

HPLC를 이용한 음료중의 인공감미료 분석

조한빈·송영미·박경애·손여준·김덕인

서울시보건환경연구원

서론

人工甘味料(artificial sweeteners)는 대부분의 종류가 천연감미료인 설탕에 비하여 단맛이 강하고, 값이 싼 장점 외에도, 미생물에 의해서 발효될 염려가 없고, 갈변하지 않으며, 운반, 보관, 취급 등이 간편하고 특히 그 자체가 칼로리源이 되지 않으므로 당뇨병과 비만을 방지하는 등 여러 가지 특징이 있기 때문에 식품의 제조, 가공 또는 조리에 많이 사용되고 있다. 천연감미료는 수요에 비하여 생산에 한계가 있고 또한 용도에 제한을 받기 때문에 19세기말부터 감미료 합성연구가 시작되어 설탕의 250-500배의 단맛을 가진 saccharin이나 dulcin 또는 4000배의 단맛을 가진 p-4000(5-nitro-2-proxyaniline)등 여러 종류의 감미료가 생산 사용되기에 이르렀지만 최근에 합성감미료의 급성독성뿐 아니라 발암성, 催奇形性, 유전자에 미치는 영향 등이 문제가 되어서 실제 이용 가능한 것은 대단히 적다. 대표적인 예로 cyclamate, saccharin등이 있는데, cyclamate의 경우 1960년대 말까지 널리 사용되었던 감미료로서 그 대사물질인 cyclohexylamine이 방광암의 원인이 되는 물질이며, 1969년 mouse에서 발암성이 확인 되었다. saccharine은 그 분해산물 중의 benzen sulfonamide와 같은 방향족화합물이 발암성을 나타낼수 있다.

인공감미료 분석법은 GC/MS를 이용하여 saccharin을 분석한 논문도 있지만, 아직까지는 liquid chromatography를 가장 많이 이용하고 있다.

Lawrence 등은 gradient mobile phase 와 post-column method를 사용하여 7종의 인공감미료를 동시분석하였고, Tyler 등은 saccharin과 aspartam, 음료중의 caffeine, sodium benzoate의 HPLC분석법을 보고하였다.

본 연구에서는 가장 많이 쓰이는 saccharin Na, dulcin, aspartam 및 acesulfam K와 탄산음료중의 caffeine을 분리하여 음료중의 인공감미료를 동시분석 할 수 있는 HPLC의 적정 조건을 찾아보았다. C18 reverse phase column을 이용하였고, 메탄올(10% tetrapropylammonium hydroxide) 함량을 30% ~ 50%로 변화시키며 분리가 잘되는 조건을 찾았고, 그 후 40% 메탄올(10% tetrapropylammonium hydroxide)의 pH를 3.5, 4.0, 4.5로 변화시켜가며 4가지 인공감미료와 카페인의 분리도를 관찰하여 분리도와 실험에 소요되는 분석시간 등을 알아보고, 이 분석조건이 실제 음료에서 이용될 수 있는지 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

탄산음료 2종(사이다, 콜라), 식이섬유음료 1종 및 이온음료 1종을 시료로 사용하였다. 표준품으로 Wako Tokyo, Japan 제품을 사용하였고, 시약은 HPLC grade의 메탄올 (J.T Baker, USA)을 사용하였다.

2. 기 기

Waters사의 HPLC로서 Rheodyne Injector, Waters 510 Pump, Waters 486 UV detector, HP 3396 series II Integrator를 사용하였다.

Table 1. Analytical Condition of HPLC

Column	CAPCELL PAK C18 (SHISEIDO CO., LTD)
Detector	Waters 486 (UV 210nm)
Chart speed	0.5cm/min
Attenuate	5
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	5 μ l
Mobil phase	40% Methanol(TPA-OH), pH 4.5 adjusted

3. 회수율 측정

인공감미료가 첨가되지 않은 시판음료를 구입하여 확인시험을 실시하였고, 탄산음료 2종(사이다, 콜라)에 대하여는 1시간동안 sonication하여 CO₂를 제거하고 하루밤 방치한 후 시험재료로 사용하였고, 식이섬유음료 및 이온음료는 전처리하지 않고 사용하였다. 이들 시료에 4종의 인공감미료 stock solution을 1:1로 혼합하여 잘 섞은후, 10ml를 취하여 메탄올로 희석하여 50ml로 하여 인공감미료의 최종농도가 5ppm이 되도록 한 후 0.45 μ m filter로 여과하여, Table 1의 분석조건에서 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 분석조건 설정

1) 이동상의 메탄올 농도가 분리도에 미치는 영향

이동상의 메탄올 농도를 30, 40, 50%(v/v)로 변화시키면서 4종의 인공감미료의 분리도와 retention time을 관찰하였다. 50%메탄올(TPA-OH)를 이동상으로 하였을 때 acesulfam K와 saccharin Na의 peak는 명확히 분리되지 않았고, aspartam과 dulcin은 각각 분리되었다. 40%메탄올(TPA-OH)과 30%메탄올(TPA-OH)에서는 4종의 인공감미료가 모두 분리되었지만, 총 분석시간은 40%메탄올(TPA-OH)에서는 9분 이내였고, 30%메탄올(TPA-OH)

에서는 16분 정도로 분석시간과 분리도를 고려하여 이동상의 메탄올 농도는 40%로 결정하였다.

Table 2. Comparison of retention time by MeOH content of mobil phase

unit : min.

Compound	30%MeOH(TPA-OH)	40%MeOH(TPA-OH)	50%MeOH(TPA-OH)
Acesulfam K	5.34	3.82	3.26
Saccharin Na	6.94	4.31	3.47
Aspartam	11.00	6.00	4.12
Dulcin	15.87	8.27	5.49

2) 이동상의 pH가 분리도에 미치는 영향

이동상의 메탄올을 40%로 결정한후 pH의 영향을 살펴보기 위해 인산으로 각각 pH 3.5, 4.0, 4.5로 변화시켜 4종의 인공감미료와 카페인이 분리되는 조건을 찾아보았는데, pH변화에 따른 분석소요시간의 차이는 거의 없었으며, pH 3.5에서는 saccharin Na와, caffein 의 분리가 되지 않았고, pH 4.0에서는 분리도가 조금은 나아졌지만 정량을 하기에는 어려웠다. pH 4.5일 때가 가장 좋은 분리도를 얻었으며 이후부터의 시험에서는 이동상의 pH를 4.5로 하여 사용하였다.

2. 검량선의 작성

이동상을 40%메탄올(TPA-OH), pH 4.5로 결정한후 4종의 인공감미료의 검량선을 작성하였는데, 모두 양호한 직선성을 나타내었고 회귀식에서 얻은 r값은 4종의 인공감미료에서 모두 0.999이상 이었다.

3. 회수율

최적조건으로 결정한 40%메탄올(TPA-OH), pH 4.5에서의 4종의 인공감미료 standard분석 하였는데, 이 조건에서 음료에 인공감미료 standard를 첨가하여 분석한 결과 방해성분없이 완전히 분리할수 있었다. 인공감미료가 첨가되지 않은 2종의 탄산음료(사이다, Coke), 1종의 식이섬유음료, 1종의 이온음료에서는 평균회수율이 98.0%이상으로 양호하였다.

4. 카페인과 스테비오사이드, 보존료의 영향

음료에 함유되어 있는 카페인은 인공감미료의 분석에 영향을 미치지 않았고, 보존제로 사용하는 benzoic acid나 파라벤류는 위의 분석조건에서 20분이후에 peak를 나타내어 이들의 함유여부와 무관하게 음료에서의 인공감미료를 검출할 수 있었다.

이온음료에 인공감미료로 사용되는 stevioside는 메탄올이나 아세트나이트릴이 80%이상에서 분리되므로 인공감미료의 동시분석에는 적당하지 않았고, cyclamate는 detector를 RI를 사용해야하므로 제외하였다.

결론

음료중의 인공감미료를 HPLC로 동시분석하기 위하여 분석조건을 연구한 결과는 다음과 같았다.

1. C₁₈ reverse phase컬럼을 사용하여, 이동상을 30, 40, 50% 메탄올(TPA-OH)로 비교한 결과 40% 메탄올(TPA-OH)에서 가장 분리능이 높았다.
2. 이동상의 pH를 3.5, 4.0 및 4.5로 조정하여 분석한 결과 pH 4.5에서 음료중의 카페인과 보존료의 영향 없이 10분이내에 분석 할 수 있었다.
3. 탄산음료 2종, 식이섬유음료, 이온음료에 각각 아세솔팜 K, 사카린 나트륨, 아스파탐, 돌신을 첨가하여 얻은 회수율은 모두 98.0% 이상 이었다.

참고문헌

1. 문범수 : 식품첨가물, 수확사, pp. 214-227 (1991)
2. Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. vol. 7, Academic press, pp. 4476~4479 (1993)
3. C. Kobayashi, M. Nakazato, H. Ushiyama, Y. Kawai, Y. Tateishi and K. Yasuda : Simultaneous Determination of Five Sweeteners in Foods by HPLC. 食衛誌. 40(2) : 166(1999)
4. E. Amakawa, K. kamata, K. Saito and S. Suzuki : Determination of Alitame in Food Stuffs by TLC and HPLC. 食衛誌, 40(4) : 304(1999)
5. J. F. Lawrence and C. F. Charbonneau : Determination of Seven Artificial Sweeteners in Dier Food Preparations by Reverse-Phase Liquid Chromatography with Absorbance Detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71(5) : 799(1988)
6. T. A. Tyler : Liquid Chromatographic Determination of Sodium Saccharin, Caffeine, Aspartame, and Sodium Benzoate in Cola Beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(4) : 799(1984)