

효소처리스테비아

Enzymatically Modified Stevia

이 명: Glucosyl stevia

정 의 이 품목은 스테비아추출물에 α -글루코실전이효소 등을 이용하여 글루코오스를 부가시켜 얻어지는 것으로서 그 성분은 α -글루코실스테비오사이드 등이다.

합 량 이 품목을 건조물로 환산한 것은 스테비올배당체 80.0% 이상을 함유하고 미반응스테비올배당체 15.0% 이하를 함유한다.

성 상 이 품목은 백~옅은 황색의 분말, 박편 또는 과립으로서 냄새가 없거나 또는 약간 특유한 냄새를 가지며 청량한 감미를 갖는다.

확인시험 (1) 이 품목 1.2g에 물 100mL를 가해주고 용해시킨 다음 이에 n-부탄올 100mL를 가해주고 잘 진탕시킨 후 정치하여 두 액층으로 분리시킨다. n-부탄올 층을 취하여 필요하면 여과하고 여액 5mL에 안트론시액 5mL를 벽면을 따라 서서히 가할 때, 경계면은 청~녹색을 나타낸다.

(2) 이 품목 2.4g에 황산(1→5) 40mL를 가해주고 환류냉각기를 부착한 다음 수욕상에서 2시간 가열한 후 냉각시킨 다음 에테르 50mL씩으로 2회 추출하고 추출액을 합한 다음 소량의 물로 2회 씻어주고 무수황산나트륨으로 탈수시킨 후 증발건고한다. 잔류물은 메탄올 10mL에 녹인 다음 물 10mL를 가해주고 생성된 침전물을 여과한다. 여과지 위의 잔

류물은 50%(v/v) 메탄올 소량으로 씻어주고 105℃에서 2시간 건조한 후 그 용점을 측정할 때, 226~230℃이어야 한다.

(3) 이 품목 2.4g에 물 100mL를 가해주고 용해시킨 다음 액을 반으로 나눈다. 한쪽은 그대로 정량법(2)의 미반응스테비올배당체 정량법에 따라 시험할 때, 리바우디오사이드A (RebaudiosideA)피크 뒤쪽에 피크군이 있는 것이 확인되어야 한다. 또한, 다른 한쪽의 용액에는 이 품목 1g에 대하여 글루코아밀라아제 500GUN을 첨가하고 55℃에서 24시간 반응시킨 다음 이 액을 0.45 μ m 밀리포아여과기로 여과한 액을 미반응스테비올배당체 정량법에 따라 시험할 때, 리바우디오사이드A의 피크보다 뒤쪽에 나타나는 피크군의 피크면적은 증가되고 리바우디오사이드A의 피크보다 앞쪽에 나타나는 피크군의 피크면적은 거의 소실된다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 2.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 1.0ppm 이하이어야 한다.

건조감량 이 품목 1g을 105℃에서 4시간 건조할 때, 그 감량은 6% 이하이어야 한다.

강열잔류물 이 품목 1g을 취하여 강열잔류물시험법에 따라 시험할 때 그 양은 1% 이하이어야 한다.

정 량 법 (1) 스테비올배당체 : ① 스테비올의 함량과 ② 배당체 중의

당 함량을 합한 값을 스테비올배당체 함량으로 한다.

- ① 스테비올 정량법 : 이 품목 약 100mg을 정밀히 달아 30mL의 삼각플라스크에 넣고 20% 황산 10mL를 가해주고 환류냉각기를 부착한 다음 수욕상에서 2시간 가열한 후 흐르는 물에 식힌 다음 내용물을 물 10mL를 사용하여 분액깔대기에 옮겨주고 다시 플라스크를 에테르 30mL씩으로 3회 씻어주고 세액을 분액깔대기에 합쳐서 잘 흔들어 섞어준 다음 정치시킨다. 물층을 제거한 에테르층은 물 20mL씩으로 2회 씻어준 다음 물층을 완전히 제거하고 에테르층은 별도의 플라스크에 옮겨주고 분액깔대기는 에테르 10mL씩으로 2회 씻어주고 세액은 플라스크에 합한 다음 이에 무수황산나트륨 15g을 가하여 잘 흔들어 섞어준 후 경사되게 하여 에테르층을 다시 별도의 플라스크에 옮겨준다. 남은 무수황산나트륨은 에테르 10mL씩으로 2회 씻어준 다음 세액을 플라스크에 합한 후 에테르를 유거시키고 잔류물에 초산에틸 10mL를 가하여 용해하고 디아조메탄·에테르용액 3mL를 가하여 마개를 잘 막고 가끔 교반시키면서 20분간 방치한다. 이 액에 초산 0.5mL를 넣어 잘 흔들어 섞은 다음 내부표준용액인 스쿠알렌의 n-부탄올용액(12.5mg/mL) 2mL를 가하여 시험용액으로 한다. 따로, 105℃에서 2시간 건조한 스테비오사이드 표준품 50mg을 정밀히 달아 시험용액의 경우와 동일하게 조작한 것을 표준용액으로 한다. 시험용액 및 표준용액 각각을 다음의 조작조건으로 가스크로마토그래피에 주입하고 다음 계산식에 따

라 스테비올의 함량을 구한다.

$$\text{스테비올의 함량(\%)} = \frac{A}{A_s} \times \frac{\text{스테비오사이드 표준품의 채취량(mg)}}{\text{건조물로 환산한 검체의 채취량(mg)}} \times 100 \times K$$

A : 시험용액의 이소스테비올메틸에스테르의 스퀴알렌에 대한 피크 면적비

A_s : 표준용액의 이소스테비올메틸에스테르의 스퀴알렌에 대한 피크 면적비

K : 스테비올로의 환산계수 318.46/804.88=0.3957

조작조건

칼 럼 : DB-17(30m×0.25μm×0.25mm) 또는 이와 동등한 것

검 출 기 : 수소이온화검출기(FID)

주입구온도 : 260℃

칼 럼 온 도 : 235℃

검출기온도 : 260℃

캐리어가스 및 유량 : 질소 또는 헬륨, 이소스테비올메틸에스테르가

7~15분 후에 나타날 수 있도록 칼럼온도 및

캐리어가스의 유량을 조정한다.

② 배당체 중의 당정량법

시험용액 조제 : 이 품목 약 1.0g을 정밀히 달아 물 50mL에 녹인

다음 이 액을 효소처리 스테비아용흡착수지(Amberlite XAD-7)

50mL를 사용하여 만든 직경 2.5cm의 수지칼럼에 주입하고 1분간

3mL이하의 속도로 유출시킨 다음 물 250mL를 사용하여 칼럼을

씻어준다. 이어서 50%(v/v) 에탄올 또는 90%(v/v) 메탄올 250mL

를 1분간 3mL이하의 유속으로 통과시켜 흡착된 성분을 용출시킨

다음 이 액을 감압농축기로 농축건고하고 잔류물에 물을 가하여 녹여주고 전량을 500mL로 한 후 다시 1mL를 취하여 물을 가하여 50mL로 한 것을 시험용액으로 한다.

시험조작 : 시험용액 2mL를 정확히 공전시험관에 취한 다음 이를 얼음물 중에서 냉각시키면서 안트론시액 6mL를 정확히 가해주고 양 액이 완전히 혼합될 때 까지 잘 흔들어 섞어준다. 이어서 끓는 수욕 중에서 정확하게 16분간 가열하고 얼음물에 냉각한 다음 물을 대조액으로 하여 파장 620nm에서 흡광도를 측정하고 미리 작성한 포도당 검량선으로 부터 시험용액의 포도당농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)를 구한다. 포도당검량선은 미리 105℃에서 2시간 건조한 포도당을 사용하여 1mL당 10 μg , 30 μg , 50 μg 의 포도당을 함유하는 포도당 표준용액에 대하여 시험용액과 동일조작 하여 얻어진 각각의 흡광도의 농도로부터 작성한다.

다음의 계산식에 따라 스테비올배당체를 구성하는 당 함량을 구한다.

$$\text{스테비올배당체를 구성하는 당 함량(\%)} = \frac{b \times 0.9 \times 50 \times 500}{Y \times 1,000 \times 1,000} \times 100 = \frac{2.25b}{Y}$$

b : 검량선에서 얻은 시험용액의 포도당 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Y : 건조물로 환산한 검체의 채취량(g)

(2) 미반응스테비올배당체 정량법 : 이 품목을 105℃에서 2시간 건조한 다음 약 50~100mg을 정밀히 달아 물:아세트니트릴(7:3) 혼액에

용해하여 50mL로 한 액을 시험용액으로 한다. 따로 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A 표준품을 105°C에서 2시간 건조한 다음 각각 50mg을 정밀히 달아 물:아세트니트릴(7:3) 혼액에 용해하여 50mL로 한 액을 표준용액으로 한다. 시험용액 및 표준용액을 각각 다음의 조작조건으로 액체크로마토그래피에 주입하여 총 스테비올배당체의 함량을 구한다. 시험용액의 돌코사이드 A, 루부소사이드, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 B, 리바우디오사이드 C, 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 F, 스테비올비오사이드, 스테비오사이드의 피크 머무름 시간과 혼합표준용액의 상기 9가지 성분의 피크 머무름 시간을 비교하여 확인한다. 정량은 시험용액의 9가지 성분의 피크면적을 각각 구하고 다음 계산식에 따라 리바우디오사이드 A를 제외한 8가지 성분의 함량과 리바우디오사이드 A의 함량을 구한 다음 그 합계를 스테비올배당체의 함량으로 한다.

$$X \% = \frac{W_s}{W} \times \frac{A_x \times f_x}{A_s} \times 100$$

$$\text{리바우디오사이드 A\%} = \frac{W_R}{W} \times \frac{A_x}{A_R} \times 100$$

X : 각각의 스테비올배당체

W_S : 표준용액의 스테비오사이드 함량(mg)

W_R : 표준용액의 리바우디오사이드 A 함량(mg)

W : 시험용액의 검체 함량(mg)

A_S : 표준용액의 스테비오사이드 피크 면적

A_R : 표준용액의 리바우디오사이드 A 피크 면적

A_X : 시험용액 중 X의 피크면적

f_X : 스테비오사이드에 대한 X의 분자량 비율

(스테비오사이드 1.00, 리바우디오사이드 A 1.20, 리바우디오사이드 B 1.00, 리바우디오사이드 C 1.18, 리바우디오사이드 D 1.40, 리바우디오사이드 F 1.16, 돌코사이드 A 0.98, 루부소사이드 0.80, 스테비올비오사이드 0.80)

조작조건

검출기 : UV 210nm

칼럼 : Capcell pak C_{18} MG II (4.6mm×250mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 40 $^{\circ}$ C

이동상 : 아세토니트릴 : 10mM 인산완충액(pH 2.6) (32:68)

유속 : 1.0mL/min

주입량 : 10 μ L