

## HPLC를 이용한 당류의 동시분석법

허부홍, 서형석, 김성문, 김영진, 조종후\*, 노수일

전라북도 축산진흥연구소, 전북대학교 수의과대학\*

## Simultaneous analysis of sugars by HPLC

Boo-Hong Hur, Heyng-Seok Seo, Seong-Moon Kim,  
Young-Jin Kim, Jong-Hoo Cho\*, Soo-Il Roh

Chonbuk Livestock Development and Research Institute  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University\*

### Abstract

In order to develop a good separation and simultaneous analysis of different sugar in an artificial mixed sugar solution, we analyzed 10 sugar components in an artificial mixed sugar solution composed of fructose, glucose, mannitol, sucrose, maltose, lactose, xylose, xylitol, erythritol, and trehalose with using HPLC-ELSD or HPLC-RI.

Separation and quantification by HPLC-ELSD was superior to those by HPLC-RI and detection sensitivity by HPLC-ELSD was higher than that by HPLC-RI as microgram( $\mu\text{g}$ ) level.

1. The units of minimal detectable limits were showed  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and  $\text{ng}/\text{ml}$  by the HPLC-RI and HPLC-ELSD, respectively.
2. The condition of ELSD was drift tube temperature  $82^\circ\text{C}$ ,  $\text{N}_2$  gas flow rate 2.10 SLPM, and column oven temperature  $30^\circ\text{C}$ , respectively. Isolation and recovery rates of single sugar from the multiple sugar solution was higher at the condition (time : flow rate : D.W. : ACN MeOH, min : ml/min : v : v : v) of linear gradient elution of mobile phase as 0 : 1.00 : 15 : 85 : 0, 1 : 1.00 : 6 : 90 : 4, 17 : 1.00 : 10 : 70 : 20, 28 : 1.00 : 15 : 85 : 0 and 35 : 1.00 : 15 : 85 : 0, in order.

Key words : Sugar, analysis, HPLC-ELSD, HPLC-RI

### 서 론

가공식품중에 첨가하는 당류는 주로 glucose, fructose, sucrose 및 maltose 등이나 제품의 특

성에 따라 첨가하는 당의 종류도 다양화되는 경향이다 즉, 유제품의 경우에는 lactose를 함유하고있으며, 과일즙을 함유하는 식품 또는 음료에는 sucrose, glucose, fructose, galactose,

xylose, arabinose 등의 당과 sorbitol과 같은 당 알콜류 등을 첨가하여<sup>1,2)</sup>, 어린이들의 기호에 맞도록 가공한 우유, 가공유, 분유, 아이스크림, 발효유 등의 식품에는 주로 인공의 당류를 첨가하거나 과일 잼 등을 혼합하여 생산하고 있어, 이들 제품에서 당류를 분리, 측정하기는 매우 어렵다<sup>3)</sup>.

가공식품에서 이들 당류는 주로 high performance liquid chromatograph(HPLC)의 refractive index detector(RI) 또는 gas chromatograph(GC)를 이용한 분석법이 이용되고 있으나, 검출감도가 낮아 미량분석에 적합치 않으며 특히, GC는 주로 잼, 영양갱, 비스킷, 크래커, 쥬스 등의 가공식품에 적용하고 있으나, 시료를 감압 건조한 후 성분들을 TMS 유도체화 처리 등 전처리 과정이 복잡하여 실험 결과의 오차가 큰 것으로 보고되었다<sup>3,4)</sup>.

따라서 최근에는 evaporative light scattering detector(ELSD)를 이용한 검출법이 이용되고 있다. ELSD는 lipids, carbohydrates, surfactant 등과 같은 이동상 보다 비휘발성인 물질의 검출이 용이하며, 특히 기울기 용리로 분리능을 향상시켜 검출함으로써 단당류에서 올리고당류까지의 동시분리가 가능할 것으로 기대하고 있다. 이에 따라 본 실험에서 HPLC-ELSD법에 의한 각종 당류 혼합액중의 당 분리능과 측정 회수율을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

분석할 당 용액의 제조에 사용할 당 표준품

은 glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, xylose, trhalose 등을, 당알콜류는 mannitol, xylitol, erythritol 등의 제품(Chem Service Co., USA)을 사용하였다. 한편, 이동상으로 사용할 acetonitrile(ACN)과 methanol(MeOH)은 HPLC grade(JT Baker Co., USA)를, 증류수(DW)는 초순수제조장치(Barnstead Co., USA)로 제조한 증류수를 사용하였다.

### 시험용액

각 표준당류 1g씩을 각기 50ml 메스플라스크에 취하고 증류수 25ml를 가하여 용해시킨 후 ACN으로 표선까지 채워 보존용액을 제조하여 냉장보존하면서 분석에 적용할 당용액은 2mg/ml로 희석하였고, 혼합시험용액은 각 당이 ml당 5, 10, 20 $\mu$ g이 되도록 혼합하여 사용하였다.

### 이동상

등매용리를 위한 적절한 이동상의 선택을 위하여 ACN:MeOH:DW의 비율을 달리하는 8종의 이동상을 Table 1과 같이 제조하여 사용하였다. 최단시간에 최상의 당분리조건을 확립하기 위하여 등매용리에 의한 결과로부터 세가지 기울기 용리조건을 설정하였으며, 그 방법들은 Table 2와 같다. 제조한 각각 이동상은 0.5  $\mu$ m filter로 여과한 후 helium gas를 불어넣어 잔존 반응성 기체를 제거하여 사용하였다.

### 분석기기

당분리를 위한 분석기기는 Waters 2690 HPLC system(Waters Co., USA)을, 검출기는 500 ELSD(Alltech Co., USA)를, ELSD에 의한

Table 1. Experimental conditions for isocratic elution by HPLC

	Method							
	A	B	C	D	E	F	G	H
ACN	75	77	77	80	80	85	85	90
DW	25	23	21	20	18	15	15	10
MeOH	0	0	2	0	2	0	2	0
Flow	1	1	1	1	1	1	1	1
Min	15	20	20	25	25	40	40	100

Table 2. Experimental conditions for gradient elution by HPLC

G-1*					G-2					G-3				
Time /min	Flow	DW	ACN	MeOH	Time /min	Flow	DW	ACN	MeOH	Time /min	Flow	DW	ACN	MeOH
0	1.00	15	85	0	0	1.00	15	85	0	0	1.00	15	85	0
1:00	1.00	6	90	4	1:00	1.00	6	90	4	1:00	1.00	6	90	4
17:00	1.00	10	70	20	20:00	1.00	5	85	10	20:00	1.00	10	70	20
28:00	1.00	15	85	0	30:00	1.00	15	85	0	30:00	1.00	15	85	0
35:00	1.00	15	85	0	35:00	1.00	15	85	0	35:00	1.00	15	85	0

\*: G-1, G-2 and G-3 were condition for gradient elution method.

결과를 비교하기 위해서는 RI 410(Waters Co., USA)을 각각 이용하였다. 이 때 컬럼은 Alltima NH<sub>2</sub>(5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm ID, Alltech Co., USA)를 사용하였다.

#### 검출기의 조건

HPLC-ELSD의 조건은 drift tube 온도가 82°C, N<sub>2</sub> gas flow는 2.10 SLPM, 칼람오븐 온도는 30°C, RI에서의 칼람오븐 온도는 30°C으로 각각 조정하였다.

### 결과 및 고찰

#### ELSD를 이용한 각종 당표준품의 검출시간

각 당의 기울기 용리조건을 설정하기 위하여 ELSD를 이용하여 drift tube 온도가 82°C, N<sub>2</sub> gas flow는 2.10 SLPM, 컬럼 오븐 온도는 30°C의 조건에서 1,000 $\mu$ g/ml의 당 용액 10 $\mu$ l를 주입하여 Table 1의 등매 용리 및 Table 2의 기울기 용리시켜 얻은 각 당의 용리시간은 Fig 1과 같다.

즉, 조건 A와 B의 경우 5~8분대에서 erythritol, xylose, xylitol, fructose, glucose, mannitol 등이, 9~11분대에서 sucrose, maltose, lactose, trehalose 등의 검출 시간대를 형성하였으나, 분리능은 좋지 않았다. C에서는 erythritol과 xylose, xylitol과 fructose, glucose와 mannitol, lactose와 trehalose의 검출시간대가 유사하였다. 그리고 D와 E에서는 erythritol

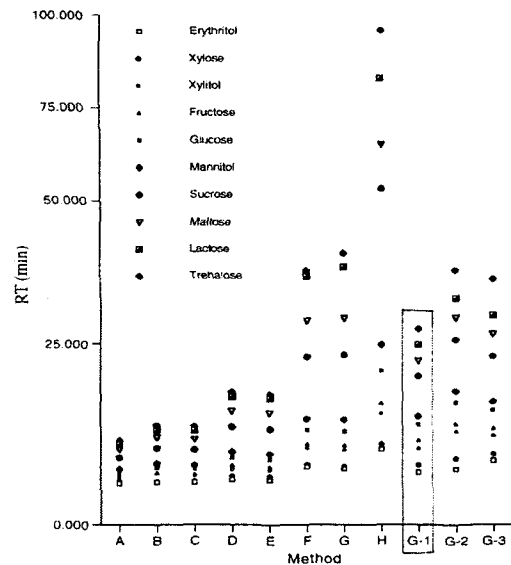


Fig 1. Separative comparison of sugars by HPLC-ELSD using selected mobile phases.

xylose, xylitol과 fructose, glucose와 mannitol, lactose와 trehalose의 검출시간대가 유사하였으며, 나머지는 완전하게 분리되었다. 또한, F와 G에서는 erythritol과 xylose이, xylitol과 fructose, lactose와 trehalose의 검출시간대가 유사하였으나 나머지는 분리가 우수하였으며, MeOH를 가하지 않은 경우 검출시간이 35분대에 마지막 물질이 분리된 반면, 가한 경우는 검출시간이 37분대로 비교적 늦게 검출됨을 알 수 있었다. 또한 H에서는 완전한 분리를 보였으나

마지막 검출 시간이 97분대까지로 매우 늦게 검출됨을 알 수 있었다.

한편 Table 1의 조건을 이용하여 분석한 결과로 Table 2의 기울기 용리조건을 찾을 수 있었으며 이를 이용하여 분석한 결과는 G-1의 조건으로 분석하였을 때 검출시간은 7.224분에서 27.027분대이었으며, 이때 면적비는 18200451에서 33575050로 나타났다. G-2의 경우에는 7.701분에서 35.181분대이었고, 면적비는 6792289에서 34971451로 나타났다. 한편 G-3의 경우 8.834분에서 33.931분대로 면적비는 14864378에서 34794699로 나타났다.

이와 같은 결과로 미루어 볼 때 기울기 용리 조건에서 G-1의 경우가 검출시간이 짧으면서 면적비가 일정하게 분포되어있어 분석조건이 가장 적절하다고 판단되었다.

#### ELSD와 RI에 의한 검출 시간 및 면적비 비교

ELSD와 RI를 이용하여 분석한 당 표준품의 검출량을 비교하고자 Table 1의 D와 E의 등매 용리 조건으로 분석한 결과는 Table 3과 같다.

위의 비교 분석 결과에서 보면, ELSD는 기울기 용리가 가능하지만, RI의 경우는 기울기 용리가 불가능하여 등매용리 조건으로 분석하였으며, 또한 검출감도의 차이가 심하여 표준품의

농도와 주입량의 조건을 각각으로 하여 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 주입량을 10 $\mu\text{l}$ 로 분석하였다. 그 결과 검출 시간대가 ELSD에서는 6분대에서 23분대인데 반하여, RI는 5분대에서 17분대까지로 비교적 짧았다. 그러나 검출량은 ELSD에서는 1,140.8에서 361.5, RI에서는 17.3에서 5.4로 ELSD의 감도가 200배정도 높은 것으로 나타났다.

#### 검량선의 작성

Table 2의 method G-1의 조건에서 eryth-

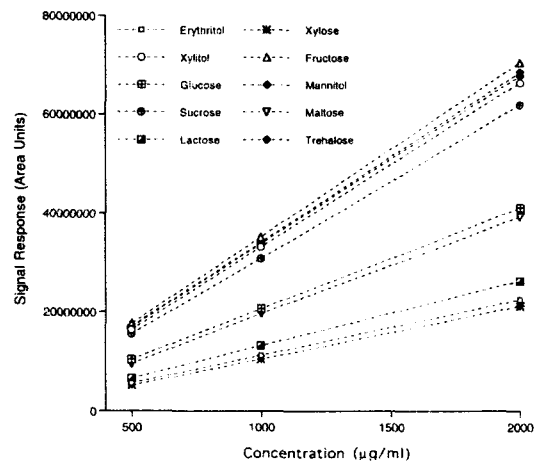


Fig 2. Calibration curve of various sugars

Table 3. Comparison of areas of standard sugar in isocratic elution by the HPLC-ELSD and RI

Detector	Mobile	Standard sugar solution									
	phase	Erythritol	Xylose	Xylitol	Fructose	Glucose	Mannitol	Sucrose	Maltose	Lactose	Trehalose
RT*											
ELSD	D	6.8	7.1	8.5	8.9	10.0	11.0	15.6	18.2	20.8	21.8
	E	6.6	6.9	8.4	8.8	10.2	11.0	16.0	18.8	21.5	23.7
RI	D	5.6	5.8	7.1	7.18	8.2	8.8	12.3	14.4	16.9	17.0
	E	5.4	5.6	6.8	6.9	8.0	8.6	12.2	14.4	16.9	17.3
Area											
ELSD	D	885.0	507.9	885.0	507.9	885.0	507.9	885.0	507.9	885.0	507.9
	E	845.0	361.5	1,140.8	894.6	567.7	410.9	780.2	414.7	843.4	403.3
RI	D	5.6	5.8	7.1	7.18	8.2	8.8	12.3	14.4	16.9	17.0
	E	5.4	5.6	6.8	6.9	8.0	8.6	12.2	14.4	16.9	17.3

\*RT : retention time.

Table 4. Recovery area of the spiked standard solution(1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Sugars	Recovery percentages							Mean	SD(%)
Erythritol	114.16	88.92	88.20	93.19	95.13	89.60	92.62	94.54	9.53
Xylose	109.96	88.53	86.73	95.11	90.19	87.35	93.46	93.05	8.68
Xylitol	100.40	98.57	99.34	101.40	102.15	102.49	100.72	100.72	1.42
Fructose	99.96	96.89	100.05	100.14	99.64	101.15	100.33	99.74	1.34
Glucose	100.29	94.18	98.38	100.86	101.14	102.57	101.90	99.90	2.85
Mannitol	100.03	95.29	97.75	98.48	98.49	99.32	97.80	98.17	1.53
Sucrose	99.91	95.87	97.51	97.26	97.77	98.27	97.27	97.69	1.25
Maltose	100.86	96.70	98.86	99.09	98.82	99.92	98.49	98.96	1.30
Lactose	100.20	98.07	100.02	100.34	99.88	100.98	99.60	99.87	0.90
Trehalose	99.85	99.60	101.12	100.79	101.04	101.43	100.06	100.55	0.71

ritol, xylose, xylitol, fructose, glucose, mannitol, sucrose, maltose, lactose 및 trehalose의 혼합표준액을 각각 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 분석하여 얻은 피크면적을 축으로 한 검량선은 양호한 직선을 나타내었다 (Fig 2). 그 해당 농도를 횡축으로 하였을 때, 크로마토그램은 Fig 3과 같다.

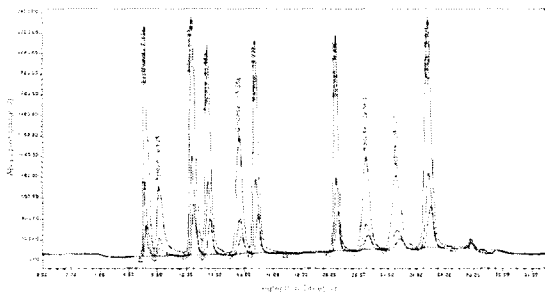


Fig 3. Chromatogram of mixed of standard sugar solution

#### 회수율의 검토

실험하였던 당 표준품에 대하여 분석조건 (Table 2의 G-1)에 대한 회수율을 확인하고자 다종의 당표준품 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 이용하여 7회 분석한 RSD의 결과는 Table 4와 같다.

각각의 평균회수율이 100.72%에서 93.05%까지로 매우 양호하였다.

이상의 결과에서 혼합 당표준액을 ELSD를

이용하여 기율기 용리조건으로 분석하였을 때 재현성이 높음을 알 수 있었다.

#### 결 론

당류 (fructose, glucose, mannitol, sucrose, maltose, lactose, xylose, xylitol, erythritol, trehalose) 표준액을 혼합하고, 각각의 당을 동시에 분석하고자 HPLC-RI와 HPLC-ELSD를 비교한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HPLC-RI에서는 당류를  $\mu\text{g}/\text{ml}$  단위로, HPLC-ELSD에서는 ng/ml까지 분석이 가능하였다.
2. HPLC-ELSD의 경우에는 drift tube 온도 82 $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{N}_2$  gas flow 2.10 SLPM, 컬럼 오븐 온도 300 $^{\circ}\text{C}$ 의 조건과 이동상의 기율기 용리 조건[시간 : 유속 : D.W. : ACN : MeOH (min : ml/min : v : v : v)]을 0 : 1.00 : 15 : 85 : 0, 1 : 1.00 : 6 : 90 : 4, 17 : 1.00 : 10 : 70 : 20 : 28 : 1.00 : 15 : 85 : 0 및 35 : 1.00 : 15 : 85 : 0으로 설정하여 분석한 바 분리능과 회수율이 가장 높았고, 시간과 경비를 줄일 수 있었다.

#### 참고문헌

1. 강인수, 김정숙, 성태수 등. 1997. 현대식품

- 화학, 지구문화사. 서울:21~65.
2. 채수규. 1998. 표준식품분석학, 이론 및 실습. 지구문화사. 서울:370~419.
  3. 일본식품공업학회. 1982. 식품분석법. 일본식품공업학회. 식품분석법편집위원회편:167~237.
  4. 강은미, 명노홍, 고숙경 등. 1997. Bio-Lc를 이용한 아미노산 수액중 당알콜 분석. 서울특별시 보건환경연구원보:33:50~57.