

HPLC에 의한 벌꿀의 당성분에 관한 연구

李完求·鄭熙仙

국립과학수사연구소

A Study on Saccharides in Honey via HPLC

Wan Koo Lee, Hee Sun Jeong

National Institute of Scientific Investigation

Abstract

Saccharides in Korean honey have been analyzed by traditional wet chemical methods and several chromatographic technics; gas, paper, column and thin layer chromatography.

A simple, rapid and versatile method for the separation and determination of saccharides via high performance liquid chromatography were used eluting with $H_2O : CH_3CN$ at 25:75, at a flow rate of 1.0ml/min.

Acasia honey contained 36.8% fructose, 31.4% glucose, 1.7% sucrose and bush clover honey held 34.4% fructose, 32.3% glucose and 30% sucrose. Difference on the regional distribution were not found in the quantity of saccharides (42 species).

The quality of inferior honey was assumed to contain much maltose, sugar and glucose than common honey.

I. 서론

벌꿀은 감미료, 영양제는 물론 의약용으로 안약, 도포약등의 외상 치료제, 담해(痰咳), 감기, 빈혈등의 치료제, 약재의 첨미료등에 쓰이며 공업용, 향장품, 치약등에 까지 그 사용범위가 다양함을 볼 수 있다. 벌꿀은 산성이며 탈수력이 강하고 Inhibin¹⁾이라는 살균성 물질이 있기 때문에 식품의 변질방지제등에도 쓰이고 있다.

이러한 벌꿀의 다양한 용도와 더불어 소득수준의 향상으로 벌꿀의 수요가 증가하였음에도 한정된 밀원식물(密原植物), 양봉농가의 영세성 및 유통과정등의 문제점으로 벌꿀에 대한 품질관정 및 불량품 식별이 수시로 요구되어지고 있다.

전화당인 glucose 와 fructose 를 주성분으로 한 벌꿀은 수분외에 서당, 맥아당, dextrine 을 함유하고 미량성분으로 proline 을 주로 하는 amino acid²⁾ gluconic acid³⁾ 등의 유기산과 무기성분으로 K, Na, Ca, P, Cl, S,

Zn 등을 0.1~0.3%⁴⁾ 함유하고 있으며 in-vertase 등의 효소, vitamin 등을 함유하고 있다.

벌꿀의 성분조성은 밀원식물의 종류, 산지, 채취시기, 계절, 개화상황, 채취법등에 따라 다르므로 이를 조건에 따른 성분조성의 설정이 필요로 되고 있어 저자는 벌꿀의 주성분인 전화당 및 자당등을 각 성분별로 분리, 정량하는 방법을 검토한 다음 여러조건에서 채취한 벌꿀에 대하여 당류의 함량비를 측정함으로써 우리나라산 벌꿀의 당 함량 표준을 얻고자 한다.

벌꿀의 당성분 정량법중 습식법은 당류가 혼합될 경우 서로 방해하며, gas-chromatography⁵⁻⁷⁾에 의한 방법은 분리정량은 양호하나 TMS 유도체를 만들기 위해 고가의시약 및 많은 조작이 문제가 되고, thin layer chromatography,⁸⁾ paper chromatography,⁹⁾ column chromatography¹⁰⁾에 의해서는 그들 정량에 복잡한 과정등 많은 문제점이 있으며, HPLC에 의한 방법으로는 ion 교환수지¹¹⁾를 사용한 방법 및 μ -Bondapak/Carbohydrate를 이용한 방법등이 보고되어 있는데 본 시험에서는 μ -Bondapak/Carbohydrate column¹²⁻¹⁵⁾를 이용하여 mobile phase에 따른 벌꿀중 당류의 분리조건을 검토한 다음 한국산 벌꿀 42종에 대해 꽃의 종류별, 산지별로 fructose, glucose sucrose, maltose을 분리 정량하였고 불량품으로 구입된 11종의 벌꿀에 대하여는 습식법을 병행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 시약 및 표준품

acetonitrile (HPLC용)
distilled water (HPLC용)
glucose (E. Merck Standard)
fructose (E. Merck Standard)

xylose (E. Merck Standard)
sucrose (E. Merck Standard)
maltose (E. Merck Standard)
alum, NH₄OH, BaCl₂, CuSO₄ · 5H₂O,
K · Na tartrate, methylene blue, NaOH 등
각 1급 또는 특급시약

2. 장치 및 측정조건

HPLC : Waters Association Model 6000 A
A pump, U 6 K injector
Differential refractometer : model 401
Data module : 730
Column : μ -Bondapak/Carbohydrate
Mobile phase : acetonitrile : water
(75 : 25)
Attenuation : 4 X
Flow rate : 1.0 ml / mn
Chart speed : 0.5 cm / mn
Injection volume : 3 μ l

3. 시료

지역별 및 밀원식물별 벌꿀 42종(표 1) 과 밀원식물 미상인 불량품으로 사료되어 구입된 11종을 채취하였다.

4. 당류의 HPLC

당류의 표준품인 xylose, fructose, glucose, sucrose, maltose 수용액을 Millipore (HATF 1300)로 처리한 다음 acetonitrile : water (75 : 25)을 Mobile phase로 하여 μ -Bondapak/Carbohydrate column에서 분리하여 굴절 detector에서 측정하였다.

5. 검량선

내부표준물질은 본 측정조건에서 타당류 peak와 중복되지않고 벌꿀중에 함유되어 있지 않는 xylose를 사용하였으며 당류 표준품인 fructose 및 glucose를 각각 100 mg 과 sucrose 및 maltose 각 30 mg씩을 달아 취한후 1% xylose에 녹여 10ml로한후 millipore로 처리하여 시험한 다음 Data module에 의하여 작성하였다.

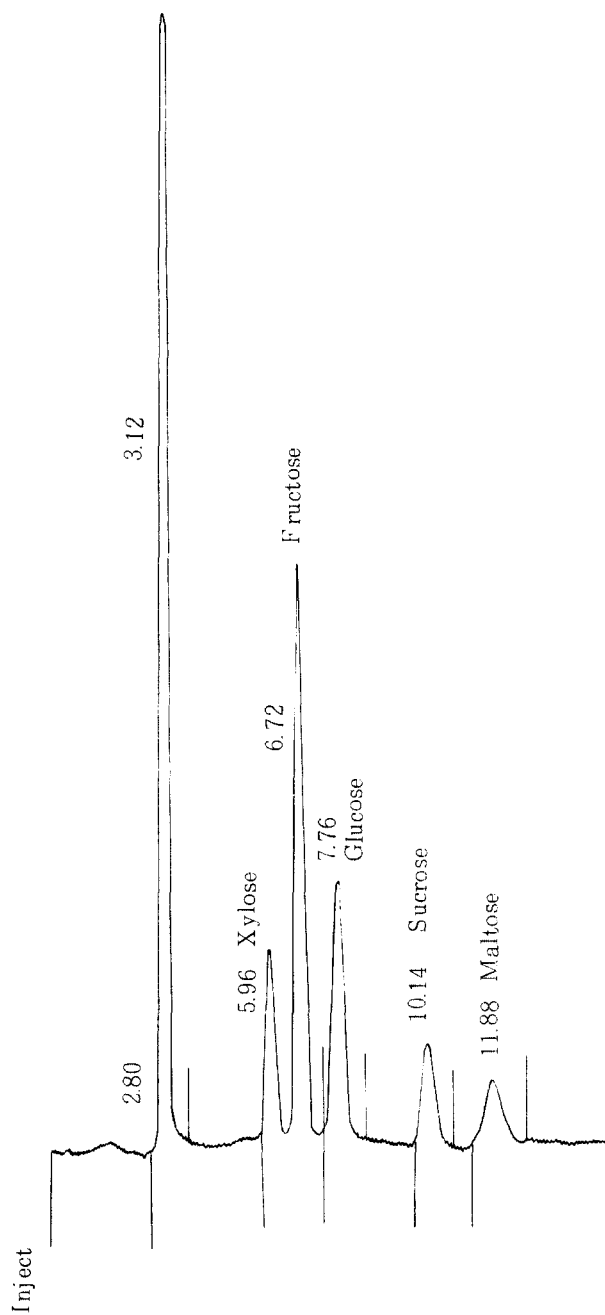
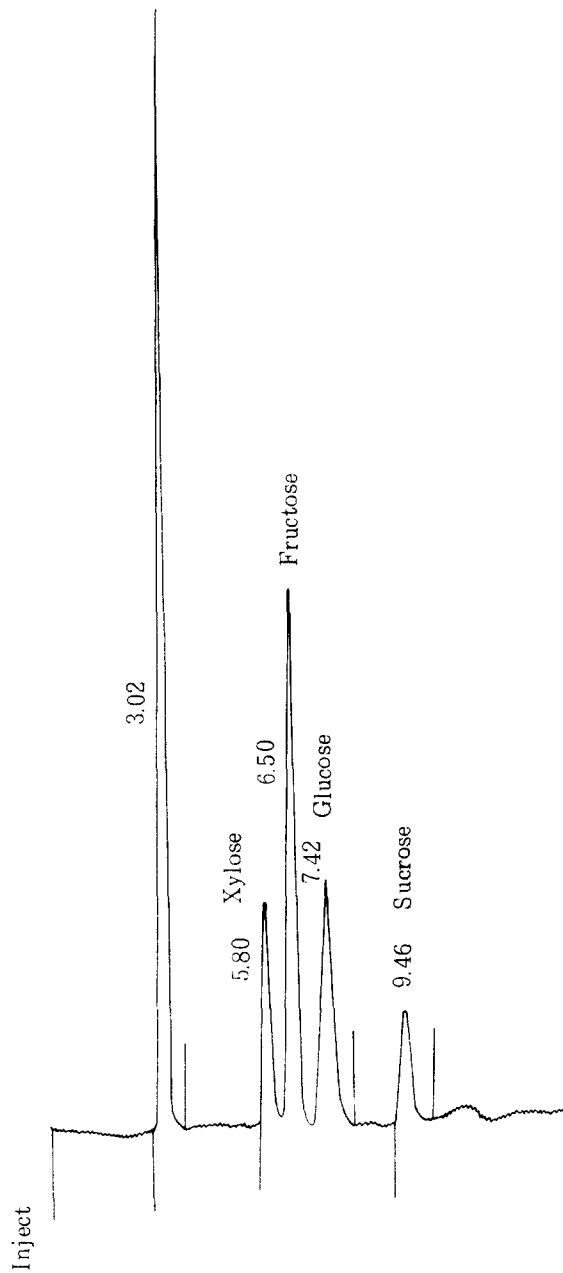
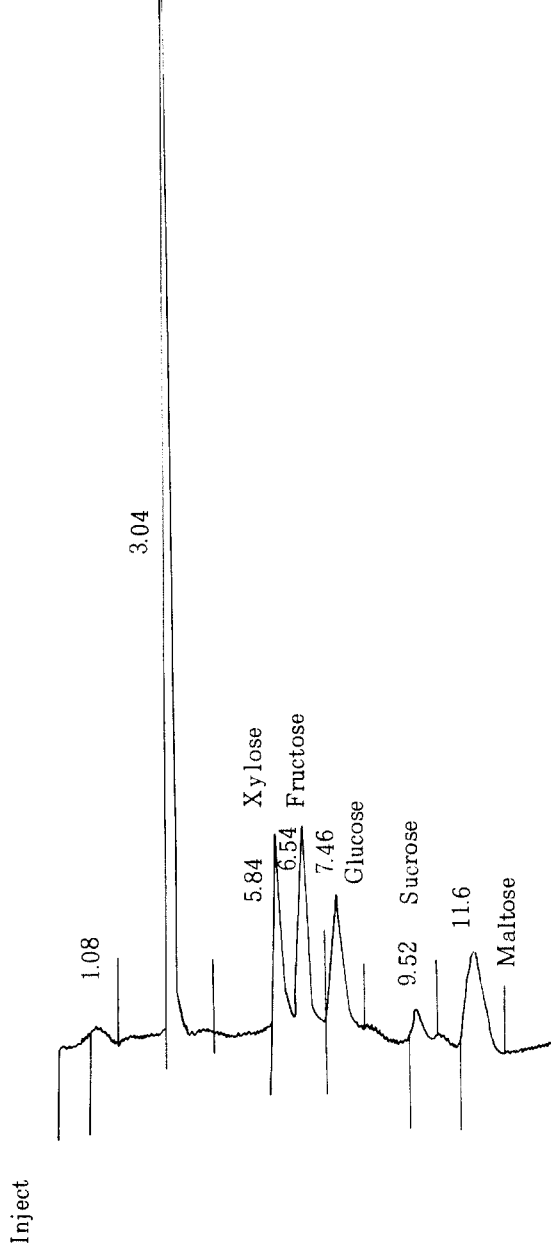


Fig. 1. Separation of Saccharides Standard
(μ -Bondapak / Carbohydrate, $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ (75: 25)
flow rate 1.0 ml/min. Refractometer attenuation 8 X)



Peak	Amount	Rt	Exp Rt Area
Unk		3.02	102782950 L
1	Int Std	5.80	28180632 F
2	111.03400	6.50	61603668 F
3	92.08570	7.42	44412847 L
4	30.89480	9.46	19283600 L
Total	234.01500		

Fig. 2. Chromatogram of genuine honey
 (μ -Bondapak / Carbohydrate, CH₃CN/H₂O (75:25)
 flow rate 1.0 ml/min. Refractometer attenuation 8X)



Inject

Peak	Amount	Rt	Exp	RtArea
Unk		1.08		2264300 L
Unk		3.04		102441500 F
1	Int Std	5.84		25557420 F
2	45.21720	6.54		22752146 L
3	52.72590	7.46		23062550 L
4	8.63269	9.52		4886700 L
5	46.58980	11.06		26159900 L
Total	153.16500			

Fig. 3. Chromatogram of inferior quality - honey
 (μ - Bondapak / Carbohydrate, CH₃ CN / H₂O (75: 25)
 flow rate 1.0ml/min. Refractometer attenuation 8X)

6. 검체실험

HPLC에 대한 시험은 각지방에서 채취한 꿀을 보사부 고시에 준해 검체처리를 한 다음 각 시료 약 300 mg 을 정평하여 1% xylose 에 녹혀 10 ml 로 한우 millipore 로 처리하여 실험 2의 측정조건에서 시험하였으며 불량품으로 구입된 11종의 벌꿀에 대하여는 보사부 고시 제 7호 “식품등의 규격 및 기준” 중의 벌꿀항에 의하여 전화당 및 자당을 측정하는 방법과 HPLC의 방법을 병용하여 당류를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

벌꿀중의 당성분인 fructose, glucose, sucrose 및 maltose의 분리정량은 μ -Bondapak/Carbohydrate column, mobile phase acetonitrile : water (75 : 25), flow rate 1.0 ml / min에서 분리하여 RI detector에서 양호한 결과를 얻었으며 각 표준품에 대한 chromatogram은 그림 1과 같다.

mobile phase는 물의 양이 증가할수록 각 당류의 retention time은 빨라지고 peak가 예민하였지만 fructose와 glucose의 peak가 겹치었으므로 벌꿀중의 당류 분석에는 acetonitrile : water (75 : 25)가 적당하였다.

대부표준물질로는 다른 당과 peak가 겹치지 않고 벌꿀중의 성분으로 함유되어 있지 않은 xylose가 적당하였다.

표준 벌꿀 아카시아 3호와 불량벌꿀 2호에 대한 chromatogram 및 당함량은 그림 2, 그림 3과 같다.

각지역에서 구입한 42종의 밀원식물별 당류함량을 측정한 결과는 표 1과 같으며, 대부분의 벌꿀은 glucose 양 보다는 fructose 양을 많이 함유하고 있었다.

밀원식물별 당류의 평균함량은 아카시아 꿀은 fructose가 36.8% glucose가 31.4%, sucrose는 1.7%이며, 싸리꿀은 fructose

34.4% glucose 32.3%, sucrose가 3.6%이었다.

그리고 잡화꿀은 fructose 37.2%, glucose 36.1%, sucrose 2.9%이었으며 밤꿀, 참깨꿀, 유채꿀, 부추꿀, 수입꿀, 한봉꿀등은 시료를 충분히 채취하지 못하였으나 밤꿀과 유채꿀에서는 fructose를 많이 함유하고 있었으며 glucose 함유량은 다른 꿀과 비슷하게 함유하고 참깨꿀, 부추꿀, 한봉꿀, 수입꿀 등은 glucose에 대한 fructose의 비율이 1.0 - 1.2로 잡화꿀과 비슷하였다.

시료에 대한 지역별의 당함량의 평균치인 표 2와 같이 지역별로 구입한 벌꿀의 당함량에 대한 차이는 거의 없었다.

이는 양봉업자들이 지역을 이동하여 꿀을 채취하고 또한 여러지방의 꿀이 한곳에 공급되어 소분 포장되어 판매될 수 있으므로 지역에 따른 당함량 차이는 발견하기 어려운 것으로 사료되며 또한 진품으로 현지에서 구입한 시료도 어느 정도의 신뢰성이 있느냐에 따라서도 분계점이 있다고 사료된다.

불량벌꿀로 사료되는 시료의 당류함량 측정 결과는 표 3과 같으며 이들은 환원당 함량이 분방법에서는 49.6% 이하이며 보사부 고시 제 7호에 의하여는 58.6% 이하이었다. 여기에서 HPLC에 의한 방법이 전화당과 자당의 함량이 적게 나타났는데 이는 벌꿀중에 함유될 수 있는 기타 환원성 물질이 측정되지 않기 때문인 것으로 사료된다.

불량벌꿀에는 주로 설탕, 포도당, 물엿등이 첨가된다고 하는데 본 방법으로는 각 성분을 분리 정량할 수 있어 첨가된 물질을 확인할 수 있다. 즉 설탕의 분해에 의한 경우는 fructose와 glucose 양이 비슷하거나 glucose 양이 많으며, 물엿을 가할 경우는 맥아당 함량이나 glucose 함량이 fructose에 비해 월등히 높은 것으로 꿀 판정할 수 있다.

표 3의 불량품 시료들은 보사부 고시에 부

Table 1. The Amount of saccharides according to the species of Flowers.

Sample	Contents	Fructose (%)	Glucose (%)	Sucrose (%)	F/G ratio	F + G	F +G +S	place
Acacia	1	43.3	32.9	1.4	1.3	76.2	77.6	Dae gu
	2	34.6	30.1	3.9	1.1	64.7	68.6	"
	3	38.2	37.3	1.6	1.0	75.5	77.1	Pu san
	4	41.5	27.4	4.3	1.5	68.9	73.2	"
	5	34.9	32.1	0.4	1.1	67.0	67.4	"
	6	43.7	33.6	1.3	1.3	77.3	78.6	"
	7	30.8	31.1	3.3	1.0	61.9	65.2	"
	8	30.0	27.1	2.2	1.1	57.3	59.5	Masan
	9	36.9	33.3	1.2	1.1	70.2	71.4	"
	10	38.9	33.2		1.2	72.1		Seoul
	11	42.3	29.4	1.1	1.4	71.7	72.8	Mt Jiri
	12	42.3	30.4	0.7	1.4	72.7	73.4	Bosung
	13	32.9	30.7	1.3	1.1	63.6	64.9	Gerong
	14	32.2	30.1	0.9	1.1	62.3	63.2	Muju
	15	30.2	28.7	1.1	1.1	58.9	60	Mt. Sokri
	16	35.6	34.8	0.8	1.0	70.4	71.2	Dae Duk
Bush-clover	1	32.9	28.1	6.9	1.2	61.0	67.9	Dae gu
	2	38.6	33.0	6.2	1.2	71.6	77.8	Pusan
	3	34.3	34.0	4.2	1.0	68.3	72.5	"
	4	31.1	29.3	0.6	1.1	60.4	61.0	Masan
	5	35.6	37.4	1.9	0.95	73	74.9	Dae gu
	6	36.9	35.0	1.4	1.1	71.9	73.3	Kang Won
	7	33.0	29.3	9.1	1.1	62.3	71.4	"
	8	34.8	33.3	1.3	1.0	68.1	69.4	Mt. Sok Ri
	9	32.3	31.4	1.1	1.0	63.7	64.8	Kang Won
Miscell	1	36.9	33.7	5.2	1.1	70.6	75.8	Dae gu
	2	31.5	30.0	2.8	1.1	61.5	63.3	Pu san
	3	38.1	38.5		1.0	76.6		"
	4	42.6	40.1	0.7	1.1	82.7	83.4	Dae gu
	5	37	38.4		0.96	75.4		Seoul
Chest -nut	1	42.6	30.3	0.9	1.4	72.9	73.8	Dae gu
	2	41.4	32.5	2.4	1.3	73.9	76.3	Seoul
Leek	1	37.8	31.7		1.2	69.5		Dae gu
Sesame	1	34.6	34.2	0.07	1.0	68.8	68.9	Mt. JiRi
	2	33.5	28.4	2.8	1.0	61.9	64.7	"
Rape	1	42.7	26.5	0.63	1.6	69.2	69.8	Whasun
	2	40.3	33.3	1.1	1.2	73.6	74.7	Mt. JiRi
Impcrt	1	40.4	34.8	2.5	1.2	75.2	77.7	
Han bong	1	28.7	26.5	0.85	1.1	55.2	56.1	Je Ju

Table 2. The Amount of saccharides according to regional group

Regional Contents	Fructose	Glucose	Sucrose	F/G ratio	F + G + S
Kyung sang buk Do	38.3	33.0	3.0	1.2	74.3
Gang won Do	34.1	31.8	3.9	1.1	69.9
Jeol ra buk Do	32.2	30.1	0.9	1.1	63.2
Chong cheong nam Do	34.2	32.8	1.1	1.0	68.2
Chong chong buk Do	32.5	31.0	1.2	1.0	64.7
Kyung sang nam Do	35.8	32.2	2.6	1.1	70.6
Jeol ra nam Do	39.3	30.4	1.1	1.3	70.8
Je ju Do	28.7	26.4	0.85	1.1	56.1
Seoul	39.1	34.7	2.4	1.2	76.2

Table 3. The Amount of saccharides in honey of inferior quality

Method Contents Sample	HPLC					Wet Process	
	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	F + G	Reducing sugar	Sucrose
1	14.0	16.2	2.6	14.6	30.2	47.3	4.4
2	15.3	20.2	1.1	11.6	35.3	48.0	4.5
3	17.1	22.0	20.8		39.1	53.3	21.6
4	20.9	26.3	14.3		47.2	50.9	20.0
5	20.8	27.7	10.7		48.5	52.3	19.1
6	17.8	10.9	11.8	2.1	28.7	35.8	12.3
7	11.2	11.5	29.8		22.7	27.3	33.5
8	8.8	18.4	23.4		27.2	31.6	27.9
9	7.2	20.4	9.6		27.6	36.8	12.1
10	23.9	25.7	10.2		49.6	58.6	12.6
11	15.0	14.3	33.1		29.3	31.6	34.1

적합한 벌꿀로 1호와 2호는 maltose 가 많고 fructose 에 비하여 glucose 양이 많은 것으로 보아 물엿을 첨가한 것으로 사료되며, 6호와 11호는 설탕과 물을 가한 것으로 사료되며 3호, 4호, 5호, 7호, 8호, 9호, 10호는 설탕과 물엿을 첨가한 것으로 추정된다.

IV. 결 론

1. 벌꿀종의 당성분 분석은 HPLC 를 이용하여 acetonitrile : water (75 : 25), flow rate 1.0 ml / min 에서 fructose, glucose,

sucrose maltose 가 신속 간편하게 RI - detector 에서 분리 정량되었다.

2. 밀원식물별로 당함량은 아카시아꽃이 fructose 36.8%, glucose 31.4%, sucrose 가 1.7%이며 싸리꽃은 fructose 양이 34.4%, glucose 32.3%, sucrose 3.6%이고 잡화꽃은 fructose 37.2%, glucose 36.1%, sucrose 가 2.9%이었다

3. 시료 39 종에 대한 지역별 당함량치를 비교할 때 큰 변화는 발견할 수 없었다.

4. 꿀양품 꿀은 glucose 의 양이 많고, sucrose, maltose 를 다량 함유하는 것으로 보

아 주로 설탕과 물이나 설탕과 물엿을 첨가한 것으로 사료된다.

参考文献

- 1) 최승윤 저 : 양봉학, 집현사
- 2) Aoyaji, Shigeo ; Tamagawa Daigaku Nogakubo Kenkyu Hokoku, 7, 181, 1968.
- 3) T. Echigo and T. Takenake : Nippon Nogeikagaku Kaishi, 48, 228, 1974.
- 4) Fini, Maria Angela ; Apicolt Ital., 33, 231, 1967.
- 5) L. T. Sennello ; J. Chro. 56, 121, 1971.
- 6) A. C. McClnes, D. H. Ball, F. P. Cooper and C. T. Bishop ; J. Chro. 1, 556, 1958.
- 7) Y. Masada, K. Hashimoto, T. Inoue and T. Sawada ; Yakugaku Zasshi, 89, 734, 1969.
- 8) M. Rink and S. Herrman ; J. Chro. 12, 415, 1963.
- 9) J. Wood ; J. Chro. 35, 352, 1968.
- 10) J. W. White ; Tech. Bull. U. S. Dep. Agrc., 1261, 124, 1962.
- 11) J. K. Palmer and W. B. Brandes ; J. Chro. Food Chem., 22:41, 709, 1974.
- 12) J. C. Linden and Lawhead ; J. Chro. 105, 125, 1975.
- 13) E. C. Conrad and J. K. Palmer ; Food Technology, October, 84, 1976.
- 14) J. K. Palmer ; Analytical Letters, 8 (3), 215, 1975.
- 15) J. K. Palmer ; Applied Polymer Symposium, 28, 237, 1975.