하여 증류수 10 mL를 가하고 때때로 흔들며 주면서 30분간 방치한다.

4.1.2 현탁액 2 mL를 취하여 원심분리관에 넣고 알칼리성 피리딘용액 5 mL를 가하여 혼합한다.

4.1.3 알루미늄호일로 차광하여 60℃ 수욕상에서 혼합하여 주며 15분간 방치한다.

4.1.4 원심분리(3,000 rpm, 3분)한다.

4.1.5 상층액을 10 mL의 갈색메스플라스크에 옮겨 차가운 곳에 보관한다.

4.1.6 잔사는 알칼리성 피리딘용액 3 mL를 가하여 4.1.3~4.1.4과정을 실시한다.

4.1.7 상층액은 [4.1.5]과 합하여 최종 10 mL가 되도록 한다.

4.2 시험조작

4.2.1 시험용액을 알칼리성피리딘용액으로 대조하여 액층 1 cm, 파장 419 nm와 454 nm에서 흡광도를 측정한다(단, 알칼리성피리딘용액을 가한 후 1시간 이내에 조작을 끝낸다).

5. 분석 및 계산

5.1 계산

5.1.1 엽록소(mg/100g) = $C/S \times 100$

C : 엽록소(mg/L) = $8.970 \times (7.19 E_{419nm} + 3.33 E_{454nm})$

S : 용액 2 mL에 함유된 시료의 양(mg)

3-55-2 총 엽록소(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 85% 아세톤을 이용하여 엽록소를 충분히 추출하여 비색법으로 분석하는 방법으로, 최대 흡광파장인 660 nm와 642.5 nm에서 총 엽록소를 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색플라스크(125 mL 또는 250 mL)

2.1.2 3G-2 유리여과기

2.1.3 유리봉

2.1.4 갈색분액여두

2.1.5 여과지

2.2 분석장비

2.2.1 분광광도계

2.3 분석장비의 준비

분석 전 분광광도계를 충분히 안정화시킨다.

3. 일반시약 및 시액

3.1 일반시약

3.1.1 아세톤(Acetone)

3.1.2 에틸에테르(Ethyl ether)

3.1.3 황산나트륨(Sodium sulfate)

3.2 시액의 조제

3.2.1 85% 아세톤

아세톤 85 mL에 증류수를 가하여 100 mL로 한다.

3.2.2 5% 황산나트륨

황산나트륨 5 g에 증류수를 가하여 100 mL로 한다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

- 4.1.1 총엽록소 약 7 mg에 해당하는 시료를 갈색플라스크에 정밀히 달아 넣는다.
- 4.1.2 85% 아세톤 50 mL를 가하고 해사 일정량을 추가하여 분쇄한 후 냉암소에서 하룻밤 방치한다.
- 4.1.3 추출액은 3G-2 유리여과기를 사용하여 여과한다.
- 4.1.4 잔류물은 85% 아세톤 25 mL를 가하여 10분간 유리병으로 저어 다시 여과한다.
- 4.1.5 아세톤액이 착색되지 않을 때까지 반복 조작하여 액을 합하고, 아세톤을 가하여 최종 여액이 200 mL가 되도록 한다.
- 4.1.6 이 액 20 mL를 갈색분액여두에 취하여 에틸에테르 50 mL 및 5% 황산나트륨 50 mL를 가해 완만히 진탕한 후 에틸에테르가스를 방출한 후 1분간 더 진탕한다.
- 4.1.7 정치 후 물층(하층)을 분리하여 여기에 에틸에테르 10 mL를 가하여 추출한다(2회 반복).
- 4.1.8 에틸에테르 층을 합하여 5% 황산나트륨용액 50 mL로 3회 세척한다.
- 4.1.9 세척된 에틸에테르층은 무수황산나트륨을 통과 탈수시켜 여과한다.
- 4.1.10 분액여두 및 여과지를 에틸에테르로 씻어 먼저 액에 합한다.
- 4.1.11 이에 에틸에테르를 가해 100 mL로 한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 분석

- 5.1.1 에틸에테르를 대조액으로 액층 1 cm, 파장 642.5 nm와 660 nm에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

- 5.2.1 총엽록소 함량(mg/g) = $C \times 1/1,000 \times 200/S \times 100/20$

C : 총엽록소($\mu\text{g/mL}$) = $7.12E_{660\text{nm}} + 16.8 E_{642.5\text{nm}}$

S : 시료 채취량(g)

3-56 총 페오포르바이드

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 인산완충용액 및 아세톤 등을 이용하여 충분히 페오포르바이드를 추출하여 비색법으로 분석하는 방법으로, 최대 흡수파장인 667 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 분액여두
- 2.1.2 원심분리관
- 2.1.3 원심분리기
- 2.1.4 항온수조
- 2.1.5 막자사발

2.2 분석장비

- 2.2.1 분광광도계

3. 일반시약 및 일반시액

3.1 일반시약

- 3.1.1 아세톤(Acetone)
- 3.1.2 에틸에테르(Ethyl ether)
- 3.1.3 염산(Hydrochloric acid)
- 3.1.4 황산나트륨(Sodium sulfate)

3.2 시액의 조제

3.2.1 1/15 M 인산완충용액

1/15 M potassium diphosphate(KH_2PO_4 , M.W. 130.90)를 1/15 M dipotassium phosphate(K_2HPO_4 , M.W. 174.18)에 넣어 pH 8.0으로 맞춘다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

- 4.1.1 시료 100 mg(클로렐라 건조물로서)을 정밀히 달아 차가운 1/15 M 인산 완충용액(pH 8.0) : 아세톤 혼합(7 : 3) 10 mL를 가하고 37°C에서 3시간 항온시킨다.
- 4.1.2 10% 염산으로 약산성화(약 pH 5)하고 막자사발에 넣어 약 0.5 g 해사 및 85%(v/v) 아세톤 20 mL를 가하여 마쇄한다.
- 4.1.3 상등액을 원심분리관으로 옮기고, 잔사에 색이 최대한 빠지도록 85%(v/v) 아세톤 10 mL를 첨가하여 마쇄 과정을 2회 반복한다.
- 4.1.4 상등액을 모두 합하여 원심분리(1,600 × g, 5분)한 후, 에틸에테르 30 mL를 넣은 분액여두로 옮긴다.
- 4.1.5 에틸에테르와 아세톤 혼합액에 5% 황산나트륨용액 50 mL를 가하여 약하게 흔든 후, 황산나트륨층을 버린다(3회 반복).
- 4.1.6 무수황산나트륨을 가하여 탈수한 후 에틸에테르층을 취한 다음, 에틸에테르를 가해 전량을 50 mL로 하여 이를 색소원액으로 한다.
- 4.1.7 색소원액 중 20 mL를 취하여 17% 염산 20 mL를 넣고 흔들어 추출한 후 염산층을 취한다.
- 4.1.8 이후 17% 염산 10 mL를 넣고 한 번 더 흔들어 추출한 후 염산층을 모은다.
- 4.1.9 모은 염산층에 포화황산나트륨 용액 150 mL와 에틸에테르 20 mL를 넣고 흔들어 추출한다.
- 4.1.10 에틸에테르층을 분취하고 전량을 20 mL로 한 것을 시험용액으로 한다.
- 4.1.11 에틸에테르를 대조액으로 하여 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 분석

- 5.1.1 에틸에테르를 사용하여 시험용액을 필요한 농도로 정확하게 희석하여 667 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 총페오포르바이드(mg/kg)} = \frac{A}{70.2} \times \frac{1,000}{S} \times 50 \times D$$

A : 흡광도

70.2 : 페오포르바이드의 667 nm 비흡광계수(0.1% 용액 1cm)

S : 시료 채취량(g)

D : 희석배수

3-57 유산균수

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료에 함유된 유산균을 MRS 배지 또는 BL 배지를 사용하여 배양하는 방법으로 배양 후 유산균의 집락을 계수한다.

2. 기기와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 고압멸균기(Autoclave)
- 2.1.2 고압멸균가능 병
- 2.1.3 무균대(Clean bench)
- 2.1.4 도말봉(Spreader, 스프레더)
- 2.1.5 마개 있는 시험관
- 2.1.6 소독용 알콜 램프
- 2.1.7 항온배양기(Incubator)

3. 일반시약 및 일반시액

3.1 일반시약

- 3.1.1 에탄올(Ethanol)

3.2 시액 및 배지의 조제

3.2.1 멸균생리식염수(Saline)

- 3.2.1.1 Sodium Chloride 8.5 g에 증류수를 가하여 1,000 mL로 하고 121°C로 멸균한다.

3.2.2 펩톤식염완충액(Buffered Peptone Water)

- 3.2.2.1 Peptone 10 g, Sodium Chloride 5 g, Disodium Phosphate 3.5 g, Mono-potassium Phosphate 1.5 g을 증류수 1,000 mL에 가하여 pH를 7.2 ± 0.2 로 조정한 후 121°C에서 15분간 고압 멸균한다.

3.2.3 MRS 배지

- 3.2.3.1 Enzyme Digest of Casein 10 g, Meat Extract 10 g, Yeast Extract 4 g, Glucose 20 g, Polysorbate 80(Tween 80),

Triammonium Citrate 2 g, Sodium Acetate 5 g, Magnesium Sulfate 7H₂O 0.2 g, Manganese Sulfate 4H₂O 0.05 g, Dipotassium hydrogen Phosphate 2 g, Agar 15 g을 증류수 1,000 mL에 녹이고 pH를 5.7±0.1로 조정한 후 121°C에서 15분간 멸균한다.

3.2.4 BL 한천배지(BL Agar)

3.2.4.1 Beef Extract 3 g, Liver Extract 5 g, Yeast Extract 5 g, Proteose Peptone 10 g, Tryptone 5 g, Soypeptone 3 g, Soluble Starch 0.5 g, Glucose 10 g, Dipotassium Phosphate 1 g, Monopotassium Phosphate 1 g, Magnesium Sulfate 0.2g, Sodium Chloride 0.01g, Manganese Sulfate 0.00674 g, L-Cysteine·HCl·H₂O 0.5 g, Ferrous Sulfate 0.01 g, Polysorbate 80(Tween 80) 1 g, Agar 15 g을 증류수 1,000 mL에 녹이고 pH를 7.2로 조정한 후 121°C에서 15분간 멸균하여, 50°C로 냉각 후 소, 말, 양 또는 사람의 탈섬유소 혈액을 5%가 되도록 첨가한다 (BL 한천배지 사용도 무관함).

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 액상시료

4.1.1.1 채취된 시료를 강하게 진탕하여 혼합한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.2 반유동상시료

4.1.2.1 채취된 시료를 멸균유리봉과 멸균스파테르 등으로 잘 혼합한다.

4.1.2.2 그 일정량(10~25 mL)을 멸균용기에 취해 9배 양의 희석액과 혼합한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.3 고체시료

4.1.3.1 채취된 시료의 일정량(10~25 g)을 멸균된 가위와 칼 등으로 잘게 자른다.

4.1.3.2 희석액을 가해 균질기를 이용해서 가능한 한 저온으로 균질화한다.

4.1.3.3 여기에 희석액을 가해서 일정량(100~250 mL)으로 한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.4 분말상시료

4.1.4.1 시료를 멸균유리봉과 멸균스파테르 등으로 잘 혼합한다.

4.1.4.2 그 일정량(10 g)을 멸균용기에 취해 9배 양의 희석액과 혼합한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.5 캡슐제품류

4.1.5.1 캡슐을 포함하여 시료의 일정량(10~25 g)을 취한다.

4.1.5.2 9배 양의 희석액을 가해 균질기와 스토마커 등을 이용하여 균질화한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.6 냉동제품

4.1.6.1 냉동상태의 시료를 포장된 상태 그대로 40°C이하에서 될 수 있는 대로 단시간에 녹여 용기, 포장의 표면을 70% 알코올 솜으로 잘 닦은 후 상기 4.1.1~4.1.5의 방법으로 시험용액을 조제한다.

4.1.7 시험용액조제 시 주의사항

4.1.7.1 시험용액 제조 희석액은 멸균생리식염수 또는 펩톤식염완충액을 사용한다.

4.1.7.2 위와 같이 조제된 시험원액에 대해서는 희석액 9 mL에 시험원액 1 mL를 취하여 10배 희석액으로 만든다.

4.1.7.3 필요에 따라 100배, 1,000배 등 단계별 희석용액을 만들어 사용 할 수 있다.

4.1.7.4 시험용액의 조제 시 시료를 용기 포장한 대로 채취할 때에는 그 외부를 물로 씻고 자연 건조시킨 다음 마개 및 그 하부 5~10 cm의 부근까지 70% 알코올 탈지면으로 닦고, 화염멸균한 후 냉각하고 멸균한 기구로 개봉 또는 개관하여 2차 오염을 방지하여야 한다. 지방분이 많은 시료의 경우는 Polysorbate 80(Tween 80)과 같은 세균에 독성이 없는 계면활성제를 첨가할 수 있다.

4.1.7.5 실험을 실시하기 직전에 잘 균질화 하고 검사시료에 따라 시험용액을 조제한다.

4.2 시험의 조작

- 4.2.1 유산균수 측정방법은 MRS 배지 또는 BL 한천배지를 사용하여 유산균의 집락을 계수한다.
- 4.2.2 시료 10~25 g(mL)에 9배 희석액을 가하여 100~250 mL이 되게 하고 균질화한다(10^{-1} 용액).
- 4.2.3 시험용액(10^{-1} 용액) 1 mL에 희석액을 가하여 10 mL이 되게 하여 10^{-2} 시험용액을 만든 후 동일하게 조작하여 희석한다.
- 4.2.4 BL 한천배지 시험 조작
 - 4.2.4.1 각 희석 시험용액 0.1 mL씩을 BL 한천배지 2매 이상에 접종하며 멸균초자봉으로 도말한다. 시료가 접종된 페트리접시(Petridish)는 35~37°C에서 48~72±3시간 혐기배양한다. 배양 후 생성된 집락수를 측정하고 희석배수를 곱하여 검사 시료 g당 균수를 산출한다(접종량도 희석배수에 고려해야 한다).
- 4.2.5 MRS 배지 시험 조작
 - 4.2.5.1 각 단계별 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시(Petridish) 2매 이상씩에 무균적으로 취한다.
 - 4.2.5.2 약 43~45°C로 유지한 MRS 배지 약 15 mL을 무균적으로 분주한다.
 - 4.2.5.3 페트리접시(Petridish) 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 조용히 회전하여 좌우로 기울이면서 시료와 배지를 잘 섞고 냉각 응고시킨다. 단, 시료를 취하여 배지를 가할 때까지의 시간은 20분 이상 경과하여서는 안 된다.
 - 4.2.5.4 냉각 응고시킨 페트리접시(Petridish)는 거꾸로 하여 35~37°C에서 48~72±3시간 혐기배양한다.
 - 4.2.5.5 배양 후 생성된 집락수를 측정한다.
- 4.2.6 집락수 산정
 - 4.2.6.1 배양 후 즉시 생성된 집락수를 계산한다. 단, 부득이할 경우에는 5°C에 보존시켜 24시간 이내에 산정한다.
 - 4.2.6.2 집락수의 계산은 확산집락이 없고(전면의 1/2이하 일 때에는 지장이 없음) 1평판 당 30~300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하는 것을 원칙으로 한다. 전 평판에 300개 이상 집락이 발생한 경우 300에 가까운 평판에 대하여 밀집평판 측정법에 따라 안지름 9 cm의 페트리접시

(Petridish)인 경우에는 1 cm²내의 평균집락수에 65를 곱하여 그 평판의 집락수로 계산한다. 전 평판에 30개 이하의 집락만을 얻었을 경우에는 가장 희석배수가 얇은 것을 측정한다.

4.2.7 유산균수의 기재보고

4.2.7.1 시료 1 mL 중의 유산균수를 기재 또는 보고할 경우에 그것이 어떤 제한된 것에서 발육한 집락을 측정한 수치인 것을 명확히 하기 위하여 1평판에 있어서의 집락수는 상당 희석배수로 곱하고 1 mL 중(1 g 중)의 유산균수 몇 개라고 기재보고하며 동시에 배양온도를 기록한다. 숫자는 앞에서부터 두 번째 자리 숫자까지 유효숫자로 하며 세 번째 자리숫자에서 반올림하여 그 이하를 0으로 한다.

3-58 유산간·구균 및 비피더스균

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 유산간·구균과 비피더스균을 구분하여 산정해야 하는 경우에 한하며, 유산간·구균은 BCP첨가 평판측정용배지를 사용하고 비피더스균은 TOS-MUP 배지를 사용한 시험방법에 따라 시험한 후 산출한다.

2. 기구와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 고압멸균기(Autoclave)
- 2.1.2 고압멸균가능병
- 2.1.3 무균대(Clean bench)
- 2.1.4 도말봉(Spreader, 스프레더)
- 2.1.5 마개 있는 시험관
- 2.1.6 소독용 알콜 램프
- 2.1.7 항온배양기(Incubator)

3. 일반시약 및 일반시액

3.1 일반시약

- 3.1.1 에탄올(Ethanol)

3.2 시액 및 배지의 조제

3.2.1 멸균생리식염수(Saline)

- 3.2.1.1 Sodium chloride 8.5 g에 증류수를 가하여 1,000 mL로 하고 121°C로 멸균한다.

3.2.2 펩톤식염완충액(Buffered peptone water)

- 3.2.2.1 Peptone 10 g, Sodium chloride 5 g, Disodium phosphate 3.5 g, Mono-potassium phosphate 1.5 g을 증류수 1,000 mL에 가하여 pH를 7.2±0.2로 조정한 후 121°C에서 15분간 고압 멸균한다.

3.2.3 BCP첨가 평판측정용 한천배지(Plate Count Agar with Brom Cresol Purple)

3.2.3.1 Yeast extract 2.5 g, Peptone 5.0 g, Dextrose 1.0 g, Polysorbate 80(Tween 80) 1.0 g, L-Cysteine 0.1 g, Agar 15.0 g(다만, 종균에 따라 적정 peptone을 사용하여야 함)을 증류수 1,000 mL에 녹여 pH 6.8~7.0으로 조정한 후 BCP (Brom cresol purple)을 0.004~0.006%가 되도록 가한다.

3.2.3.2 121°C에서 15분간 멸균한다.

3.2.4 TOS-MUP 배지

3.2.4.1 Trypticase peptone 10 g, Yeast extract 1 g, KH_2PO_4 3 g, K_2HPO_4 4.8 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, Magnesium sulfate $7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, (R)-Cysteine-HCL· H_2O 0.5 g, Sodium propionate 15 g, TOS(Galactooligosaccharide) 10 g, Agar 15 g를 증류수 950 mL에 녹이고 pH를 6.3 ± 0.2 로 조정한 후 115°C 에서 15분간 멸균하여 50°C정도로 식힌 다음 MUP(mupirocin) supplement(1 mg/mL)를 주사필터($0.22 \mu\text{m}$)한 후 50 mL을 위의 배지에 첨가한다.

4. 시험과정

4.1 시험용액의 조제

4.1.1 액상시료

4.1.1.1 채취된 시료를 강하게 진탕하여 혼합한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.2 반유동상시료

4.1.2.1 채취된 시료를 멸균유리봉과 멸균스파테르 등으로 잘 혼합한다.

4.1.2.2 그 일정량(10~25 mL)을 멸균용기에 취해 9배 양의 희석액과 혼합한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.3 고체시료

4.1.3.1 채취된 시료의 일정량(10~25 g)을 멸균된 가위와 칼 등으로 잘게 자른다.

4.1.3.2 희석액을 가해 균질기를 이용해서 가능한 한 저온으로 균질화한다.

4.1.3.3 여기에 희석액을 가해서 일정량(100~250 mL)으로 한 것을

시험용액으로 한다.

4.1.4 분말상시료

4.1.4.1 시료를 멸균유리봉과 멸균스파테르 등으로 잘 혼합한다.

4.1.4.2 그 일정량(10 g)을 멸균용기에 취해 9배 양의 희석액과 혼합한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.5 캡슐제품류

4.1.5.1 캡슐을 포함하여 시료의 일정량(10~25 g)을 취한다.

4.1.5.2 9배 양의 멸균생리식염수를 가해 균질기와 스토마커 등을 이용하여 균질화한 것을 시험용액으로 한다.

4.1.6 냉동제품

4.1.6.1 냉동상태의 시료를 포장된 상태 그대로 40°C이하에서 될 수 있는 대로 단시간에 녹여 용기, 포장의 표면을 70% 알코올 솜으로 잘 닦은 후 상기 4.1.1~4.1.5의 방법으로 시험용액을 조제한다.

4.1.7 시험용액조제 시 주의사항

4.1.7.1 시험용액 제조 희석액은 멸균생리식염수 또는 펩톤식염완충액을 사용한다.

4.1.7.2 위와 같이 조제된 시험원액에 대해서는 희석액 9 mL에 시험원액 1 mL를 취하여 10배 희석액으로 만든다.

4.1.7.3 필요에 따라 100배, 1,000배 등 단계별 희석용액을 만들어 사용할 수 있다.

4.1.7.4 시험용액의 조제 시 시료를 용기 포장한 대로 채취할 때에는 그 외부를 물로 씻고 자연 건조시킨 다음 마개 및 그 하부 5~10 cm의 부근까지 70% 알코올 탈지면으로 닦고, 화염멸균한 후 냉각하고 멸균한 기구로 개봉 또는 개관하여 2차 오염을 방지 하여야 한다. 지방분이 많은 시료의 경우는 Polysorbate 80 (Tween 80)과 같은 세균에 독성이 없는 계면활성제를 첨가할 수 있다.

4.1.7.5 실험을 실시하기 직전에 잘 균질화 하고 검사시료에 따라 시험용액을 조제한다.

4.2 시험의 조작

4.2.1 BCP첨가 평판측정용 배지를 사용한 경우

4.2.1.1 3-58 유산균수 MRS 배지에 준하여 시험하고 35~37°C에서

48~72±3시간 호기 또는 혐기 배양한 후 발생한 황색의
집락을 유산균으로 계수한다.

4.2.2 TOS-MUP 배지를 사용한 경우

4.2.2.1 3-58 유산균수 MRS 배지에 준하여 시험하고, 35~37°C에서
48~72±3시간 혐기 배양한다.

4.2.2.2 모든 시험에서는 시험용액을 가하지 아니한 동일 희석액 0.1
mL을 대조시험액으로 하여 시험조작의 무균여부를 확인한다.

4.2.3 집락수의 산정

4.2.3.1 3-58 유산균수의 4.2.6 집락수 산정에 따라 산정한다.

4.2.4 유산균의 기재보고

4.2.4.1 3-58 유산균수의 4.2.7 유산균의 기재보고에 따라 산정한다.

3-59 총 폴리페놀

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 총 폴리페놀 함량을 구하는 방법으로 시료를 증류수에 용해하고 초음파 추출한 후 발색시약과 반응시켜 분광광도계를 사용하여 파장 760 nm에서 측정한 후, 비타민 C 함량을 제외한 값으로 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL)

2.1.2 시험관

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 초음파 진탕기

2.2 분석장비

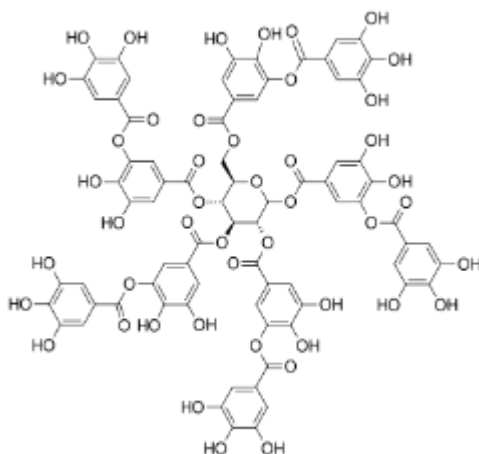
2.2.1 자외분광광도계(UV/Visible Spectrophotometer)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 탄닌산(Tannic acid)

분자식 : $C_{76}H_{52}O_{46}$, 분자량 : 1701.2, CAS No. : 1401-55-4



3.2 일반시약

3.2.1 폴린데니스 시약(Folin-Denis Reagent) 또는 폴린시오칼토 시약(Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent)

3.3 시약의 제조

3.3.1 35% 탄산나트륨 용액(Sodium carbonate anhydrous)

탄산나트륨 35 g을 정밀히 달아 증류수 100 mL을 넣고 70°C에서 녹여 상온에 방치한 후 과포화된 용액에 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 결정이 생기면 유리솜(glass wool)으로 여과한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 탄닌산 10 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 증류수를 가하여 정용한다.

4.1.2 위의 표준원액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 탄닌산으로 5~10 mg에 상당한 양을 취하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 증류수를 소량 가한다.

4.2.2 30분 동안 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 증류수로 50 mL 정용한 후 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

4.2.4 증류수 7.5 mL를 시험관에 각각 취한다.

4.2.5 4.2.4의 시험관에 각각 표준용액, 시험용액 및 증류수(공시험용)를 1 mL씩 취한다.

4.2.6 4.2.5의 각 시험관에 Folin-Denis 또는 Folin-Ciocalteu's 시약 0.5 mL을 가한 후 35% 탄산나트륨 1 mL을 넣어 혼합한다.

4.2.7 암소에서 30분 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정한다.

5. 분석 및 계산

5.1 결과 분석

5.1.1 표준물질의 농도별 흡광도와 공시험 흡광도의 차를 이용하여 표준물질의 검량선을 작성한다.

5.1.2 시료의 흡광도와 공시험 흡광도의 차를 이용하여 정량한다.

5.1.3 비타민 C가 총 폴리페놀 함량에 간섭하는 양을 보정하기 위해 시료 중 비타민 C의 함량을 「건강기능식품의 기준 및 규격」 중 제 4. 건강기능식품시험법 3-14 비타민 C(제3법)에 따라 미리 분석한다.

5.2 비타민 C 간섭보정계수 설정

5.2.1 시료 중 비타민 C가 총 폴리페놀 함량에 간섭하는 양을 보정하기 위해 순수한 비타민 C를 일정량(mg)(5.1.3에서 분석한 값과 근접한 값) 취한다.

5.2.2 4.2.1에서 4.2.7까지의 과정을 동일하게 수행한다.

5.2.3 흡광도로 측정한 비타민 C의 실험값을 이론값으로 나누어 비타민 C 간섭 보정계수를 설정한다.

5.3 계산

5.3.1 총 폴리페놀의 함량(탄닌산으로서)(mg/g) = $[C \times (a \times b) / S] - (D \times E / F)$

C : 시험용액 중의 탄닌산의 농도(mg/mL)

a : 시험용액 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료무게(g)

D : 5.1.3에서 측정한 비타민 C의 함량(mg/g)

E : 5.2.2에 따라 흡광도법으로 측정한 비타민 C의 함량(mg/g)

F : 5.2.1에서 취한 순수한 비타민 C의 함량(mg/g)

* $\frac{E}{F}$ = 비타민 C 간섭 보정계수

3-60 코로솔산(Corosolic acid)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 코로솔산을 메탄올 용액으로 초음파 추출하여 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 210 nm에서 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL, 100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.5 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래피

2.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode array)

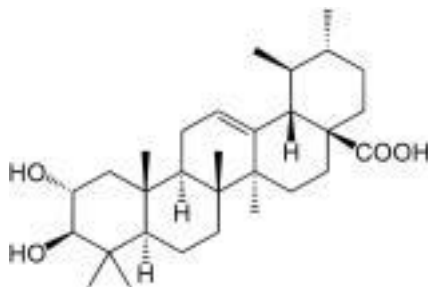
2.2.3 Capcellpak C₁₈ (안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 코로솔산(Corosolic acid)

분자식 : C₃₀H₄₈O₄, 분자량 : 472.7, CAS No. : 4547-24-4



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 인산(Phosphoric acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질인 코로솔산 100 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 부피 플라스크에 넣어 메탄올 50 mL로 용해한다.

4.1.2 60℃에서 1시간 초음파 추출한다.

4.1.3 실온에서 냉각 후 메탄올을 넣어 표선까지 채운다.

4.1.4 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 100~200 mg을 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 넣어 메탄올 45 mL를 가하여 용해한다.

4.1.2 60℃에서 1시간 초음파 추출한다.

4.1.3 실온에서 냉각 후 메탄올을 넣어 표선까지 채운다.

4.1.4 위의 용액을 0.45 μm의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μL
컬럼온도	30℃
이동상	1% 인산 : 아세토니트릴 (30 : 70)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	210 nm

5.2 계산

5.2.1 코로솔산 표준용액의 피크면적으로 검량선을 작성하고, 검량선 식을 이용하여 시험용액 중의 코로솔산 농도를 구한 후 아래 식을 이용하여 함량을 계산한다.

$$\text{코로솔산 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C}{D \times 1000}$$

A : 시험용액중의 코로솔릭산의 농도(mg/mL)

B : 시험용액의 전량(mL)

C : 희석배수

D : 시료 채취량(g 또는 mL)

3-61 플라보놀 배당체(Flavonol glycoside)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 플라보놀 배당체(퀘세틴, 퀘르세틴, 이소람네틴의 합)를 가수 분해시킨 후 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 370 nm에서 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(10 mL, 50 mL)
- 2.1.2 메스실린더(200 mL)
- 2.1.3 삼각플라스크
- 2.1.4 용매용 일회용 실린지
- 2.1.5 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.6 액체크로마토그래피용 유리병
- 2.1.7 수욕조(water bath)

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래피
- 2.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)
- 2.2.3 Capcellpak C₁₈ UG120 컬럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

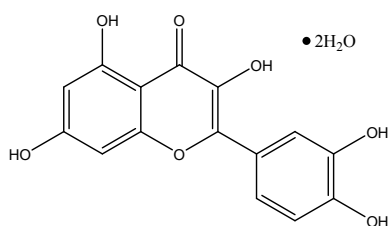
이동상으로서 0.1% 인산을 함유한 아세트니트릴과 0.1% 인산용액을 40 : 60으로 혼합하여 분당 1.0 mL씩 흘려줌으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

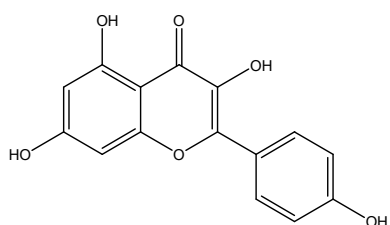
3.1.1 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 : C₁₅H₁₀O₇·2H₂O, 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3



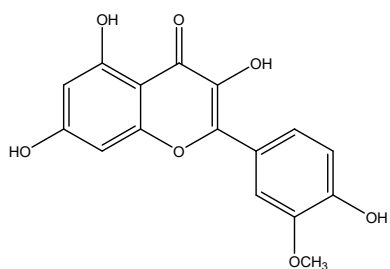
3.1.2 캠페롤(Kaempferol)

분자식 : $C_{15}H_{10}O_6$, 분자량 : 286.24, CAS No. : 520-18-3



3.1.3 이소람네티(Isorhamnetin)

분자식 : $C_{16}H_{12}O_7$, 분자량 : 316.26, CAS No. : 480-19-3



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 인산(Phosphoric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

3.2.4 염산(Hydrochloric acid)

3.2.5 에탄올(Ethanol)

4. 시험과정

4.1 희석용액의 조제

4.1.1 희석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)

200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣는다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 퀘르세틴 이수화물 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피 플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다(퀘르세틴 이수화물(mg) \times 302/338 = Quercetin(mg)).

4.2.2 캠페롤 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피 플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다.

4.2.3 이소람네티 25 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피 플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다.

4.2.4 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.3 플라보놀 배당체(캠페롤, 퀘르세틴, 이소람네티) 시험용액 제조

4.3.1 시료 약 300 mg을 칭량하여 가수분해용 삼각플라스크에 취한 후 10 mL 희석용액을 가한다.

4.3.2 90°C 수용상에서 1시간 동안 가수분해한다.

4.3.3 위의 용액을 50 mL 부피 플라스크에 넣은 후 메탄올로 표선까지 맞춘다.

4.3.4 위의 시험용액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건(예)

항 목	조 건
주입량	10 μ L
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	35°C
이동상	0.1% 인산을 함유한 아세토니트릴 : 0.1% 인산용액 = 40 : 60
유속	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 플라보놀 배당체(Flavonol glycosides) 함량은 кем페롤, 퀘르세틴, 이소람네티의 합으로 계산한다.

$$\text{각각의 플라보놀 배당체(Flavonol glycosides) 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A : 시험용액중의 각각의 플라보놀배당체의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

D : 전환 계수(kaempferol= 2.588, quercetin = 2.504,
isorhamnetin = 2.437)

E : 시료무게(g)

3-62 킵콜릭산(Ginkgolic acid)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 킵콜릭산(킵콜릭산 C13:0, C15:1, C17:1의 합)을 50% 에탄올과 클로로포름을 이용하여 2회 추출 후 클로로포름 층을 감압 농축한 것을 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기(최대흡수파장 210 nm) 또는 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정량 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL)

2.1.2 메스실린더(200 mL)

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.5 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.6 분액여두 (100 mL)

2.1.7 진탕기

2.1.8 감압농축기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

2.2.1.1 액체크로마토그래프

2.2.1.2 자외부흡광광도 검출기 또는 포토다이오드어레이 검출기

2.2.1.3 스위칭밸브

2.2.1.4 C8 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 150 mm, 충전입자크기 5 μ m, 전처리 칼럼) 또는 이와 동등한 것

2.2.1.5 C18 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m, 분석칼럼) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기

2.2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2.2 질량검출기

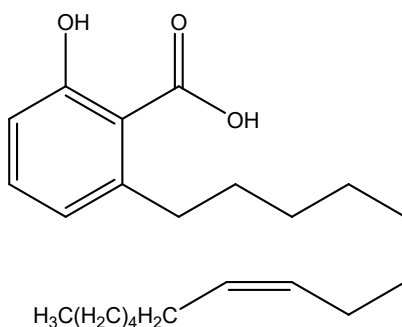
2.2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(C₁₈, 안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전입자크기 1.7 μm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

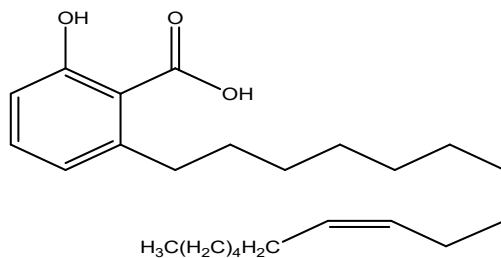
3.1.1 킵콜릭산 C15:1(Ginkgolic acid C15:1)

분자식 : C₂₂H₃₄O₃, 분자량 : 346.50, CAS No. : 22910-60-7



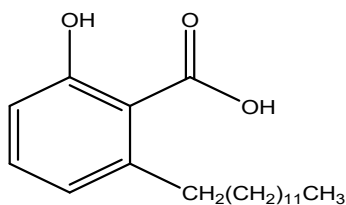
3.1.2 킵콜릭산 C17:1(Ginkgolic acid C17:1)

분자식 : C₂₄H₃₈O₃, 분자량 : 374.56, CAS No. : 111047-30-4



3.1.3 킵콜릭산 C13 : 0(Ginkgolic acid C13:0)

분자식 : C₂₀H₃₂O₃, 분자량 : 320.47, CAS No. : 202617-38-5



3.2 일반시약

- 3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- 3.2.2 클로로포름(Chloroform, HPLC grade)
- 3.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 3.2.4 에탄올(Ethanol, HPLC grade)
- 3.2.5 인산(Phosphoric acid)
- 3.2.6 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 키클리산 C15:1 50 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올로 용해한다.
- 4.1.2 키클리산 C17:1 50 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올로 용해한다.
- 4.1.3 키클리산 C13:0 50 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올로 용해한다.
- 4.1.4 위의 표준원액을 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 제조

- 4.2.1 시료 1 g을 정밀하게 칭량하여 50% 에탄올 10 mL에 용해한 후 분액여두로 옮긴다.
- 4.2.2 분액여두에 클로로포름 50 mL를 가하여 진탕 추출한다.
- 4.2.3 클로로포름층을 별도로 취한 다음 남은 수용액 층에 대해서는 다시 에탄올 10 mL, 클로로포름 50 mL를 넣고 재추출한다.
- 4.2.4 클로로포름층을 모아 감압농축한 후 메탄올 5 mL를 가하여 녹인다.
- 4.2.5 위의 용액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건		
주입량	50 μ L		
검출기 파장	210 nm		
칼럼 온도	40℃		
전처리용매 : 0.1% 인산을 함유한 70% 아세토니트릴 분석용매 : 이동상 A - 0.1% 인산 이동상 B - 아세토니트릴			
이동상	시간(분)	이동상(%)	
		A	B
	0	30	70
	4	30	70
	30	5	95
	32	5	95
	32.1	30	70
	40	30	70
유속	1.0 mL/분		
분석 시간	40 분		

표 2. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항 목	조 건		
주입량	2 μL		
유속	0.53 mL/분		
칼럼온도	40℃		
	A - 0.1% 개미산용액 B - 아세토니트릴		
이동상	시간(분)	이동상(%)	
		A	B
	0	30	70
	0.33	30	70
	5.43	20	80
	8.26	20	80
	8.32	30	70
	10	30	70
이온화	ESI, Negative		
Capillary Voltage	3.5 kV		
Source Temp.	150℃		
Desolvation Temp.	200℃		

표 3. 질량검출기 분석을 위한 이온

성분	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	Cone(V)
Gingkolic Acid C13:0	319	119, 133, <u>275</u>	25
Gingkolic Acid C15:1	345	119, 133, <u>301</u>	25
Gingkolic Acid C17:1	373	119, 133, <u>329</u>	30

5.2 계산

5.2.1 킵콜릭산(Ginkgolic acid C13:0, C15:1, C17:1) 함량(mg/kg) = $C \times (a \times b)/S$

C : 시험용액 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료채취량(g)

3-63 실리마린(Silymarin)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 실리마린의 함량을 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 288 nm에서 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 메스실린더(100 mL)

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.5 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.6 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래피

2.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)

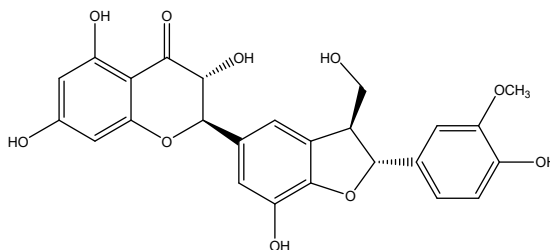
2.2.3 YMC C₁₈ 컬럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

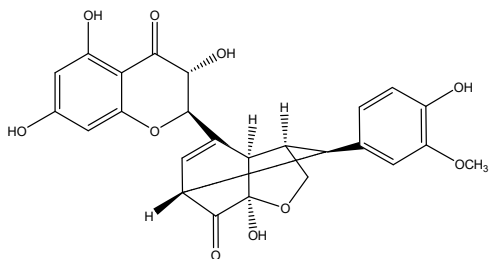
3.1.1 실리크리스틴

분자식 : C₂₅H₂₂O₁₀, 분자량 : 482.44, CAS No. : 33889-69-9



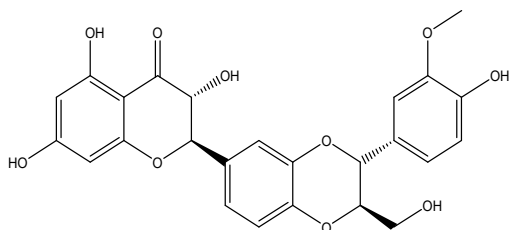
3.1.2 실리디아닌

분자식 : $C_{25}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 482.44, CAS No. : 29782-68-1



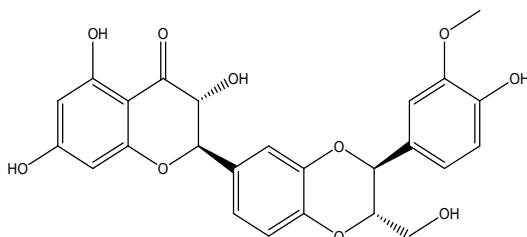
3.1.3 실리빈A

분자식 : $C_{25}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 482.44, CAS No. : 245-302-5



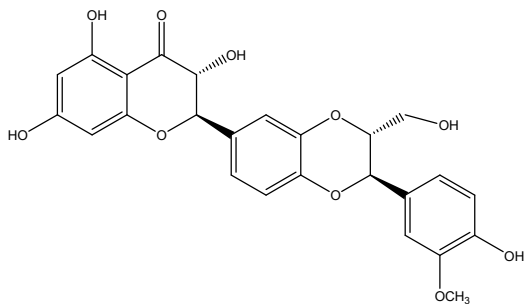
3.1.4 실리빈B

분자식 : $C_{25}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 482.44, CAS No. : 142797-34-0



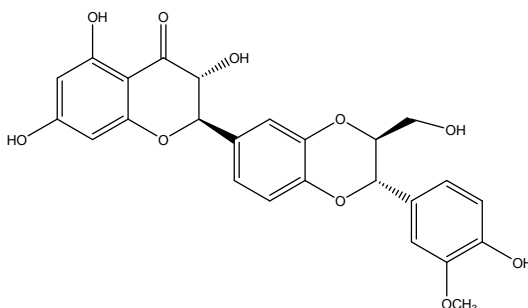
3.1.5 이소실리빈A

분자식 : $C_{25}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 482.44, CAS No. : 142796-21-2



3.1.6 이소실리빈B

분자식 : $C_{25}H_{22}O_{10}$, 분자량 : 482.44, CAS No. : 142796-22-3



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 인산(Phosphoric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 실리빈 표준품 약 10.0 mg을 정밀하게 칭량하고 메탄올 100 mL를 넣어 표준원액으로 사용한다.

4.1.2 실리크리스틴, 실리디아닌, 이소실리빈A, 이소실리빈B 10 mg을 각각 정밀하게 칭량하고 메탄올 100 mL를 넣어 표준원액으로 사용한다.

4.1.3 위의 표준원액을 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 100 mg을 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.2.2 메탄올 90 mL를 넣어 20분 동안 초음파 추출한다.

4.2.3 상온에서 냉각 후 여과하여 메탄올로 100 mL가 되게 정용한다.

4.2.4 위의 용액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건(예)

항 목	조 건
주입량	20 μ L
컬럼온도	35°C
이동상	A: 메탄올 : 증류수 : 인산 (20:80:0.5, v/v/v) B: 메탄올 : 증류수 : 인산 (80:20:0.5, v/v/v)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	288 nm

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	85	15
5	85	15
20	55	45
40	55	45
41	85	15
55	85	15

5.2 계산

5.2.1 각 표준용액으로 실리마린(실리크리스틴, 실리디아닌, 실리빈 A, 실리빈 B, 이소실리빈 A, 이소실리빈 B)의 검량선을 작성한 후, 시험용액 중 각각의 실리마린의 농도를 구한다.

5.2.2 아래의 식을 이용하여 각각의 함량을 계산한 후, 합하여 실리마린의 함량으로 한다.

$$\text{실리마린 함량 mg/g} = \frac{A \times B \times P}{S}$$

A = 시험용액 중의 각 실리마린의 농도 (ug/mL)

B = 시험용액의 전량 (mL)

P = 표준물질의 순도

S = 시료채취량 (mg)

3-64 PGG(Penta-O-galloyl beta-D-glucose)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올을 이용하여 시료 중 PGG을 추출하고 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수 파장인 280 nm에서 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL, 100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 용매용 일회용 실린지

2.1.5 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

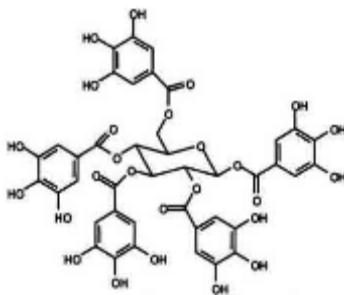
2.2.3 옥타데실실릴화한 컬럼(4.6 x 250 mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 PGG(Penta-O-galloyl beta-D-glucose, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl -b-D-gluco-pyranose)

분자식 : $C_{41}H_{32}O_{26} \cdot xH_2O$, 분자량 : 940.68(anhydrous basis), CAS No. : 14937-32-7



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.3 초산(Acetic acid)

3.2.4 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 PGG 10 mg을 정밀하게 칭량하고 80% 메탄올로 녹여 100 mL로 한 것을 표준원액으로 한다.

4.1.3 위의 표준원액을 80% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 PGG로서 1~4 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 달아 50 mL 부피플라스크에 넣고 80%(v/v) 메탄올 25 mL를 넣는다.

4.2.2 시료가 완전히 추출될 때까지 초음파진탕기로 추출한다.

4.2.3 80% 메탄올로 표선까지 맞춘다.

4.2.4 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	10 μ L
컬럼온도	40°C
이동상	A: 증류수 : 초산 (99.7:0.3, v/v) B: 아세토니트릴 : 증류수 : 초산 (94.7:5:0.3, v/v)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	280 nm

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
initial	85	15
15	80	20
20	50	50
25	50	50
25.1	85	15
30	85	15

5.2 계산

5.2.1 PGG 표준용액의 피크면적으로 검량선을 작성하고, 검량선 식을 이용하여 시험용액 중의 PGG 농도를 구한 후 아래 식을 이용하여 PGG 함량을 계산한다.

$$\text{PGG 함량(mg/g)} = C \times \frac{a}{S} \times b \times \frac{1}{1,000}$$

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

C : 시험용액중의 PGG의 농도($\mu\text{g/mL}$)

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-65 포스파티딜세린

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 지용성 물질인 포스파티딜세린 화합물을 선택적으로 분리하여 분석하는 방법으로 고속액체크로마토그래피/광산란검출기를 이용하여 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL, 100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.5 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래피

2.2.2 광산란검출기(ELSD)

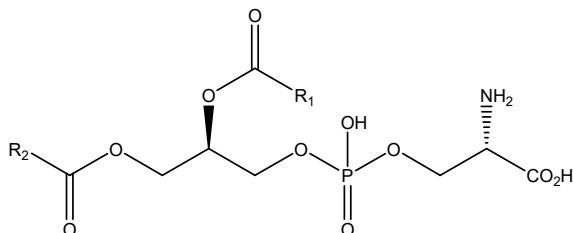
2.2.3 Lichrospher diol 컬럼(4.0×125mm, Merck) 또는 ZIC-HILIC 컬럼(3.5×150mm, Merck) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 포스파티딜세린(L- α -diacyl phosphatidylserine)

분자식 : $C_{13}H_{12}NO_{10}P$, 분자량 : 385.303, CAS No. : 8002-43-5



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

- 3.2.2 클로로포름(Chloroform, HPLC grade)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 헥산(Hexane, HPLC grade)
- 3.2.5 이소프로판올(Isopropanol, HPLC grade)
- 3.2.6 아세트산(Acetic acid)
- 3.2.7 트리에틸아민(Triethylamine)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 포스파티딜세린 표준품(L- α -diacylphosphatidylserine) 약 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.2 클로로포름 : 메탄올(92:1, v/v) 혼합용액 10 mL를 넣어 초음파 추출한 후 표선까지 채운다.
- 4.1.3 위의 표준원액을 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

- 4.2.1 포스파티딜세린으로서 3~7 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취하여 50 mL 부피플라스크에 넣고 클로로포름 : 메탄올(92 : 1, v/v) 혼합 용액(단, 클로로포름과 메탄올 또는 이동상 A와 이동상 B의 혼합 비율을 조절하여 혼합용액으로 사용가능)을 넣어 용해한 후 초음파 추출하여 표선까지 채운다.
- 4.2.2 위의 용액을 여과용 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	20 μ L
컬럼온도	40°C
이동상	A: Hexane : IPA : Aectic acid : Triethylamine (2000:425:37.5:2, v/v/v/v)
	B: IPA : Water : Aectic acid : Triethylamine (2110:350:37.5:2, v/v/v/v)

항 목	조 건
유속	1.0 mL/분
광산란 검출기	Drift tube Temp. : 90℃
	Nebulizer gas flow rate : 1.9 mL/min

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
initial	95	5
5	95	5
15	70	30
18	20	80
19	95	5
30	95	5

5.2 계산

5.2.1 포스파티딜세린 표준용액의 피크면적으로 검량선을 작성하고, 검량선 식을 이용하여 시험용액 중의 포스파티딜세린 농도를 구한 후 아래 식을 이용하여 포스파티딜세린 함량을 계산한다.

$$\text{포스파티딜세린의 함량 (mg/g)} = \frac{A \times B \times P}{S}$$

A : 시험용액 중의 포스파티딜세린의 농도 (μg/mL)

B : 시험용액의 전량 (mL)

P : 표준물질의 순도

S : 시료채취량 (mg)

3-66 테아닌(L-theanine)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 카테킨의 전구물질인 L-테아닌을 선택적으로 분리하여 분석하는 방법으로 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.5 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)

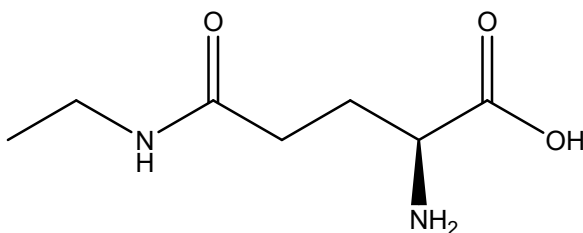
2.2.3 C₁₈ 컬럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 L-테아닌 (L-theanine)

분자식 : C₇H₁₄O₃, 분자량 : 174.2, CAS No. : 3081-61-6



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.2 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 L-테아닌 표준품 약 100 mg을 정밀하게 칭량하고 증류수를 가하여 100 mL로 한 것을 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 증류수로 적정농도 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 테아닌으로서 20~40 mg에 해당하는 시료를 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣고 증류수 100 mL로 녹인 다음 초음파 추출한다.

4.2.2 위의 용액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	10 μ L
검출기 파장	203 nm
컬럼온도	35°C
유속	1.0 mL/min

이동상

A : 증류수 B : 아세토니트릴

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0.0	98	2
10.0	98	2
10.1	20	80
15.0	20	80
15.1	98	2
20.0	98	2

5.2 계산

5.2.1 L-테아닌 표준용액의 피크면적으로 검량선을 작성하고, 검량선식을 이용하여 시험용액 중의 L-테아닌 농도를 구한 후 아래식을 이용하여 L-테아닌 함량을 계산한다.

$$\text{L-테아닌(mg/g)} = \frac{C \times a \times P}{S}$$

C : 시험용액 중의 L-테아닌의 농도 (mg/mL)

a : 시험용액의 전량 (mL)

P : 표준물질의 순도

S : 시료채취량 (g)

3-67 엠에스엠(MSM)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올을 이용하여 시료 중 엠에스엠을 추출하고 가스크로마토 그래피/불꽃이온화검출기를 이용하여 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL, 1000 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래피

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

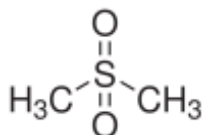
2.2.3 100% dimethylpolysiloxane (길이 30 m, 안지름 0.32 μ m, 필름 두께 0.25 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 엠에스엠(Methylsulfonylmethane, Methyl sulfone)

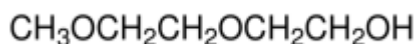
분자식 : $C_2H_6O_2S$, 분자량 : 94.13, CAS No. : 67-71-0



3.2 내부표준물질

3.2.1 디에틸렌글리콜메틸에테르(Diethylene glycol methyl ether)

분자식 : $C_5H_{12}O_3$, 분자량 : 120.15, CAS No.: 111-77-3



3.3 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

4. 시험과정

4.1 내부표준용액의 조제

4.1.1 디에틸렌글리콜디메틸에테르를 메탄올에 녹여 20 mg/mL이 되도록 한다.

4.2 표준용액의 조제

4.2.1 표준물질 엠에스엠 100 mg을 정밀하게 칭량하고 메탄올 100 mL에 녹여 표준원액으로 한다.

4.2.2 위의 표준원액을 100 mL 부피플라스크에 적절히 취하고 내부표준용액 1 mL씩 가한 후 메탄올로 표선까지 맞춘 것을 표준용액으로 사용한다.

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 디메틸설폰으로서 10~20 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 달아 100 mL 부피플라스크 넣고 내부표준용액 1.0 mL 가하여 메탄올 50 mL를 넣는다.

4.3.2 시료가 완전히 추출될 때까지 50 °C에서 초음파진탕기로 추출한다.

4.3.3 실온으로 식히고 메탄올로 표선까지 맞춘다.

4.3.4 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래피 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250 °C
칼럼 온도	60 °C(4분)→(8 °C/분)→120 °C→220 °C
검출기 온도	300 °C
캐리어 가스 및 유량	질소, 1.0 mL/분
주입량	1 µL
Split ratio	25 : 1

5.2 계산

엠에스엠(MSM) 함량(mg/g) = $ST_c \times (SA/ST) \times (ST_{is}/SA_{is}) \times V/S$

ST_c : 표준용액중의 엠에스엠의 농도(mg/mL)

SA : 시험용액내 표준물질의 피크면적

ST : 표준물질의 피크면적

ST_{is} : 표준물질용액내 내부표준물질 피크면적

SA_{is} : 시험용액내 내부표준물질 피크면적

V : 최종희석용액(mL)

S : 시료 채취량(g)

3-68 폴리감마글루탐산

3-68-1 폴리글루탐산(제1법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 폴리감마글루탐산을 산으로 가수분해한 후 아미노산 자동분석기 또는 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정량 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크 (50 mL, 100 mL)

2.1.2 시험관 (4 mL, 40 mL)

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터

2.1.5 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.6 건조기(Dry oven)

2.1.7 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 아미노산 자동분석기

2.2.1.1 이온 교환 칼럼으로 HR NA 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 200 mm, 유리아미노산 분석용) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 고속액체크로마토그래피

2.2.2.1 질량검출기 (Mass Selective Detector)

2.2.2.2 옥타데실실릴화한 칼럼 (C₁₈, 안지름 2.1 mm, 길이 50 mm, 충전입자크기 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

아미노산 자동분석기를 사용하는 경우, 완충액, 발색시약의 유무, 칼럼항온조의 온도를 점검하고, 자동완충액 전환기구 및 정유량 펌프, 유량을 소정의 조건에 따라 설정하고 측정을 실시한다.

2.3.1 아미노산 자동분석기 관련 시약

2.3.1.1 님히드린시약(Ninhydrin reagent, 기기조건에 적합한 용액으로
조제하여 사용)

2.3.1.2 구연산리튬완충액(Lithium citrate buffer, 기기조건에 적합한
용액으로 조제하여 사용)

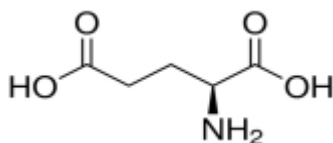
2.3.1.3 완충액(기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용)

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 L-글루탐산(L-glutamic acid)

분자식 : $C_5H_9NO_4$, 분자량 : 147.13, CAS No. : 56-86-0



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 개미산(Formic acid, HPLC grade)

3.2.3 염산(Hydrochloric acid, HPLC grade)

3.2.4 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol, HPLC grade)

3.2.5 증류수

3.3 시액의 제조

3.3.1 6 N 염산

3.3.2 0.02 N 염산

3.3.3 0.05% 2-머캅토에탄올 함유 6 N 염산

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

4.1.1 L-글루탐산 표준품 10 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피
플라스크에 취한 후 0.02 N 염산을 가하여 정용한다.

4.1.2 위의 표준원액을 0.02 N 염산으로 적절히 희석하여 표준용액으로
사용한다.

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 총 글루탐산

4.2.1.1 시료 20 mg을 4 mL 시험관에 정밀히 취한다.

※ 폴리감마글루탐산이 함유된 최종제품(A) 및 폴리감마글루탐산이 미함유된 최종제품(B)을 각각 실험한다.

4.2.1.2 마개가 달린 40 mL 시험관에 0.05% 2-머캅토에탄올 함유 6 N 염산 용액 200 μ L를 첨가한 후, 시료를 취한 4 mL 시험관을 넣고 마개를 닫는다.

4.2.1.3 건조기에서 105-110°C, 22-24시간 동안 가수분해한다.

4.2.1.4 가수분해 된 4 mL 시험관 안의 시료를 0.02 N 염산을 이용하여 100 mL 부피플라스크에 옮긴다.

4.2.1.5 30분 동안 초음파 추출한다.

4.2.1.6 위의 용액을 실온에서 냉각하고 0.02 N 염산으로 100 mL 정용한다.

4.2.1.7 위의 시험용액을 0.02 N 염산으로 적절히 희석한 후 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4.2.1.8 시험용액을 아미노산 자동분석기 또는 고속액체크로마토그래피/질량분석기/질량분석기로 분석하여 총 글루탐산 함량을 구한다.

4.2.2 유리 글루탐산

4.2.2.1 시료 1 g을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취하여 0.02 N 염산을 가하여 시료를 녹인다.

※ 폴리감마글루탐산이 함유된 최종제품(A) 및 폴리감마글루탐산이 미함유된 최종제품(B)을 각각 실험한다.

4.2.2.2 30분 동안 초음파 추출한다.

4.2.2.3 위의 용액을 실온에서 냉각하고 0.02 N 염산으로 50 mL 정용한다.

4.2.2.4 위의 시험용액을 0.02 N 염산으로 적절히 희석한 후 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4.2.2.5 시험용액을 아미노산 자동분석기 또는 고속액체크로마토그래피/질량분석기/질량분석기로 분석하여 유리 글루탐산 함량을 구한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 아미노산 자동분석기

표 1. 아미노산 자동분석기조건(예)

항 목	조 건
주입량	20 μ L
칼럼온도	38~78°C
흡광검출기 파장	570 nm
완충액	0.35 mL/min
반응액	닌히드린 시약 : 0.30 mL/min
반응기온도	135°C

5.1.2 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기

표 2. 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항 목	조 건
이동상	A용액 : 0.1% 개미산 B용액 : 메탄올
칼럼온도	35°C
유속	0.4 mL/min
주입량	1 μ L
이온화	ESI, Positive
분석모드	MRM
Capillary voltage	4.0 kV
Corn voltage	20 V
Desolvation temperature	350°C
Monitor ions(m/z)	148(precursor), 84, 130(product)

표 3. 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기 이동상 조건(예)

시간(분)	이 동 상 (%)	
	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	98	2
2	98	2
3	5	95
4	5	95
4.1	95	5
5	95	5

5.2 계산

5.2.1 폴리글루탐산 함량(mg/g) = 폴리감마글루탐산이 함유된 최종제품에서의 폴리감마글루탐산 함량(A) - 폴리감마글루탐산이 미함유된 최종제품에서의 폴리감마글루탐산의 함량(B)

※ A 및 B에서의 폴리감마글루탐산의 함량(mg/g) : (총 글루탐산 함량 × 0.88) - 유리글루탐산 함량

* 총 글루탐산 함량(mg/g) = $(H \times V \times D) / (S \times 1,000)$

H : 시험용액의 총 글루탐산 농도($\mu\text{g/mL}$)

V : 시험용액 전량(mL)

D : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

* 유리 글루탐산 함량(mg/g) = $(C \times V \times D) / (S \times 1,000)$

C : 시험용액의 유리 글루탐산 농도($\mu\text{g/mL}$)

V : 시험용액 전량(mL)

D : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

* $0.88 = 129$ (폴리글루탐산 중 글루탐산 잔기의 분자량) / 147 (글루탐산 분자량)

3-68-2 폴리글루탐산(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 폴리감마글루탐산을 산으로 가수분해하고 글루탐산을 유도체화한 후 최대흡수파장인 338 nm에서 고속액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL, 100 mL)

2.1.2 시험관(4 mL, 40 mL)

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터

2.1.5 건조기(Dry oven)

2.1.6 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

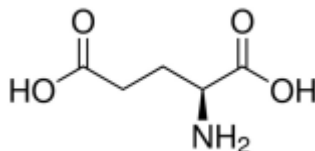
2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 L-글루탐산(L-glutamic acid)

분자식: $C_5H_9NO_4$, 분자량: 147.13, CAS No: 56-86-0



3.2 일반시약

3.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.2 인산수소나트륨(Sodium phosphate dibasic)

3.2.3 인산수소이나트륨(Sodium phosphate monobasic)

3.2.4 염산(Hydrochloric acid)

3.2.5 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol)

3.2.6 o-프탈알데히드(OPA) : Agilent 5061-3335 또는 이와 동등한 것

3.2.7 붕산완충용액(pH 10.2) : Agilent 5061-3339 또는 이와 동등한 것

3.3 시액의 제조

3.3.1 6 N 염산

3.3.2 0.02 N 염산

3.3.3 0.05%(v/v) 2-머캅토에탄올 함유 6 N 염산

4. 시험과정

4.1 표준용액의 제조

4.1.1 L-글루탐산 10 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 0.02 N 염산으로 정용하여 표준원액으로 한다.

4.1.2 표준원액을 0.02 N 염산으로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 제조

4.2.1 총 글루탐산

4.2.1.1 시료 20 mg을 4 mL 시험관에 정밀히 취한다.

※ 폴리감마글루탐산이 함유된 최종제품(A) 및 폴리감마글루탐산이 미함유된 최종제품(B)을 각각 실험한다.

4.2.1.2 마개가 달린 40 mL 시험관에 0.05%(v/v) 2-머캅토에탄올 함유 6 N 염산 용액 200 μ L를 첨가한 후, 시료를 취한 4 mL 시험관을 40 mL 시험관에 넣고 마개를 닫는다.

4.2.1.3 건조기 105~110°C에서 22~24시간 동안 가수분해한다.

4.2.1.4 가수분해 된 4 mL 시험관 안의 시료를 0.02 N 염산을 이용하여 50 mL 부피플라스크에 옮긴다.

4.2.1.5 30분 동안 초음파 추출한 후 실온에서 냉각하여 0.02 N 염산으로 50 mL 정용한다.

4.2.1.6 0.02 N 염산으로 적절히 희석한 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한다.

4.2.1.7 위의 용액 40 μ L와 붕산완충용액 200 μ L를 혼합한 후 30초간

방치하고, o-프탈알데히드 40 μ L를 혼합한 후 이를 시험 용액으로 한다.

4.2.2 유리 글루탐산

4.2.2.1 시료 1~2 g을 50 mL 부피플라스크에 정밀히 취하여 0.02 N 염산을 가하여 시료를 녹인다.

※ 폴리감마글루탐산이 함유된 최종제품(A) 및 폴리감마글루탐산이 미함유된 최종제품(B)을 각각 실험한다.

4.2.2.2 30분 동안 초음파 추출한 후 실온에서 냉각하여 0.02 N 염산으로 50 mL 정용한다.

4.2.2.3 0.02 N 염산으로 적정히 희석한 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한다.

4.2.2.4 위의 용액 40 μ L와 붕산완충용액 200 μ L를 혼합한 후 30초간 방치하고, o-프탈알데히드 40 μ L를 혼합한 후 이를 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기 조건(예)

항 목	조 건
이동상	A: 20 mM Na_2HPO_4 (20 mM NaH_2PO_4 로 조정, pH 7.8) : B: 90% 아세토니트릴 = (82 : 18)
검출기 파장	338 nm
유속	0.7 mL/분
칼럼온도	40°C
주입량	10 μ L

5.2 계산

5.2.1 폴리글루탐산 함량(mg/g) = 폴리감마글루탐산이 함유된 최종제품에서의 폴리감마글루탐산의 함량(A) - 폴리감마글루탐산이 미함유된 최종제품에서의 폴리감마글루탐산의 함량(B)

- ※ A 및 B에서의 폴리감마글루탐산의 함량(mg/g) : (총 글루탐산 함량
× 0.88) - 유리글루탐산 함량
- * 총 글루탐산 함량(mg/g) = $(H \times V \times D) / (S \times 1,000)$
 H: 시험용액의 총 글루탐산 농도($\mu\text{g/mL}$)
 V: 시험용액의 전량(mL)
 D: 희석배수
 S: 시료 채취량(g)
- * 유리 글루탐산 함량(mg/g) = $(C \times V \times D) / (S \times 1,000)$
 C: 시험용액의 유리 글루탐산 농도($\mu\text{g/mL}$)
 V: 시험용액의 전량(mL)
 D: 희석배수
 S: 시료 채취량(g)
- * $0.88 = 129$ (폴리글루탐산 중의 글루탐산 잔기의 분자량) / 147
 (글루탐산 분자량)

3-69 히알루론산

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료로부터 추출한 히알루론산을 콘드로이티나아제 ABC를 이용하여 특이적으로 분해시켜 얻은 이당류를 액체크로마토그래프를 사용하여 분석하는 방법이다. 음이온을 가진 이들 분해산물을 음이온교환수지 칼럼을 이용하여 232 nm에서 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 초음파진탕기

2.1.5 부피플라스크

2.1.6 교반기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 강염기성의 암모늄이온 교환수지로 코팅된 실리카겔), Hypersil GOLD SAX 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

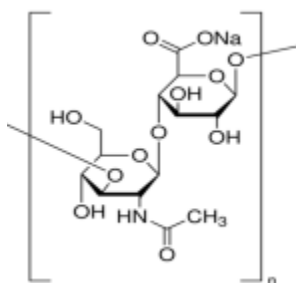
이동상으로서 0.05M NaCl(pH 3.5)을 분당 1.0 mL씩 흘려줌으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Hyaluronic acid sodium salt(Poly(β -glucuronic acid-[1 \rightarrow 3]- β -N-acetylglucosamine-[1 \rightarrow 4]), alternating)

분자식 : $(C_{14}H_{21}NaNO_{11})_n$, 분자량 : 401.3, CAS No. : 9067-32-7



3.2 일반시약

3.2.1 콘드로이티나아제 ABC (Chondroitinase ABC)

3.2.2 트리스염(Tris base)

3.2.3 아세트산나트륨(Sodium acetate)

3.2.4 염산(Hydrochloric acid)

3.2.5 증류수(Distilled water)

3.3 시액의 조제

3.3.1 33 mM Tris-HCl 완충용액 제조

트리스염 3.99 g과 아세트산나트륨 2.7 g을 각각 취하여 900 mL 증류수에 녹인 후 염산을 이용하여 pH 6.8으로 조절한 후 1 L로 한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

4.1.1 표준물질을 정밀하게 칭량하고 33 mM Tris-HCl 완충용액에 희석하고 60°C 수욕상에서 완전히 녹인 것을 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 33 mM Tris-HCl 완충용액을 이용하여 적절히 희석한 용액을 표준용액으로 한다.

4.1.3 표준용액 50 μ L에 0.002 unit/ μ L 콘드로이티나아제 ABC 50 μ L와 33 mM Tris-HCl(pH 6.8) 완충용액 400 μ L를 넣고 37°C에서 3시간 반응시킨다.

4.1.4 반응이 완료되면 100°C에서 5분간 가열하고 위의 용액을 0.45 μ m의 멤브레인 필터로 여과하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액 조제

- 4.2.1 히알루론산으로서 0.5~5 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 칭량하여 50 mL 부피플라스크 넣고 33 mM Tris-HCl 완충용액으로 정용한 후 혼합한다.
- 4.2.2 마그네틱 바를 넣고 60°C에서 90분간 강하게 추출 후 실온에 식힌다.
- 4.2.3 시료추출액 50 uL에 0.002 unit/uL 콘드로이티나아제 ABC 50 uL와 33 mM Tris-HCl(pH 6.8) 완충용액 400 uL를 넣고 37°C에서 3시간 반응시킨다.
- 4.2.4 반응이 완료되면 100°C에서 5분간 가열하고 용액을 0.45 µm의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	10 uL
칼럼온도	40°C
이동상	0.01 M NaCl(pH 3.5)
검출기 파장	232 nm
유량	1.0 mL/min

5.2 계산

- 5.2.1. 히알루론산 표준용액에서 얻은 히알루론산의 피크면적으로 검량선을 작성하고, 검량선 식을 이용하여 시험용액 중의 히알루론산의 농도를 구한 후 아래 식을 이용하여 히알루론산 함량을 계산한다.

$$\text{히알루론산의 함량 (mg/g)} = C \times (a \times b) / S \times 1/1,000 \times 378.3/401.3$$

C : 시험용액중의 히알루론산의 농도(µg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

378.3 : 히알루론산 이당류의 분자량

401.3 : 히알루론산 나트륨 이당류의 분자량

3-70 로사빈

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 로사빈을 메탄올 용액으로 초음파로 추출 한 후 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 250 nm에서 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 초음파진탕기

2.1.5 부피플라스크

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

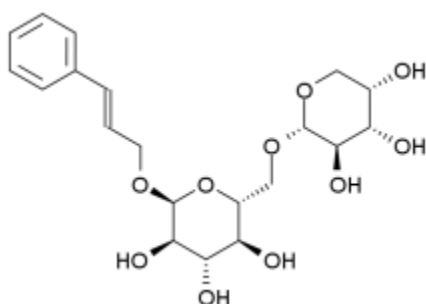
이동상으로서 증류수와 아세토니트릴을 80 : 20으로 혼합하여 분당 1.0 mL씩 흘려줌으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 로사빈(Rosavin)

분자식 : $C_{20}H_{28}O_{10}$, 분자량 : 428.43, CAS No. : 84954-92-7



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

4.1.1 표준물질 로사빈 10 mg을 정밀히 칭량하여 10 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 메탄올을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.1.3 위의 표준원액을 메탄올을 이용하여 적정농도로 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액 제조

4.2.1 시료 100 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 메탄올을 가하여 녹인다.

4.2.2 10분 동안 초음파로 추출 후 실온에서 냉각하여 메탄올로 정용한다.

4.2.3 위의 용액을 0.45 μm 의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	10 µL
칼럼온도	30°C
이동상	A : Distilled water, B : Acetonitrile
검출기 파장	250 nm
유량	1.0 mL/min

표 2. 고속액체크로마토그래프 이동상 조성(예)

분	이동상(%)	
	A(Distilled water)	B(Acetonitrile)
0	80	20
15	80	20
20	30	70
25	30	70
30	80	20
40	80	20

5.2 계산

5.2.1 로사빈 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times (1/1,000)$

C : 시험용액 중의 로사빈의 농도(ug/mL)

S : 시료 채취량(g)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

3-71 안토시아노사이드

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 안토시아노사이드를 염산을 이용하여 안토시아닌으로 분해한 후 분광광도기로 분석하는 방법으로 540 nm의 파장으로 흡광도를 구하여 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 부피플라스크

2.2 분석장비

2.2.1 자외분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 안토시아닌의 함량이 알려진 바키눔미르틸루스엑스

3.2 일반시약

3.2.1 무수에탄올(Ethanol, anhydrous)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

4.1.1 안토시아닌의 함량이 알려진 바키눔미르틸루스엑스 약 20 mg을 정밀히 칭량하여 시험용액과 같이 조작하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액 제조

4.2.1 시료 20 mg(안토시아닌으로서)을 정밀히 칭량하여 무수에탄올 · 1.5 mol/L 염산혼합액(17:3)을 넣어 녹인 후 200 mL 부피플라스크에 정용한다.

4.2.2 이 액 5 mL를 취하여 무수에탄올·1.5 mol/L 염산혼합액(17:3)을 넣어 50 mL로 정용한 다음 여과하여 처음 여액 20 mL는 버리고 다음 여액을 시험용액으로 한다.

4.2.3 무수에탄올·1.5 mol/L 염산혼합액(17:3)을 대조액으로 하여 파장 540 nm에서 시험용액 및 표준용액의 흡광도 A_T 및 A_S 를 측정한다.

5. 계산

5.1 계산

5.1.1 총 안토시아노사이드의 함량(mg/g)

$$= \text{표준품의 안토시아닌딘 양(mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times 1.475 \times \frac{1}{S} \times 1,000$$

A_T : 시험용액의 흡광도

A_S : 표준용액의 흡광도

S : 시료 채취량(mg)

1.475 : 안토시아닌딘의 안토시아노사이드 전환계수

1,000 : 단위 환산 계수

3-72 알리인

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 알리인의 함량을 80% 메탄올 용액으로 초음파로 추출한 후 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 208 nm에서 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 초음파진탕기

2.1.5 부피플라스크

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 3.0 mm, 길이 150 mm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것.

2.3 분석장비의 준비

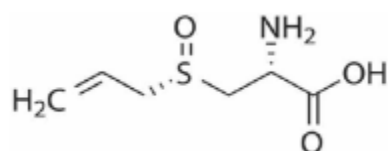
이동상으로서 A 용액(20 mM 인산이수소나트륨·10 mM 헵탄설폰산 나트륨, pH 2.0)을 분당 0.4 mL씩 흘려줌으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 알리인(L(+))Alliin

분자식 : $C_6H_{11}NO_3S$, 분자량 : 177.22, CAS No. : 556-27-4



3.2 일반시약

- 3.2.1 헵탄설폰산나트륨(1-Heptane sulfonic acid, sodium salt, HPLC grade)
- 3.2.2 인산이수소나트륨(Sodium dihydrogenphosphate, anhydrous)
- 3.2.3 인산(Phosphoric acid)
- 3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 3.2.5 증류수(Distilled water)
- 3.2.6 메탄올(Methanol)
- 3.2.7 포름산(Formic acid)

3.3 시액의 제조

- 3.3.1 20 mM 인산이수소나트륨·10 mM 헵탄설폰산나트륨용액
인산이수소나트륨 약 2.4 g과 헵탄설폰산나트륨용액 약 2.0 g을 물에 녹여 1L로 정용하고 인산으로 pH 2.0로 조절한다.
- 3.3.2 80% methanol 용액(pH 3.0)
Methanol : D.W를 80 : 20(v/v)의 비율로 혼합하고 포름산을 이용하여 pH 3.0로 조절한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

- 4.1.1 표준물질 알리인 10 mg을 정밀히 칭량하여 10 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.2 80% 메탄올(pH 3.0) 용액을 넣어 표선까지 맞추어 표준원액으로 한다.
- 4.1.3 표준원액을 80% 메탄올(pH 3.0)용액으로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액 제조

- 4.2.1 시료 100 mg을 정밀히 칭량하여 25 mL 부피플라스크에 넣는다.

- 4.2.2 적당량의 80% 메탄올(pH 3.0)용액을 넣고 잘 흔들어 녹인다.
- 4.2.3 10분간 초음파로 추출한다.
- 4.2.4 80% 메탄올(포름산으로 pH 3.0)로 25 mL가 되게 정용한다.
- 4.2.5 위의 용액을 0.45 μ m의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	10 μ L
칼럼온도	30°C
이동상	A : 20 mM 인산이수소나트륨·10 mM 헵탄설폰산나트륨 용액(pH 2.0), B : 아세토니트릴 : 이동상 A(50:50)
검출기 파장	208 nm
유량	0.4 mL/min

표 2. 고속액체크로마토그래프 이동상 조성(예)

min	이동상(%)	
	A	B
0	100	0
5	70	30
25	46	54
30	0	100
32	0	100
37	100	0
45	100	0

5.2 계산

5.2.1 알리인 함량(mg/g)

$$= C \times (a \times b) / S$$

C : 시험용액 중의 알리인의 농도(mg/mL)

S : 시료 채취량(g)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

3-73 크레아틴 모노하이드레이트

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 크레아틴 모노하이드레이트를 증류수에 용해한 후 초음파 추출하고 최대흡수파장인 224 nm에서 고속액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

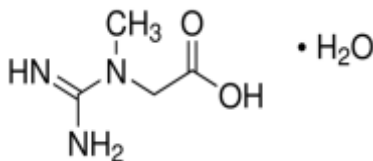
2.2.3 양이온 교환 컬럼 Nucleosil 100-5 SA(4.6×250 mm) 또는 이와 동등한 것(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 크레아틴 모노하이드레이트 (Creatine monohydrate(2-(methylguanidino) ethanoic acid))

분자식 : $C_4H_9N_3O_2 \cdot H_2O$, 분자량 : 149.15, CAS No. : 6020-87-7



3.2 일반시약

3.2.1 인산이수소암모늄 (Ammonium dihydrogen phosphate, HPLC grade)

3.2.2 수산화나트륨(Sodium hydroxide)

3.2.3 증류수

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 100 mL 부피플라스크에 크레아틴 모노하이드레이트 100 mg을 정밀하게 달아 증류수를 가하여 정용하여 이를 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 증류수로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 크레아틴 모노하이드레이트로서 10~40 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 달아 100 mL 부피 플라스크에 넣고 증류수를 70 mL 넣는다.

4.2.2 시료를 잘 흔들어 녹인 후 2분간 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 실온에서 냉각하여 증류수로 100 mL 정용한다.

4.2.4 위의 시험용액을 증류수로 적정농도($\mu\text{g/mL}$)로 희석한 후, 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μL
칼럼온도	35 $^{\circ}\text{C}$
이동상	2.3%(w/v) 인산이수소암모늄(pH 5.5)
검출기 파장	224 nm
유속	0.5 mL/min

5.2 계산

5.2.1 크레아틴 모노하이드레이트 표준용액의 피크면적으로 검량선을 작성 하고, 검량선식을 이용하여 시험용액 중의 크레아틴 모노하이드레이트 농도를 구한 후 아래 식을 이용하여 크레아틴 모노하이드레이트 함량을 계산한다.

$$\text{크레아틴 모노하이드레이트 함량(mg/g)} = C \times \frac{a}{S} \times b$$

C : 시험용액 중 크레아틴 모노하이드레이트의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료무게(mg)

3-74 알파에스1카제인(α_{S1} -casein)_(f91-100)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 알파에스1카제인_(f91-100)을 이동상으로 용해한 후 초음파 추출하여 최대흡수파장인 276 nm에서 액체크로마토그래프/자외부흡광광도 검출기 또는 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크 (50 mL)
- 2.1.2 용매용 일회용 실린지
- 2.1.3 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

- 2.2.1.1 액체크로마토그래프
- 2.2.1.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)
- 2.2.1.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.2.2 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기

- 2.2.2.1 액체크로마토그래프
- 2.2.2.2 질량검출기(Mass Selective Detector)
- 2.2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전제 Octadecyl silica, 충전입자크기 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 알파에스1카제인(α_{S1} -Casein)_(f91-100)

분자식 : $C_{60}H_{94}N_{14}O_{16}$, 분자량 : 1267.50

Tyr¹-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg¹⁰

3.2 일반시약

3.2.1 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid)

3.2.2 개미산(Formic acid)

3.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 알파에스1카제인 표준물질 10 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취한 후 추출용매로 정용한 후 표준원액으로 한다.

4.1.2 표준원액을 추출용매로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2. 추출용매의 조제

4.2.1 0.1% 트리플루오로아세트산용액과 0.1% 트리플루오르아세트산을 함유한 아세토니트릴을 74 : 26 (v:v)의 비율로 잘 혼합하여 사용한다.

4.3 시험용액의 조제

4.3.1 알파에스1카제인으로 1.0~1.5 mg에 상당하는 양을 취하여 50 mL 부피플라스크에 넣은 후, 추출용매를 넣어 시료를 녹인다.

4.3.2 30분 동안 초음파 추출한다.

4.3.3 위의 용액을 추출용매로 50 mL 정용하고 적절히 희석한 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

5.1.1 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기

표 1. 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μ L
칼럼온도	37°C
이동상	A: 0.1% 트리플루오르아세트산용액 B: 0.1% 트리플루오르아세트산을 함유한 아세토니트릴
검출기 파장	276 nm
유량	0.8 mL/분

표 2. 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	74	26
20	66	34
20.1	1	99
25	1	99
25.1	74	26
34	74	26

5.1.2 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기

표 3. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항목	조건
이동상	A: 0.1% 개미산, 0.01% 트리플루오르아세트산을 함유한 증류수 B: 0.1% 개미산, 0.01% 트리플루오르아세트산을 함유한 아세토니트릴
칼럼온도	40°C
유속	0.5 mL/분
주입량	5 µL
이온화	ESI, Positive
Capillary voltage	2.0 kV
Cone voltage	30 V
Desolvation temperature	350°C
Monitor ions(m/z)	634*(precursor ion), 771, 658(product ion)

* m/z 1268/2

표 4. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 이동상 조건(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	85	15
1	85	15
11	30	70
12	30	70
12.5	0	100
14	0	100
15.5	85	15
17	85	15

5.2 계산

5.2.1 알파에스1카제인(α_{S1} -casein)_(f91-100)의 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 알파에스1카제인(α_{S1} -casein)_(f91-100)의 농도(mg/mL)

a : 시험용액 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료무게(g)

3-75 라이코펜(lycopene)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 염화메틸렌을 이용하여 시료 중 all-trans-라이코펜을 추출하고 고속액체크로마토그래피/자외부 흡광광도 검출기를 이용하여 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(50 mL, 100 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래피용 유리병

2.1.4 용매용 일회용 실린지

2.1.5 초음파 진탕기

2.1.6 시험관

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래피

2.2.2 분광광도계

2.2.3 자외부 흡광광도 검출기

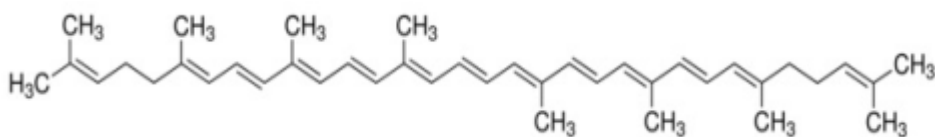
2.2.4 옥타데실실릴화한 컬럼(4.6×250 mm) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 all-trans-lycopene(Ψ, Ψ -carotene, 2,6,10,14,19,23,27,31-Octamethyl-dotriaconta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridecaene)

분자식 : $C_{40}H_{56}$, 분자량 : 536.87, CAS No. : 502-65-8



3.2 일반시약

- 3.2.1 부틸히드록시톨루엔(Butylated hydroxytoluene, HPLC grade)
- 3.2.2 디이소프로필에틸아민(Diisopropylethylamine)
- 3.2.3 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- 3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 3.2.5 염화메틸렌(Dichloromethane, HPLC grade)
- 3.2.6 헥산(*n*-Hexane, HPLC grade)

4. 시험과정

4.1 부틸히드록시톨루엔시액 조제

- 4.1.1 500 mL의 용량플라스크에 부틸히드록시톨루엔 2.5 g을 넣고 염화메틸렌으로 정용한다. 빛을 차단하여 4°C에 보관할 경우 3개월까지 사용이 가능하다.

4.2 희석액 조제

- 4.2.1 1 L의 용량플라스크에 아세토니트릴, 메탄올, 염화메틸렌, 헥산 및 부틸히드록시톨루엔 시액을 각 600:150:150:100:0.5(v/v%) 비율로 혼합하고 디이소프로필에틸아민을 0.05%가 되도록 가하여 잘 섞은 후 3~4분간 초음파를 통과시킨다.

4.3 표준원액의 조제(A 용액)

- 4.3.1 100 mL의 용량플라스크에 표준물질이 6~8 mg이 되도록 취하고 염화메틸렌 10 mL을 가하여 초음파를 통과시켜 용해한 후, 라이코펜 농도가 0.07 mg/mL이 되도록 희석액으로 희석하여 사용한다.

4.4 표준용액의 조제(B 용액)

- 4.4.1 100 mL의 용량플라스크에 표준원액 A 2 mL를 취하고 알코올과 부틸히드록시톨루엔 시액 1:1(v/v%)로 섞은 액을 20mL를 가한 후 *n*-헥산으로 정용한다.
- 4.4.2 분광광도계 472 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 4.4.3 위의 과정을 3회 반복 측정값의 평균값을 흡광도값이라 한다.

4.4.4

$$\frac{\text{표준원액(A용액)의 라이코펜 함량}(\mu\text{g/mL})}{\text{g/mL}} = \frac{A_x \times B \times 10,000}{3,450}$$

A_x : 표준용액 B의 흡광도

B : 희석배수(표준용액 B의 최종 정용량/표준원액 A 채취량)(50)

10,000 : 단위환산계수

3,450 : UV 472 nm에서 hexan 내의 순수 all-trans-라이코펜의 흡광도

4.5 시험용액의 조제

4.5.1 시료를 50°C의 항온수조에서 데우고 유봉 또는 스파툴라를 이용하여 잘 섞는다.

4.5.2 시료 약 1g을 정량하여 100 mL 부피플라스크에 넣고 부틸히드록시톨루엔 시액 10 mL와 염화메틸렌 30 mL을 넣는다.

4.5.3 시료를 잘 흔들어 추출한 후 초음파진탕기로 1분간 더 추출한다.

4.5.4 이 혼합액을 5 mL 취해서 50 mL의 용량 플라스크에 넣은 후, 표시선까지 희석액을 채워서 희석한다.

4.5.5 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항 목	조 건
주입량	10 μL
칼럼온도	40°C
이동상	아세토니트릴 : 메탄올 : 염화메틸렌 : hexan : 다이소프로필에틸아민 = (475 : 475 : 25 : 25 : 0.05, v/v)
유속	0.6 mL/min
검출기 파장	472 nm

5.2 계산

5.2.1 표준원액(A용액)을 적절히 희석한 표준용액과 시험용액 동량(10 μL)을 액체크로마토그래프에 주입한다. 얻어진 각 피크의 머무름 시간을 비교하여 피크의 면적으로 검량선을 작성하여 시료 중 라이코펜의 함량을 구한다.

$$\text{all-trans-라이코펜 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C}{D \times 1,000}$$

A : 시험용액의 전량(mL)

B : 희석배수

C : 시험용액중의 *all-trans*-라이코펜의 농도($\mu\text{g/mL}$)

D : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-76 글루코실세라미드(Glucosylceramide)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올성 수산화칼륨 용액을 처리한 후 클로로포름으로 글루코실세라미드를 추출하고 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL 및 100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.5 환저플라스크(250 mL)

2.1.6 회전진공증발농축기

2.2 분석장비

2.2.1 액체크로마토그래프

2.2.2 질량검출기

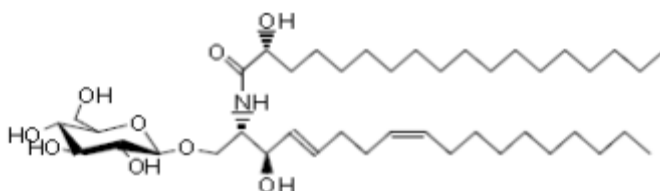
2.2.3 옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 총진입자 크기 1.7 μ m, octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 곤약 글루코실세라미드(Konjac glucosylceramide, Funakoshi, NS170302 또는 NS170303)

분자식 : $C_{42}H_{79}NO_9$, 분자량 : 742.08, CAS No. : 58173-44



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol)

3.2.2 클로로포름(Chloroform)

3.2.3 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 글루코실세라미드 50 mg을 50 mL 부피플라스크에 넣고 소량의 메탄올로 완전히 녹인 후 정용하여 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 글루코실세라미드로서 약 2.4 mg에 해당하는 시료를 100 mL 비이커에 넣고 0.4 N 메탄올성 수산화칼륨 용액 50 mL을 가한 후 2시간 동안 교반한다.

4.2.2 위액을 250 mL 분액여두로 옮기고 증류수 40 mL을 이용하여 비커를 씻어 분액여두에 합친다.

4.2.3 분액여두에 클로로포름 45 mL을 가하여 진탕 혼합하고 층 분리가 충분히 되도록 방치 한 후 클로로포름층을 환저플라스크로 옮긴다. 이 과정을 2회 더 반복한다.

4.2.4 환저플라스크로 옮긴 클로로포름층을 60°C에서 감압농축한 후 소량의 메탄올에 녹여 20 mL 부피플라스크에 옮긴 후 메탄올로 정용한다.

4.2.5 위의 시험용액을 메탄올로 적절히 희석한 후 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기 조건(예)

항 목	조 건
이동상	A용액 : 0.1% 개미산용액 B용액 : 0.1% 개미산을 함유한 메탄올
칼럼온도	40°C
유속	0.35 mL/분
주입량	1 µL
이온화	ESI, Positive
Capillary Voltage	2.5 kV
Source Temp.	150°C
Desolvation temperature	350°C

표 2. 질량검출기 분석을 위한 이온

성분	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	Cone(V)
글루코실세라미드	743	<u>262</u>	20

표 3. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	5	95
1.5	5	95
2.0	0	100
5.0	0	100
5.1	5	95
10	5	95

5.2 계산

5.2.1 글루코실세라미드(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중 글루코실세라미드의 농도(µg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000: 단위 환산 계수

3-77 소포리코사이드(Sophoricoside)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 소포리코사이드를 메탄올로 초음파 추출하고, 최대흡수 파장인 260 nm에서 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정량분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인필터

2.1.4 초음파진탕기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

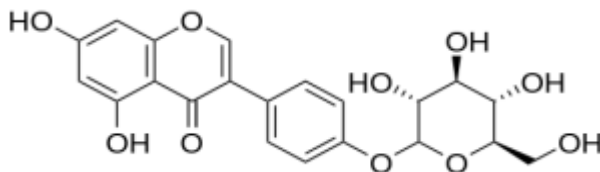
2.2.3 C₁₈ 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm, 충전제 octadecyl silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1. 소포리코사이드(Sophoricoside, Genistein-4'-O-glucoside)

분자식 : C₂₁H₂₀O₁₀, 분자량 : 432.38, CAS No. : 152-95-4



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.3 초산(Acetic acid)

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준물질 소포리코사이드를 10 mg을 정밀하게 칭량하여 10 mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.2 메탄올을 넣어 표선까지 맞춘다.

4.1.3 위의 표준원액을 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 약 0.25 g을 100 mL 부피플라스크에 정밀히 취하여 메탄올로 정용한다.

4.2.2 위의 용액을 60분 동안 초음파 추출한다.

4.2.3 위의 용액을 메탄올로 적절히 희석한 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기 분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항 목	조 건
주입량	5 μ L
칼럼온도	30°C
이동상	A용액 : 0.1% 초산 수용액 B용액 : 0.1% 초산이 첨가된 아세토니트릴
검출기 파장	260 nm
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건

시간(분)	A 용액(%)	B 용액(%)
0	85	15
5	85	15
15	55	45
17	50	50
21	50	50
23	85	15
25	85	15

5.2 계산

5.2.1 소포리코사이드 함량 (mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액중의 소포리코사이드 농도(mg/mL)

S : 시료 채취량(g)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

3-78 비타민 A 및 비타민 E 동시분석법

1. 시험방법의 요약

1.1 일반 건강기능식품

본 시험법은 시료 중에 존재하는 비타민 A와 비타민 E를 비누화 시킨 후 석유에테르로 추출하고 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 비타민 A는 325 nm, 비타민 E는 298 nm에서 검출하여 정량한다.

1.2 전분·덱스트린 함유 건강기능식품

본 시험법은 시료 중 비타민 A와 비타민 E를 산 가수분해 및 비누화 과정을 거쳐 석유에테르로 추출하고 액체크로마토그래프/자외부흡광광도 검출기로 분석하는 방법으로 비타민 A는 325 nm, 비타민 E는 298 nm에서 검출하여 정량한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 수욕조
- 2.1.2 환류냉각장치
- 2.1.3 감압농축기
- 2.1.4 갈색등근바닥플라스크
- 2.1.5 갈색분액깔때기
- 2.1.6 마개있는 갈색시험관
- 2.1.7 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.8 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.9 용매용 일회용 실린지

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 자외부흡광광도검출기
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 C₃₀ 실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 C₃₀)

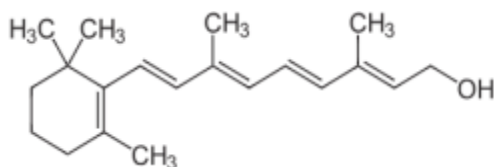
silica) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

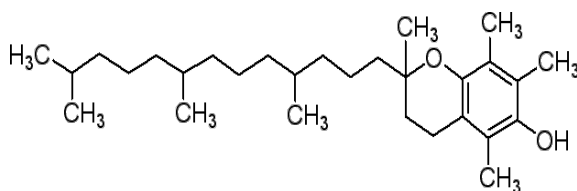
3.1.1 Retinol(Retinol, Vitamin A)

분자식 : $C_{20}H_{30}O$, 분자량 286.45, CAS No. : 68-26-8



3.1.2 α -Tocopherol((\pm)- α -Tocopherol; DL-all-rac- α -Tocopherol; Vitamin E)

분자식 : $C_{29}H_{50}O_2$, 분자량 430.71, CAS No. : 10191-41-0



3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

3.2.4 석유에테르(Petroleum ether)

3.2.5 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydride)

3.2.6 피로갈롤(Pyrogallol)

3.2.7 페놀프탈레인(Phenolphthalein)

3.2.8 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 시약 제조

4.1.1 무수황산나트륨

무수황산나트륨은 데시케이터에 보관한다.

4.1.2 10% 피로갈롤에탄올 용액

피로갈롤 10 g을 에탄올에 녹여 100 mL가 되게 한다. 사용 시 제조 한다.

4.1.3 90% 수산화칼륨 용액

수산화칼륨 90 g을 증류수에 녹여 100 mL가 되게 한다.

4.1.4 페놀프탈레인 시액

페놀프탈레인 1 g을 에탄올에 녹여 100 mL가 되게 한다.

4.2 표준용액 제조

4.2.1 비타민 A(레티놀)를 에탄올로 희석하여 2.5, 5, 10, 25, 50 mg/L의 농도가 되도록 제조하고 차광하여 사용한다.

4.2.2 비타민 E 동족체(α -, β -, γ -, δ -토코페롤)를 각각 에탄올로 희석하여 2.5, 5, 10, 25, 50 mg/L의 농도가 되도록 제조하고 차광하여 사용한다.

4.3 시험용액 제조

4.3.1 일반 건강기능식품

4.3.1.1 비타민 A 약 20~30 IU(6~9 μ g), 비타민 E 약 0.2 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취하여 갈색등근바닥플라스크에 넣는다.

4.3.1.2 에탄올 30 mL, 10% 피로갈롤에탄올 용액 1 mL를 가하고 이에 90% 수산화칼륨 용액 3 mL를 가해 충분히 혼합한다.

4.3.1.3 환류냉각기를 부착하고 95°C 수욕에 갈색등근플라스크를 2/3 잠기게 하여 30분 동안 비누화한다.

4.3.1.4 비누화 후 즉시 냉각하여 실온으로 하고 물 30 mL를 가해 갈색분액깔때기에 옮긴다.

4.3.1.5 갈색등근바닥플라스크를 물 10 mL로 씻고 이어서 석유에테르 30 mL로 씻은 후 갈색분액깔때기에 합한다.

4.3.1.6 위의 분액깔때기를 잘 흔들어 혼합하여 방치한 후 물층을 다른 갈색분액깔때기에 옮긴다.

4.3.1.7 물층은 석유에테르 30 mL를 가하여 추출하는 과정을 2회 반복한 후 석유에테르층을 [4.3.1.6]의 석유에테르층에 합하여 물 10 mL로 1회, 이어 물 50 mL로 반복하여 씻는다 (수세액이 페놀프탈레인 시액으로 분홍색이 되지 않을 때까지 행한다).

- 4.3.1.8 물층과 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산나트륨에 통과시킨 것을 갈색등근바닥플라스크에 받는다.
- 4.3.1.9 무수황산나트륨에 석유에테르 10 mL를 가하여 씻는 과정을 2회 반복하고, 씻은 액을 [4.3.1.8]의 갈색등근바닥플라스크에 모두 합한다.
- 4.3.1.10 석유에테르층이 담긴 갈색등근바닥플라스크를 40~45°C에서 감압증발건조한다.
- 4.3.1.11 잔류물에 에탄올 일정량을 가하여 녹인 액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.
- 4.3.2 전분·덱스트린 함유 건강기능식품
 - 4.3.2.1 비타민 A 약 20~30 IU(6~9 μ g), 비타민 E 약 0.2 mg에 해당하는 시료를 정밀히 취하여 마개있는 갈색시험관에 넣는다.
 - 4.3.2.2 증류수 30 mL, 10% 피로갈롤에탄올 용액 1 mL, 2 N 염산 1 mL를 가해 섞은 후 뚜껑을 닫아 70°C 항온수조에서 30분 동안 가수분해하면서 때때로 흔들어준다.
 - 4.3.2.3 가수분해 후 즉시 냉각하여 실온으로하여 갈색등근바닥플라스크로 옮기고 시험관을 에탄올 30 mL로 씻어 갈색등근바닥플라스크에 합한다.
 - 4.3.2.4 90% 수산화칼륨 용액 3 mL를 벽면을 통해서 천천히 가해 충분히 혼합한다.
 - 4.3.2.5 환류냉각기를 부착하고 95°C 수욕에 갈색등근바닥플라스크를 2/3 잠기게 하여 30분 동안 비누화한다.
 - 4.3.2.6 비누화 후 즉시 냉각하여 실온으로 하고 물 30 mL를 가해 갈색 분액깔때기에 옮긴다.
 - 4.3.2.7 갈색등근바닥플라스크를 물 10 mL로 씻고 이어서 석유에테르 30 mL로 씻은 후 갈색분액깔때기에 합한다.
 - 4.3.2.8 위의 분액깔때기를 잘 흔들어 혼합하여 방치한 후 물층을 다른 갈색분액깔때기에 옮긴다.
 - 4.3.2.9 물층은 석유에테르 30 mL를 가하여 추출하는 과정을 2회 반복한 후 석유에테르층을 [4.3.2.8]의 석유에테르층에 합하여 물 10 mL로 1회, 이어 물 50 mL로 반복하여 씻는다

(수세액이 페놀프탈레인 시액으로 분홍색이 되지 않을 때까지 행한다).

- 4.3.2.10 물층과 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산 나트륨에 통과시킨 것을 갈색등근바닥플라스크에 받는다.
- 4.3.2.11 무수황산나트륨에 석유에테르 10 mL를 가하여 씻는 과정을 2회 반복하고, 씻은 액을 [4.3.2.10]의 갈색등근바닥플라스크에 모두 합한다.
- 4.3.2.12 석유에테르층이 담긴 갈색등근바닥플라스크를 40~45℃에서 감압증발건조한다.
- 4.3.2.13 잔류물에 에탄올 일정량을 가하여 녹인 액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석 조건

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항 목	조 건
주입량	20 μL
칼럼온도	30℃
이동상	메탄올 : 물 (95 : 5, v/v)
검출기 파장	비타민 A(레티놀) - 325 nm, 비타민 E(α-, β-, γ-, δ-토코페롤) - 298 nm
유량	1.2 mL/분

5.2 계산

$$5.2.1 \text{ 비타민 함량(mg/100 g)} = C \times \frac{V \times D}{S} \times \frac{100}{1,000}$$

C : 시험용액 중 비타민의 농도(mg/L)

V : 시험용액의 최종 부피(mL)

S : 시료의 채취량(g)

D : 희석배수

$$\frac{100}{1,000} : \text{단위 환산}$$

3-79 카테킨 및 카페인 동시분석법

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 카테킨 및 카페인을 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수파장인 275 nm에서 정량 분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL 및 100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)

2.2.3 칼럼오븐

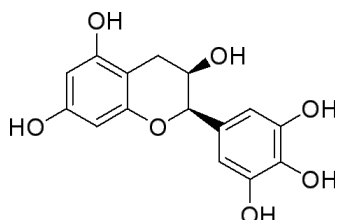
2.2.4 YMC-triart C18(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m) 칼럼 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

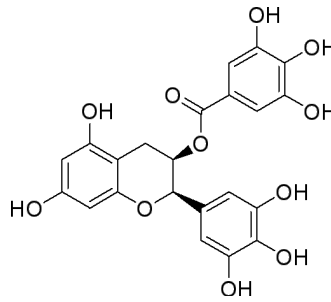
3.1.1 에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin, EGC)

분자식 : $C_{15}H_{14}O_7$, 분자량 : 306.27, CAS No. : 970-74-1



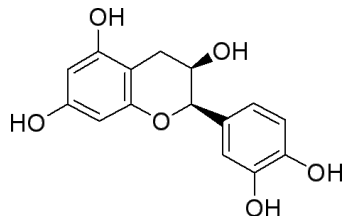
3.1.2 에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin-gallate, EGCG)

분자식 : $C_{22}H_{18}O_{11}$, 분자량 : 458.37, CAS No. : 989-51-5



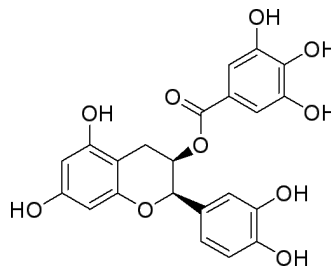
3.1.3 에피카테킨((-)-epicatechin, EC)

분자식 : $C_{15}H_{14}O_6$, 분자량 : 290.27, CAS No. : 490-46-0



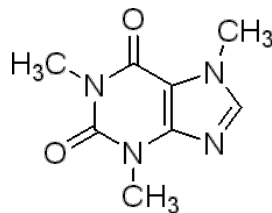
3.1.4 에피카테킨갈레이트((-)-epicatechin-gallate, ECG)

분자식 : $C_{22}H_{18}O_{10}$, 분자량 : 442.37, CAS No. : 1257-08-5



3.1.5 카페인(Caffeine, 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, 1,3,7 -trimethylxanthine, trimethylxanthine, theine, methyltheobromine)

분자식 : $C_8H_{10}N_4O_2$, 분자량 : 194.19, CAS No. : 58-08-2



3.2 일반시약

- 3.2.1 메탄올(Methanol)
- 3.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 3.2.3 인산(Phosphoric acid)
- 3.2.4 인산이수소칼륨(Potassium phosphate monobasic)

4. 시험과정

4.1 희석용매 조제

- 4.1.1 20 mM 인산이수소칼륨 용액 : 인산이수소칼륨 2.7 g을 증류수에 녹이고 전량을 1 L가 되게 한다.
- 4.1.2 20 mM 인산이수소칼륨 용액 700 mL에 메탄올 약 250 mL를 가한 후 인산으로 pH 2.1이 되도록 조정하고 메탄올을 가하여 1 L가 되게 한다.

4.2 표준용액의 조제

- 4.2.1 표준물질(EGC, EGCG, EC, ECG)과 카페인을 각각 50 mg씩 50 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 4.2.2 메탄올을 표선까지 채운다.
- 4.2.3 희석용매로 적당량 희석하여 표준용액으로 사용한다(표준용액은 사용 시 조제한다).
 - ※ 단, 사용칼럼에 따라 표준물질의 용출 순서가 바뀔 수 있으므로, 분석 전에 각각의 표준물질의 머무름시간을 확인하고 표준용액은 사용 시 조제한다.

4.3 시험용액의 조제

- 4.3.1 에피갈로카테킨(EGC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨(EC) 및 에피카테킨갈레이트(ECG)의 합으로서 5~10 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 100 mL 부피플라스크에 달아 희석용매를 가하여 20분간 초음파 추출을 행한다.
- 4.3.2 실온까지 식힌 후 희석용매로 표선까지 채운 다음, 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한다. 되도록 시험용액은 조제 후 즉시 기기분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기 파장	275 nm
칼럼 온도	30°C
이동상	A : 0.1% 인산용액, B : 0.1% 인산을 함유한 아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	90	10
5	90	10
10	87	13
20	85	15
25	70	30
30	70	30
31	90	10
40	90	10

5.2 계산

5.2.1 카테킨 함량(mg/g) = EGC(mg/g)+EGCG(mg/g)+EC(mg/g)+ECG(mg/g)

개별카테킨(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중 개별카테킨의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

5.2.2 카페인(mg/g) = $C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$

C : 시험용액 중 카페인의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1/1,000 : 단위 환산 계수

3-80 포스콜린(Forskolin)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 포스콜린을 아세토니트릴 용액으로 30분 동안 초음파 진탕하고 70°C 수욕상에서 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수파장인 210 nm에서 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1. 부피플라스크(100 mL)
- 2.1.2. 용매용 일회용 실린지
- 2.1.3. 여과용 멤브레인필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- 2.1.4. 액체크로마토그래프용 유리병
- 2.1.5. 초음파진탕기
- 2.1.6. 진탕항온수조

2.2 분석장비

- 2.2.1. 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2. 자외부흡광광도 검출기 (UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기 (Photodiode array)
- 2.2.3. 칼럼오븐
- 2.2.4. Capcell pak C18 MG II 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전 입자 크기 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

2.3 분석장비의 준비

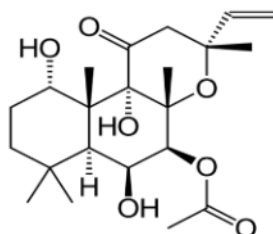
이동상으로서 증류수와 아세토니트릴을 1 : 1로 혼합하여 분당 1.0 mL씩 흘려줌으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1. 포스콜린(Forskolin)

분자식 : C₂₂H₃₄O₇, 분자량 : 410.50 g/mol, CAS No. : 66428-89-5



3.2 일반시약

3.2.1. 아세토니트릴 (Acetonitrile, HPLC Grade)

3.2.2. 증류수 (Distilled water)

4. 시험과정

4.1. 표준용액의 조제

- 4.1.1. 표준물질 포스콜린을 10 mg을 정밀하게 칭량하여 10 ml 부피플라스크에 넣는다.
- 4.1.2. 아세토니트릴을 넣어 표선까지 맞춘다.
- 4.1.3. 위의 표준원액을 아세토니트릴로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2. 시험용액의 조제

- 4.2.1. 시료 50 mg을 정밀히 칭량하여 50 ml 부피플라스크에 아세토니트릴을 가하여 녹인다.
- 4.2.2. 30분 동안 초음파 후 진탕항온수조(100 rpm, 70 °C)에서 10분간 추출한다.
- 4.2.3. 실온에서 냉각하여 아세토니트릴로 표선까지 맞춘다.
- 4.2.4. 위의 용액을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼 온도	30°C
이동상	증류수 : 아세토니트릴 = 1 : 1
검출기 파장	210 nm
유속	1.0 mL/min

5.2 계산

5.2.1. 포스콜린 함량 (mg/g) = (C x a x b)/S

C : 시험용액중의 포스콜린 농도(μ g/mL)

S : 시료 채취량(mg)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

3-81 알로인

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 알로인 A와 B를 초산에틸·메탄올 혼합용액으로 추출하고 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장 380 nm에서 정량분석 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 갈색부피플라스크(100 mL)

2.1.2 원심분리 튜브

2.1.3 용매용 일회용 실린지

2.1.4 여과용 멤브레인 필터

2.1.5 원심분리기

2.1.6 질소농축기

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래피

2.2.2 자외부흡광광도 검출기

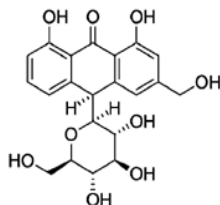
2.2.3 C18 컬럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μ m)
또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

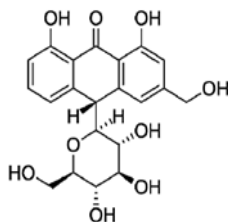
3.1.1 알로인 A(Aloin A)

분자식 : $C_{21}H_{22}O_9$, 분자량 : 418.39, CAS No.: 1415-73-2



3.1.2 알로인 B(Aloin B)

분자식 : $C_{21}H_{22}O_9$, 분자량 : 418.39, CAS No.: 28371-16-6



3.2 일반시약

3.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3.2.2 에탄올(Ethanol)

3.2.3 염화나트륨(Sodium chloride)

3.2.4 초산에틸(Ethyl acetate)

3.2.5 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

3.2.6 초산(Acetic acid)

3.2.7 증류수(Distilled water)

3.3 시액의 조제

3.3.1 초산에틸·메탄올 혼합용액

초산에틸 900 mL와 메탄올 100 mL를 혼합하여 조제한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액 조제

4.1.1 표준물질을 각각 10 mg을 정밀히 칭량하고 메탄올을 가하여 100 mL 갈색 부피플라스크에 정용한 것을 표준원액으로 한다.

4.1.2 위의 표준원액을 60% 메탄올로 적정농도 희석하여 표준용액으로 사용한다.

4.2 시험용액 조제

4.2.1 시료 0.5 ~ 1 g을 칭량하여 에탄올 1 mL, 염화나트륨 포화용액 2 mL을 넣고 용해시킨다.(분말제품의 경우 증류수 1 mL을 추가로 첨가한다)

※ 시료를 충분히 균질화한다.

- 4.2.2 초산에틸·메탄올 혼합용액을 4 mL 넣고 충분히 혼합한다.
- 4.2.3 위의 용액을 원심분리(2,000 rpm, 3분)하여 상등액을 취한다.
- 4.2.4 시료의 침전물[4.2.2]에 초산에틸·메탄올 혼합용액을 4 mL 넣고 혼합한다.
- 4.2.5 위의 용액을 원심분리(2,000 rpm, 3분)하여 상등액을 취하고, 상등액[4.2.3]과 혼합한다.
- 4.2.6 포집한 상등액을 50°C에서 질소를 이용하여 완전히 건조시킨다.
- 4.2.7 60% 메탄올 0.5 mL로 용해 후, 0.45 µm PVDF 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건(예)

항목	조건
주입량	10 µL
검출기 파장	380 nm
칼럼온도	35°C
이동상	A : 0.1% 초산 수용액 B : 0.1% 초산 함유 아세트니트릴
유속	0.7 mL/분

표 2. 고속액체크로마토그래피 이동상 조성(예)

분	이동상(%)	
	A	B
0	80	20
25	70	30
31	0	100
33	80	20
40	80	20

5.2 계산

5.2.1 알로인 A 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 알로인 A 농도($\mu\text{g/mL}$)

S : 시료 채취량(mg)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

5.2.2 알로인 B 함량(mg/g) = $C \times (a \times b) / S$

C : 시험용액 중의 알로인 B 농도($\mu\text{g/mL}$)

S : 시료 채취량(mg)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수