

## GC에 의한 有機酸分析方法에 관한 研究

機器分析科

李 東 植·權 玉 鉉·金 周 亨

### Studies on the Analysis Method of Organic Acids by Gas Chromatography

*Division of Instrumental Analysis*

Dong Sik Lee, Ohk Hyun Kwuon and Joo Hyung Kim

#### ==Abstract==

A gas chromatographic method was used for analysis of organic acids, as their butyl derivatives. The acids were extracted with hot water. The aliquot was passed through ion exchange resin to eliminate the interferences.

The eluate containing acids were neutralized by sodium hydroxide, and evaporated to dry under vacuum at 60°C. These sodium salt of organic acids were esterified with hydrochloric acid and 1-butanol.

This method permits the simultaneous determination of several volatile and nonvolatile organic acid in foods, fruits, vegetables, drinks, such as acetic, lactic, oxalic, fumaric, malic, maleic, succinic, tartaric, citric acids within forty minutes.

#### 緒 論

一般的으로 有機酸은 Drink劑 清涼飲料 食品, 果實, 野菜類 等に 天然의으로 含有되어 있거나,<sup>1)</sup> 調味料, 酸 味料의 目的으로 人工的인 添加에 의해 널리 分布되어 있다.<sup>2)</sup> 有機酸 分析에 關하여서는 Bulen<sup>3)</sup> 等이 Silicagel을 利用해서 分配 Chromatography(GC)에 따른 分析法을 確立하였고, Kesner<sup>4)</sup> 等은 GC의 自動分 析法을 開發하였다. 近來에는 有機酸을 迅速, 簡便, 精 確하게 分析하기 위하여 GC가 널리 使用되고 있으며, 不揮發性 有機酸의 分析을 위한 效率的인 誘導體化方法

이 開發되어졌다. 山下市二,<sup>5)</sup> 田村太郎<sup>6)</sup> Stein Hauer<sup>7)</sup> 等은 有機酸을 分離定量하기 위하여, 1-butanol을 利 用한 有機酸의 1-butylester의 誘導體를 形成시켜 GC에 注入하여 良好한 分析結果를 얻었다. 이 方法은 處理操 作이 簡便하고, 종래의 ethyl-ester化法이나 methyl- ester化法에 비해 ester化에 의한 安定性이 증가되는 利 點이 있어 Drink劑, 清涼飲料, 食品, 果實, 野菜類 等 에 含有되어 있는 有機酸 分析에 有用하게 利用될 수 있 으리라고 생각된다.

이에 著者 等은 柑橘을 試料로 하여 1-butyl ester化法 에 의한 有機酸 分析實驗을 實施하여 그 結果를 報告하 고자 한다.

## 材料 및 방법

### 1. 實驗材料

1989年 12月 4곳의 市中에서 流通되고 있는 温州柑橘을 購入하여 實驗하였다.

### 2. 試藥 및 有機酸 標準品

#### 1) 有機酸 標準品

Citric acid, GR (Avondale Laboratories Limited, England)

Malic acid, GR (純正化學, 日本)

Tartaric acid, EP (純正化學, 日本)

Lactic acid, EP (純正化學, 日本)

Fumaric acid, EP (藥理化學, 日本)

Succinic acid, EP (日本試藥, 日本)

Oxalic acid, EP (日本試藥, 日本)

#### 2) 試藥

1-butanol (GR), ethanol (GR), hydrochloric acid (GR)

sodium sulfate anhydrous (GR), sodium hydroxide (GR)

ammonium hydroxide (GR), 1-butyl acetate (EP), *l*-menthol

dowex 50 W (ion exchange resin, Dow Chem 社)

dowex-1 (ion exchange resin, Dow Chem 社)

### 3. 機器

Rotary Evaporator (BüCHI 社)

THER-MIX (第一理化學機器製作所)

Gas chromatography (Hewlett Packard HP 5890 A)

### 4. GC 測定條件

GC裝置와 測定條件은 Table 1과 같다.

### 5. 分析方法

#### 1) 有機酸의 Ester化를 위한 加熱時間의 檢討

豫備實驗에 의하여 同定된 柑橘에 含有된 有機酸의 標準品 一定量 (lactic acid 6.0 mg, oxalic acid 20.0 mg, fumaric acid 40 mg, succinic acid 8.0 mg, malic acid 56.0 mg, tartaric acid 3.0 mg, citric acid 520 mg)을

Table 1. Instrument and operating conditions.

Instrument	HEWLETT PACKARD HP 5890 A	
Detector	F.I.D.	
Column	2 m×3 mm ID, Stainless steel DEGS 2% and H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.5% on chromosorb W 60 ~80 mesh.	
Column temperature (°C)	starting	80
	Heating rate (°C/min)	5
	Finishing	180
Injection port temperature (°C)	200	
Detector temperature (°C)	220	
Carrier Gas (ml/min)	20	
Recorder chart speed (mm/min)	0.4	
Sample size	4 μl	

各各 平량하여 減壓蒸流 플라스크에 넣고, 여기에 증류수 100 ml를 加하여 有機酸을 溶解시킨 다음, 이를 Rotary evaporator에 接續하여 約 60°C에서 減壓乾燥시킨 후, 1-butanol 3 ml, 진한 염산 3방울을 加하고 환류냉각기를 부착하여 15~120分間 加熱沸騰시켜 ester化 한다. 이 操作이 끝나면 室溫까지 냉각하여 無水黃酸 나트륨으로 脫水시키고, 內部標準液 1 ml를 넣은 20 ml 메스플라스크에 濾過하여 넣은 다음, 濾過잔사를 1-butyl acetate로 洗滌하고 同溶液으로 表線까지 채워 各 ester化 時間別 標準液 5개를 調製하여 4 μl씩을 GC에 注入하고, 內部標準液과 各 有機酸의 peak area를 比較하여, ester化를 위한 加熱時間의 最適條件을 檢討하였다.<sup>6)</sup>

#### 2) 標準液의 調製 및 檢量線의 作成

柑橘속에 含有된 成分有機酸의 標準品 一定量 (lactic acid 6.0 mg, oxalic acid 20.0 mg, fumaric acid 4.0 mg, succinic acid 8.0 mg, malic acid 56.0 mg, tartaric acid 3.0 mg, citric acid 520 mg)을 各各 平량하고, 5-(1)의 實驗方法으로 1時間 ester化하여 有機酸 標準液을 調製後 이 液 2.5 ml, 5 ml, 10 ml를 20 ml 메스플라스크에 各各 取하여 內部標準液 1 ml씩을 加하고, 1-butyl acetate로 各 表線까지 채워 濃度別로 4 μl씩을 GC에 注入하고, 檢量線을 作成했다.<sup>8)</sup>

#### 3) 檢液의 調製

##### ① 有機酸의 抽出

試料 100 g (可食部)을 막자사발에 넣고 溫水 100 ml를 加하여 10分間 混和한 다음, 環流플라스크에 옮겨 냉각기를 接續하여, 때때로 흔들어 주며 끓는 수욕조중에

서 1시간 抽出한 後 抽出液은 脫脂綿을 通過시켜 濾過하고, 잔사를 溫湯으로 洗滌한 다음 濾液을 合하여 200 ml로 했다.<sup>5)</sup>

### ② 有機酸의 分離 및 總酸度 測定

양이온교환수지(DOWEX-50 W H<sup>+</sup> form)와 음이온교환수지(DOWEX-1 OH<sup>-</sup> form)를 內徑 20 mm glass column에 높이 60 mm 정도로 채우고,<sup>9,10)</sup> 熱水抽出 試料를 양이온교환수지(DOWEX-50 W H<sup>+</sup> form)에 通過시켜 amino酸을 分離하고, 음이온교환수지(DOWEX-1 OH<sup>-</sup> form)에 통과시켜 有機酸을 吸着시킨 다음, 約 400 ml의 증류수로 洗滌하여 不純物을 除去한다. 洗滌이 끝난 음이온교환수지 column에 2 N 암모니아수 60 ml를 通過시켜, 有機酸을 암모늄염으로 溶離하여 回收하고, 증류플라스크에 옮겨 rotary evaporator를 使用하여 60°C 減壓하에서 암모니아 냄새가 나지 않을 때까지 농축하여, 암모늄염을 留去한다. 농축액은 다시 양이온교환수지(DOWEX-50 W H<sup>+</sup> form)에 通過시켜, 有機酸만을 回收한 다음, 蒸流水 50 ml를 통과시켜 洗滌하고 세척액을 合한 有機酸을 0.1 N 수산화나트륨으로 적정하여 總酸度를 求했다.<sup>11)</sup>

### ③ 有機酸의 ester化

總酸度를 求하고 난 有機酸 Na염 溶液을 減壓蒸류 플라스크에 옮겨, 5-(1)의 實驗方法으로 1시간 ester化하여 檢液을 調製했다.

### 4) 內部標準液

正確히 평량한 2g의 *l*-menthol을 1-butyl acetate에 녹여 10 ml로 하여 使用했다.

## 結果 및 考察

### 1. ester化를 위한 加熱時間

5-(1)에서 有機酸 標準品들을 一定量 平량하여 15, 30, 60, 90, 120分間 ester化하여 GC에 注入시켜 얻은 chromatogram상의 peak area와 內部標準液과의 peak area 比를 세로 軸에, ester化 時間을 가로 軸에 取하여 Fig. 1에 나타내었다. 그 結果 有機酸의 ester化는 30分間의 加熱에 의해 平衡에 도달했고, 2時間까지 거의 變化가 없었다. 이 結果를 토대로 本 實驗에서는 ester化를 위한 加熱時間을 1時間으로 했다.

### 2. 檢量線

實驗方法 5-(2)에 의해 檢量線을 作成한 結果 良好한

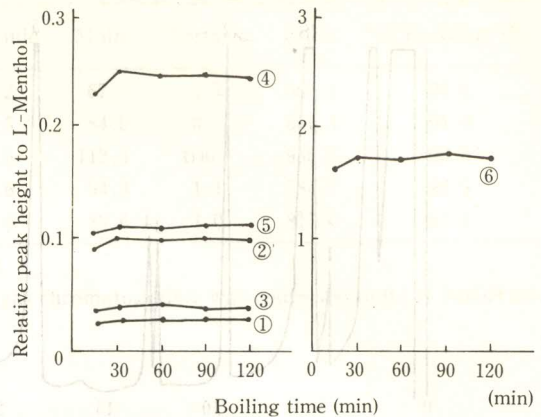


Fig. 1. Boiling time to esterify and response to *l*-menthol.

- ① lactic acid ② oxalic acid ③ succinic acid  
④ malic acid ⑤ tartaric acid ⑥ citric acid

Table 2. Equation and correction coefficient in calibration curves of organic acids.

Lactic acid	$Y=0.202X-0.025$	$r=0.9898$
Oxalic acid	$Y=0.234X-0.008$	$r=0.9825$
Succinic acid	$Y=0.201X-0.003$	$r=0.9893$
Malic acid	$Y=0.202X-0.002$	$r=0.9976$
Tartaric acid	$Y=0.904X-0.009$	$r=0.9740$
Citric acid	$Y=0.175X-0.091$	$r=0.9860$

直線關係를 얻었다 (Table 2).

### 3. 有機酸의 定量

實驗方法 5-(2)에 따라 1時間 沸騰시켜 ester化한 有機酸 標準品의 gas chromatogram을 Fig. 2에 柑橘試料의 有機酸 gas chromatogram을 Fig. 3에 圖示하고, chromatogram상의 各成分 peak를 area ratio法으로 測定하여 얻은 各種 有機酸의 量을 柑橘 100g當(可食部) mg으로 換算한 結果를 Table 3에 나타내었다.

이 結果로 보면 實驗에 의해 確認된 有機酸은 7種이며, 이들중 fumaric acid를 除外한 6種은 定量이 可能하였으나, fumaric acid는 微量으로써 含量을 計算할 수 없었다. Table 3에 나타난 柑橘試料 100g 中の 平均 有機酸 含量分布는 citric acid가 817.6 mg으로 主流를 이루었고, 다음 malic acid 89.6 mg, oxalic acid 15.3 mg, succinic acid 7.0 mg, lactic acid 3.7 mg, tartaric acid 1.0 mg 順이었으나, 試料에 따라서 含量이 조금씩 相異하였다. 그러나 citric acid의 경우 試料別 含量의

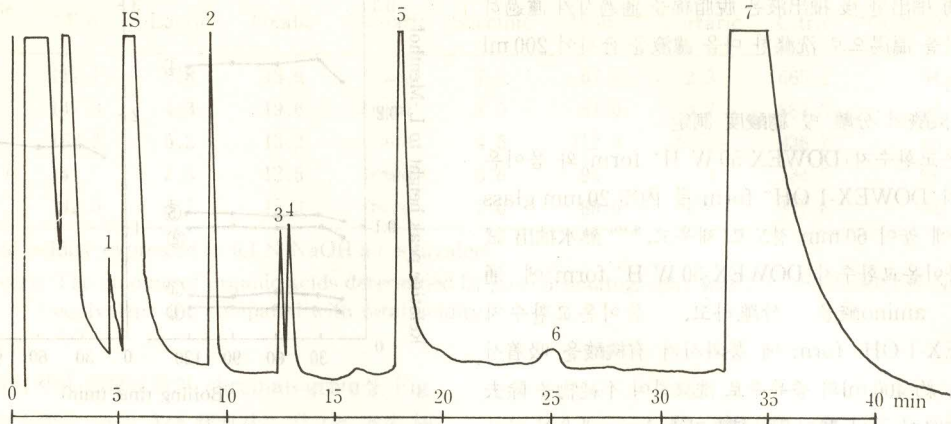


Fig. 2. Gas chromatogram of butyl derivatives of acids contained in standard acids.

- ① lactic acid ② oxalic acid IS: *l*-menthol ③ fumaric acid ④ succinic acid  
⑤ malic acid ⑥ tartaric acid ⑦ citric acid

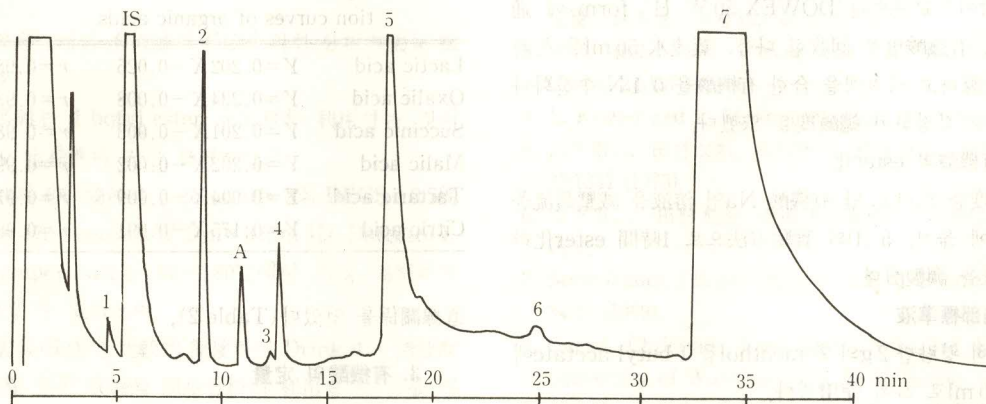


Fig. 3. Gas chromatogram of butyl derivatives of acids contained in citrus fruit.

- ① lactic acid ② oxalic acid ③ fumaric acid ④ succinic acid ⑤ malic acid  
⑥ tartaric acid ⑦ citric acid A unknown peak IS: *l*-menthol

差異가 커서 最高値인 試料 3이 936.2 mg이었고, 最低  
值인 試料 1이 665.1 mg으로 두 試料間에 271.1 mg의  
含量差異를 나타내었다. 이러한 事實은 試料別 糖含量  
의 差異에 起因되어지는 것으로 推定<sup>9)</sup>되며 試料別 總酸  
度가 相異하게 나타나는 主要因으로 思料된다.

#### 4. 總酸度 및 GC 回收率

試料 100 g中에서 抽出한 有機酸을 0.1 N 수산화나트  
륨 소비 ml에 對應시켜 나타낸 값이 總酸度이며, 測定  
結果 試料別 含有 有機酸 總量의 差異에 따라 總酸度도  
다르게 나타나고 있으며, 試料 3이 163.3으로 가장 높

고, 試料 1이 117.1로 가장 낮게 나타나고 있다. 이는  
成分 有機酸의 主流를 이루고 있는 citric acid의 含量에  
의해 左右되고 있는 것으로 思料된다. GC 回收率은 GC  
로 定量한 有機酸 總量을 0.1 N 수산화나트륨 相當量으  
로 換算하고, 總酸도에 對應시켜 %로 나타낸 값인데,  
本 實驗에서 試料別 有機酸의 GC 回收率은 Table 3에  
나타난 바와 같이 試料 4가 96.9%로 가장 높고, 試料 1  
이 94.8%, 試料 3이 93.8%, 試料 2가 91.0%이었다.  
GC 平均 回收率은 94.1%로, 5.9%의 未回收 有機酸은  
GC法으로 分析時 檢出不能의 有機酸이 存在하거나 未  
同定 有機酸의 存在, 定量誤差 等の 要因에 起因되는 것

**Table 3.** Concentration of organic acids of citrus fruit expressed in mg/100 g citrus fruit.

試料	區分	*T.A	Lactic	Oxalic	Fumaric	Succinic	Molic	Tartaric	Citric	*GCRecovery (%)
1(가락)		117.1	2.8	15.9	trace	7.2	67.9	2.3	665.1	94.8
2(중앙)		147.9	4.3	19.6	trace	8.5	84.0	0.7	884.3	91.0
3(제일)		163.3	5.2	13.2	trace	4.5	112.3	trace	936.2	93.8
4(모란)		141.7	2.5	12.5	trace	6.6	94.3	1.1	784.7	96.9
平均		142.5	3.7	15.3	trace	7.0	89.6	1.0	817.6	94.1

\*T.A: Total acidity expressed in 0.1 N NaOH ml equivalent.

\*GC Recovery: The amount of organic acids determined by gas chromatography was converted to 0.1 N NaOH ml equivalent and compared with total acidity.

으로 思料되어지며 柑橘試料의 chromatogram상 (Fig. 3)에 나타난 未同定 peak A에 關해서는 앞으로 계속 研究가 이루어져야 될 것으로 思料된다.

### 參 考 文 獻

### 結 論

著者 등은 7개의 有機酸의 GC에 의한 分析方法을 檢討한 結果

1. 誘導體는 1-butyl ester 유도체를 利用하는 것이 再現性 및 定量性이 가장 良好하였고

2. 이때의 GC 條件은, column은 2% DEGS+0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on chromosorb W 2 m×3 mm ID, Detector는 F.I.D, Temperature는 80~180°C에서 가장 良好하게 分離定量할 수 있었으며

3. 前處理 操作이 比較的 簡便하여 Drink제나 清涼飲料, 果菜類 等の 有機酸 同時分析에 利用될 수 있을 것으로 思料된다.

1. 李東碩, 禹相圭, 梁且範: 韓國產 主要果實의 化學成分에 關한 研究. 韓國食品科學會誌, 4:135 (1972).
2. 山下市二, 田村太郎, 吉川誠次, 島本富明: 揮發性および 不揮發性 有機산의 氣相 크로마토그래피에 의한 定量. 日本農化學會誌, 48:77 (1974).
3. W.A. Bulen, J.E. Varner and R.C. Burrll: Anal. Chem., 24:187 (1952).
4. L. Kesner and E. Muntwyler: Ibid., 38, 1164 (1966).
5. 山下市二, 田村太郎, 吉川誠次, 鈴木重治: 分析化學, 22:1331 (1973).
6. 山下市二, 田村太郎: 食品中の 有機산의 分析에 關する 研究.
7. Stein Hauer, J.E. and Dawson, L.E.: J. Food Science, 34:37 (1969).
8. Garyd, Christian: Analytical Chem. 3rd Edition, University of Washington, p. 79-83 (1980).
9. 鄭東孝, 張賢基: 食品分析. 第2版, 進路研究社, 서울, p. 88-93 (1980).
10. 朴冕用: 氣體 및 液體 크로마토그래피의 理論과 應用. 第2版, 探求堂, 서울, p. 142-146 (1982).
11. 保健社會部: 食品公典. p. 282 (1988)