

HPLC에 의한 柑橘中の 遊離糖 定量

柳長杰*, 康順善**, 高正殷, 金瑛淑***

Determination of Free Sugars in Mandarin Juice by HPLC

U. Zang-kual, Kang Soon-seon**
Koh Jeong-eun, Kim young-sook****

Summary

In order to minimize the cost of sugar analysis of mandarin juice by HPLC, some conditions related were discussed using Waters, M246 HPLC main body with R-401 RI-detector(x8), M510 pumping system, U6K injector, M730 Data Module, μ Bondapak NH₂ column (3.9mm×30cm), Sep-Pak C₁₈ cartridge and acetonitrile/H₂O solvent system.

- 1) The most suitable conditions to save acetonitrile solvent were obtained at 1.0ml/min of the flow rate of 75% acetonitrile in H₂O.
- 2) The Sep-Pak C₁₈ cartridge, used once, can be washed out by using 4ml of H₂O under the conditions of the present study. When the washed Sep-Pak cartridges wetted with H₂O were passed through with 3ml of the new sugar sample, there was no dilution effect found and nearly 100% sugar yield in the filtrate.
- 3) Up to 140 μ g of sugars (fructose, glucose, sucrose) there was good linear relationship between the injected amounts and the analyzed values.
- 4) It was found that mannitol can not be used as the internal sugar standard because of overlapping with glucose chromatogram in HPLC under the present conditions.

序 論

柑橘汁의 遊離糖 定量은 Somogyi法이나 굴절계 (refractometer)에 의해서 그동안 많이 이루어졌으며 종이크로마토그래프(paper chromatograph), 박층크로마토그래프(Thin Layer Chromatograph, TLC)등

도 정성내지는 定量目的으로 사용되어 왔다(Stahl, 1969). 특히 定性의 目的으로 가스크로마토그래프 (Gas-Liquid Chromatograph, GLC)가 많이 이용되었지만 시료를 氣化시키는 조작의 번거로움이 단점으로 지적되고 있다.

최근 고성능液體크로마토그래프(Liquid-Liquid Chromatograph, LLC)의 分析 성능이 급속히 발전됨

農科大學 副教授*, 農科大學 教授**, 農科大學 助教***

과 동시에 HPLC에 의한 遊離糖의 신속하고 정확한 分析方法이 개발되어 왔다 (Conrad *et al.* 1976) (Nikolov *et al.* 1984) (Nomura *et al.* 1984). 그러나 HPLC는 다른 分析方法에 비해서 비교적 分析費가 많이 요구된다는 단점이 있으므로 시료조제방법이나 溶媒의 농도 및 용출속도를 조절할 필요가 있게 된다.

本 研究에서는 柑橘汁중의 遊離糖 定量을 위해서 불순물 제거용 Sep-Pak C₁₈, μ Bondapak NH₂ column과 acetonitrile 溶媒를 이용하는 방법에 대해서 分析條件을 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 供試材料

柑橘汁은 조생종 온주 밀감을 9월 20~25일 사이에 제주대학교 농과대학 감귤원에서 채집하여 果皮를 벗기고 果肉을 blender에서 20분간 組織을 파파시킨뒤에 동양여지 No. 5B로 여과하고 濃液을 5000rpm에서 20분간 원심분리시켜 上澄液을 다시 sample clarification kit(0.45 μ m)에 통과시켜 입자성분을 제거하고 Sep-Pak C₁₈ cartridge에서 타성분을 吸着시킨뒤에 LLC에 주입시켰다.

2. 溶媒 및 표준試藥 調製

溶媒는 HPLC用 acetonitrile(Burdick & Jackson Co.)과 HPLC用 물(Cica 제품)을 혼합해서 60%, 70%, 75%, 80%, 90%의 acetonitrile 용액을 만들어 0.5 μ m 막여과기로 진공 여과해서 사용했다.

표준糖은 fructose, glucose, sucrose 특급시약(Kanto Chem.Co.)을 사용해서 3% 농도의 단일성분 및 혼합성분을 갖도록 調製했고 0.45 μ m 막을 통과시킨뒤 사용했다.

3. 사용機器

Model 246 Liquid Chromatograph(Waters Product Division, Millipore Ltd. UK)를 본체로 하고

injector는 Mode¹ U6K, 檢出器는 differential refractometer R-401, 기록 및 연산장치는 M730 data module, pumping system은 Model 510, column은 μ Bondapak NH₂(3.9mm \times 30cm)형이었다.

4. 分析條件

Injection volume은 4 μ l를 기준으로 하고 flow rate는 1.0ml/min~1.3ml/min 사이였으며 RI 檢出器의 감도는 x8, chart speed는 0.5cm/min, noise rejection은 2000, 그 외의 分析 parameters는 default values에서 시행했다. 용매는 acetonitrile 수용액으로 농도범위는 60%~90%이었고 분석도중의 실내온도는 23 \pm 1 $^{\circ}$ C이었다.

5. Sep-Pak C₁₈에 의한 불순물제거

柑橘汁중에 遊離糖 이외의 有機酸, 無機物을 제거하기 위해서 Sep-Pak C₁₈에 1.에서 얻은 시료액을 1ml씩 4번 연속적으로 통과시켜서 4개의 分割중에 존재하는 遊離糖 含量을 정량하고 이 Sep-Pak cartridge를 다시 사용하기 위해서 H₂O로 2ml씩 연속 세척해서 糖이 나오지 않을때를 찾았다.

6. 試料주입 적정량 및 내부표준물질로서의 mannitol 사용 檢討

LLC에 주입되는 糖試料의 μ g과 檢出되는 결과와의 직선성을 보기위해서 3% 표준시료 糖溶液을 0.5 μ l, 1.0 μ l, 1.5 μ l, 2.0 μ l, 2.5 μ l, 3.0 μ l, 3.5 μ l, 4.0 μ l, 4.5 μ l씩 주입시키고 외부표준시료방법(external standard quantitation method)로 직선성을 檢討했다.

가스크로마토그래프에서는 mannitol을 내부표준물질로 사용하므로 이 방법에 대해서도 3% mannitol 용액으로 檢討했다.

結果 및 考察

1. Acetonitrile 溶媒의 농도와 流速에 따른 retention time 및 分離能 變化

acetonitrile과 물의 혼합비에 따른 retention time

관계는 Fig. 1에서와 같이 물함량이 많을수록 짧아졌고 반대로 acetonitrile 함량이 커질수록 retention time은 길어졌다. 반면에 resolution은 acetonitrile 농도가 많을수록 좋아졌는데 溶媒의 flowrate(ml/min)에 의해서도 영향을 받았다. acetonitrile 60%

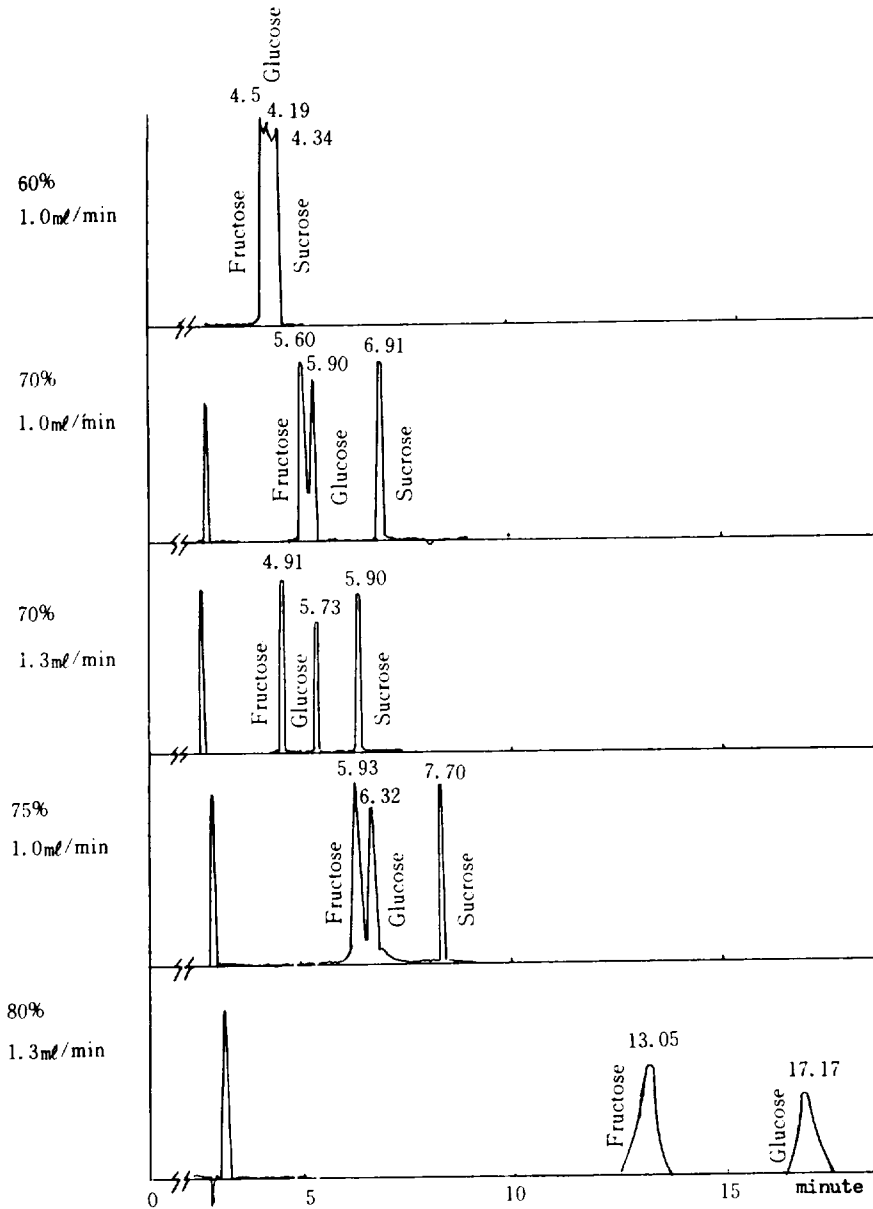


Fig. 1. Changes of resolution and retention time (min.) of sugars related to acetonitrile concentration

에서는 너무 retention time이 짧아서 分離가 불가능했고 70%에서는 1.0ml/min에서 fructose와 glucose 사이의 分離가 조금 불안전했으며 sucrose는 잘 分離되었고 1.3ml/min의 조건에서는 세가지 糖이 모두 잘 分離되었다. 농도를 75%로 하고 1.0ml/min의 속도로 용매를 흘려주었을 때는 fructose와 glucose가 70%일때 보다 더 잘 分離되었다. 그러나 이들간의 分離를 더욱더 완벽하게 하기 위해서는 溶媒의 유속을 0.1ml 증가시키는 것 보다는 acetonitrile 농도를 75% 보다 1~2% 높여주는 것이 溶媒를 절약하면서 좋은 分解능을 얻기위해 합리적이라고 생각된다.

80% 농도에서는 용매의 유속을 1.3ml/min로 해주어도 glucose의 retention time이 17분 정도이어서 sucrose peak를 얻기에는 너무 많은 시간이 소요될 것으로 溶媒와 時間을 절약한다는 면에서 좋지않은 방법으로 생각된다. 최 등(1981)은 carbohydrate analysis column을 사용했을 때 acetonitrile: H₂O를 84:16(V/V)로 하고 유속을 2.0ml/min 했을때가 sugar 分析에 最適의 조건이라고 한바있지만 μ Bondapak NH₂ column을 사용한 본 實驗의 경우에는 溶媒의 농도 및 最適 조건이 다르며 μ Bondapak NH₂를 사용하는 것이 acetonitrile 溶媒를 많이 절약할 수 있을 것으로 생각된다. 결국 70% 농도에서 1.3ml/min 유속으로 할때는 완벽한 分離능을 갖게 되지만 1분당 0.91ml의 溶媒를 소비하게 되고 75% 보다 2% 증가시킨 77%에서 1.0ml/min 유속으로 分析하면 0.77ml의 溶媒만이 필요케 되므로 분석 시간이 제일 긴 sucrose가 시료당 약 2분 더 걸리는 것을 감수한다면 후자의 경우가 유리하다고 본다.

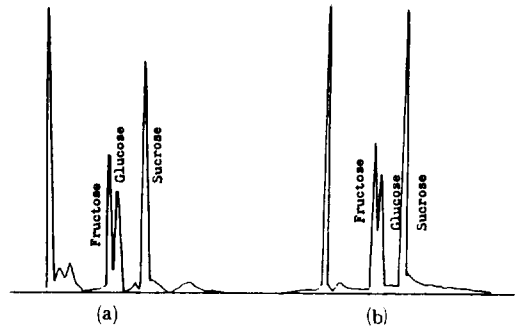


Fig. 2. Liquid chromatograms before (a) and after (b) treating the mandarin juice with Sep-Pak C₁₈

2. Sep-Pak C₁₈에 의한 糖 이외의 물질除去

柑橘汁은 단백질의 含量이 적기 때문에 별도로 제 단백질 需要는 없지만 有機酸이나 무기성분에 의한 noise를 없애고 column의 수명을 연장하기 위해서 시료를 Sep-Pak C₁₈으로 처리했다. 처리하기전과 처리한 뒤의 分析結果는 Fig.2에서 보는 바와 같이 Sep-Pak C₁₈에 의해 糖이외의 물질들이 많이 감소하고 있음을 알 수 있다. 그러나 Sep-Pak C₁₈은 개당 3000원 이상의 고가이기에 일회만 사용할 수는 없으므로 연속 사용법에 대해서도 檢討하였다. Table 1에서와 같이 우선 Sep-Pak C₁₈에 표준시료와 柑橘汁液 시료를 통과시킬 때 sugar의 흡착에 의한 糖含量 감소 여부를 알기위해서 약 1ml씩 4번 연속 통과시키고 그 分割들에 대한 sugar 含量을 정량

Table 1. Sugar yield (%) in the filtrates when 1ml of sugar samples were filtrated through Sep-Pak C₁₈ cartridges four times in a row

Fraction	Standard Sample			Juice Sample		
	Fructose	Glucose	Sucrose	Fructose	Glucose	Sucrose
1 st	98.7	99.9	99.9	86.0	89.2	89.4
2 nd	98.8	98.8	100.0	96.4	98.3	99.0
3 rd	99.2	100.0	100.3	99.2	99.4	99.2
4 th	99.0	100.2	102.1	99.1	99.6	99.6

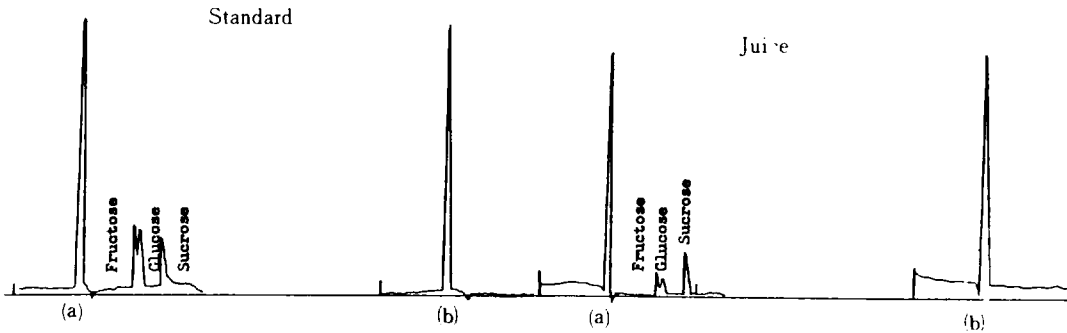


Fig. 3. Washing degree of Sep-Pak C₁₈ cartridges with H₂O at the first time (a) and the second time (b) after sugar samples being passed through.

했던 바로는 Sep-Pak에 의해 흡착되어 sugar가 감량되지 않고 통과된 여액에 거의 100%에 가까운 yield를 얻을 수 있었다. 단 juice 시료의 경우 첫 번째 分割(맨처음 1ml 시료액을 통과시켜서 나온 여

액)에서 농도가 86~89%로 감소되는 것은 Sep-Pak cartridge를 이미 표준 試料에서 사용하고 난뒤에 물로 충분히 세척해서 Sep-Pak cartridge가 약간의 물에 적셔져 있었기에 juice 試料이 회석되었을 것으로 생각되고 3회 부터는 100%에 가까운 yield를 얻을 수 있었다.

한번 사용된 Sep-Pak을 H₂O로 sugar를 세척해서 재사용할 수 있는지를 확인하기 위해서 H₂O 2ml씩 통과시켜서 1회 세척액과 2회 세척액 중의 sugar 농도를 HPLC로 定量한 결과는 Fig. 3에서 보는바와 같이 2ml로 1회 세척했을 때는 약간의 sugar가 세척액에 있지만 2회째에서는 sugar peak를 확인할 수 없었다. 때문에 糖試料을 Sep-Pak cartridge에 통과시켜 사용한 뒤에 물로 2ml씩 2회 세척하면 재사용할 수 있을 것으로 생각된다.

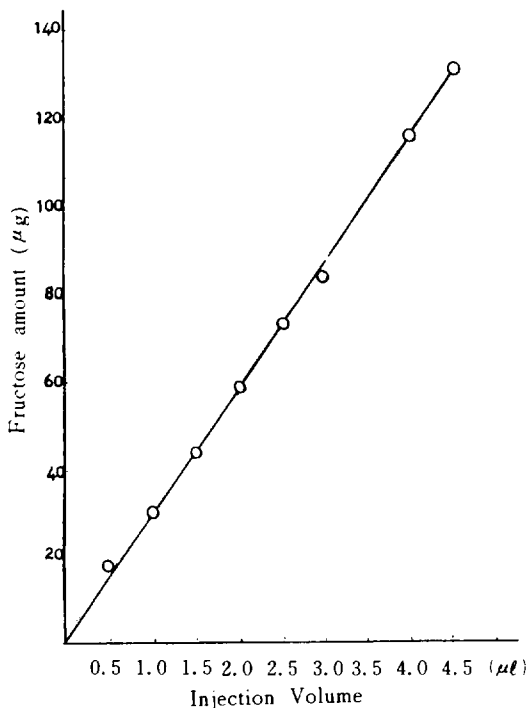


Fig. 4. Relationship between the injected volumes and the sugar amounts calculated by the external standard quantitation method (o; Average of three replicates)

3. 試料주입 適定量

HPLC injector에 주입해주는 糖試料량의 적정치를 알기위해서 fructose, glucose, sucrose가 각각 3%씩 함유된 표준糖溶液 0.5 μl~4.5 μl를 주입하고 외부표준試料法(external standard quantitation method)으로 分析하여 Fig. 4에 graph로 나타냈다. fructose 이외에 glucose와 sucrose도 fructose와 동일한 graph이었으므로 本 論文에서는 생략하였다. 本 實驗에서 시도한 140 μg 이내의 sugar量까지는 직선성이 좋은 결과를 나타내었다.

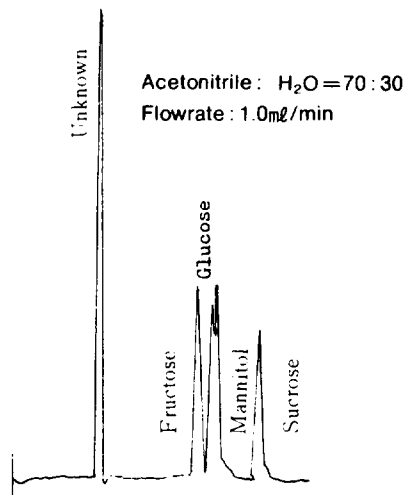


Fig. 5. Fructose is overlapped by the mannitol chromatogram

외부표준시료법은 주입량을 매번 정확히 동일하게 할 수 없기 때문에 실험수행자의 숙달에 의해서 그 정확도가 결정된다. 따라서 기체크로마토그래프의 경우에는 mannitol을 내부표준물질로 사용하고 있는 바 이를 LLC에 실험해본 결과 Fig. 5에서 보는바와 같이 glucose와의 分離가 곤란하기 때문에 HPLC에서는 mannitol을 내부표준試料로 사용할 수

없음을 알 수 있다.

摘 要

HPLC에 의한 分析에서 가장 많은 經費를 부담케 하는 것중의 하나가 溶媒이기 때문에 이와같은 점에서 柑橋汁중의 遊離糖 分析을 하는데 관련되는 몇가지 조건을 檢討한 結果는 다음과 같았으며 사용機器는 Waters 회사 제품의 본체에 μ Bondapak NH₂ column, RI detector (x8)이었고 溶媒로는 acetonitrile/H₂O system을 사용했다.

1. 75%의 acetonitrile 농도에서 1.0ml/min의 유속이 용매를 절약하는데 가장 경제적인 조건이었다.
2. 시료중의 불순물을 제거하기 위해서 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 사용할 경우 糖시료를 한번 통과시킨 뒤에 4ml의 H₂O로 세척하면 재사용이 가능했다. H₂O로 세척된 cartridge에는 다음 시료를 3ml 통과시킨뒤에 나오는 시료액을 injection sample로 사용하면 안전하다.
3. 시료주입량을 보면 fructose, glucose, sucrose 모두 140 μ g 까지 주입해도 좋은 직선성의 결과를 얻을 수 있었다.
4. 본 실험 조건의 HPLC에 의한 糖분석에서 glucose와 mannitol의 分離가 좋지 않으므로 내부표준물질로 mannitol을 사용하는 것은 부적당하다.

參 考 文 獻

최진호, 장진규, 박길동, 박명환, 오성기, 1981, 고속액체크로마토그래프에 의한 인삼 및 인삼제품중의 유리당 성량. 한국식품공학회지, 13(2): 107-112.

Conrad, E. C., J. K., Palmer. 1976. Rapid Analysis of Carbohydrates by High-Pressure Liquid Chromatography. Food Technology, 30(10): 84-92.

Nikolov, 'Z. L., J. B., Jakovljevic', J. B., Boškov, Z. M., Boškov. Nov Sad, 1984. High Performance Liquid Chromatographic Separation of Oligosaccharides using Amine Modified Silica Columns. Starch/stärke, 36: 97-100.

Nomura, N. S., J. A., Kuhnle, H. W., Hilton, 1984. Clean-up procedures for the HPLC analysis of sucrose, glucose and fructose in Hawaiian

Sugar cane products. INT. JNL., 86(1029):
244-250.

Springer-Verlag Berlin. Heidelberg New York.
2nd ed: 812-813.

Stahl, E., 1969. Thin-Layer Chromatography.