

HPLC에 의한 꿀 중의 당조성 분석과 화학계량학적 고찰

윤정현* · 배선영** · 김 건 · 이동선†

†서울여자대학교 자연과학대학 화학과

*한국과학기술연구원 특성분석센터

**매사추세츠대학교 화학과

(1997. 5. 30. 접수)

Chemometric Aspects and Determination of Sugar Composition of Honey by HPLC

Jung-Hyeon Yoon*, Sun-Young Bae**, Kun Kim and Dong-Sun Lee †

† *Department of Chemistry, Seoul Women's University, Seoul, 139-774, Korea*

* *Advanced Analysis Center SIMS, AES/SAM, KIST, 130-650, Korea*

** *Department of Chemistry, University of Massachusetts, Lowell, MA, U.S.A.*

(Received May. 30, 1997)

요약 : HPLC를 이용하여 생산지와 밀원꽃이 알려진 5종의 꿀 중 당성분을 분석한 다음 화학계량학적 고찰을 수행하였다. 꿀의 주된 당성분은 fructose, glucose였으며, 1종의 꿀에서는 sucrose가 소량 검출되었다. 산지별, 밀원꽃별로 당 함량을 비교하였다. Fructose/glucose 함량비는 0.99~1.55 범위로서 문헌값과 잘 일치하였다. Principal components analysis(PCA) plot은 산지별, 밀원꽃별로 확연히 구분되었다. 주성분점수가 커질수록 당 함량이 증가되었고 fructose/glucose 함량비는 감소되었다. 화학계량학적 접근방법은 꿀시료의 당조성 패턴을 비교하고 품질평가 및 부정화 적발에 유용하였다.

Abstract : Chemometric technique was applied to the sugar composition in five honeys of known botanical or geographical origin following HPLC. Fructose and glucose were predominant carbohydrates in honeys, and small amount of sucrose was also detected in one sample. Sugar contents in honeys samples were compared by the geographical or botanical origin. Fructose/glucose ratio ranged from 0.99 to 1.55 was obtained and these results are in good agreement with the ratio of literature. The plot of principal components analysis(PCA) showed that different honey samples grouped into distinct cluster by the geographical or botanical origin. Increasing the first or second principal component score, higher amount of sugar or less fructose/glucose ratio was observed in PCA plot. Chemometric approach was very useful to provide pattern recognition of sugar profile or quality indices of honey sample and to detect adulteration.

Key words : honey, sugar, HPLC, fructose/glucose ratio, chemometrics, principal component analysis.

1. 서 론

꿀은 벌과(Apidae)에 속하는 꿀벌(*Apis mellifera* Linne, *Apis indica* Radoszowski)이 꽃의 밀선 등에서 채취한 감미분비물을 벌집에 모아 놓은 것을 분리채취한 것이다. 꿀은 세계 각지에서 중요한 영양식품 또는 의약품으로 오래 전부터 사용되어 왔다. 우리나라에서도 설악산 꿀을 석청(石淸)이라 하여 궁중에 진상되기도 하였으나 약 80여년 전부터 개량벌이 수입되면서 양봉이 늘어나게 되었다. 꿀을 뜨는 가장 좋은 시기는 재래종(*Apis indica* Radoszowski)의 경우 가을철 한 번에 지나지 않지만 개량종은 꽃만 피어 있으면 어느 때나 가능하고 4~5월경에 가장 좋은 꿀을 다량 채취한다. 꿀의 품질은 계절, 기후, 지역, 밀원꽃의 종류와 개화 상황, 채취 방법에 관계되며, 옅은 황갈색의 향기롭고 단 것일수록 좋다. 우리나라에서는 자운영, 아카시아, 싸리 등을 밀원꽃으로 하여 비교적 순수한 꿀을 생산하는 경우가 많으며, 밤 또는 메밀꽃으로부터 채취된 것은 품질이 떨어진다. 미국과 캐나다에서는 크로버가 주된 밀원꽃이며, alfalfa, alsike, kiawe, tulip, poplar, sunflower, gallberry 등에서도 생산되어 동양산과 밀원꽃의 차이가 뚜렷하다.

가짜 꿀(adulterate honey)이 사회적 문제가 되기도 하는데, 가짜 꿀의 과학적 감별과 객관적인 품질평가를 위해서는 꿀의 조성에 관한 분석이 선행되어야 한다. 일정한 품질수준을 유지하기 위하여 인위적으로 특정한 성분을 첨가시키기도 하고 전화당을 가공시켜 꿀을 제조하기도 한다. 정상적인 꿀의 조성은 fructose 25~45%, glucose 25~37%, maltose 2~12%, sucrose 0.5~3%를 함유한다.¹ Doner는 꿀의 당성분에 관하여 고찰하면서 꿀의 주성분 평균 함량은 fructose 38.2%, glucose 31.3% 수분 17.2%라고 하였다.² Cane, beet sucrose로부터 만든 invert syrup, high fructose corn syrup 등이 대표적인 가짜 꿀인데, 이들의 탄수화물 조성은 정상적인 꿀과 매우 유사하다.³ 당을 전화시켜 만든 인조 꿀은 산 가수분해에 의해 생성되는 5-(hydroxy methyl)-2-furfural을 함유하므로 resorcin 시약에 의해 홍색을 나타내며 정상 꿀 중의 fructose도 산도에 따라 5-(hydroxy methyl)-2-furfural을 생성하여 resorcin 시약과 반응한다.⁴ 가짜 꿀의 검출방법으로는 GC⁵, LC⁶, TLC⁷에 의한 당분석, 원자흡수분광법에 의한 Na/K 함량비 분석, 면역화학적 분석, gel

electrophoresis에 의한 단백질 분석, pollen 및 proline 분석, calorimetry, turbidimetry, colorimetry, ¹³C/¹²C 동위원소비 분석 등이 알려져 있다.^{8~10} 근래의 연구로는 Tomas-Barbean 등¹¹이 honey flavonoids를 HPLC로 분석하였고, Swallow와 Low¹²는 미국과 캐나다 지역에서 생산된 꿀의 당조성을 이온교환컬럼과 pulsed amperometric detector를 사용하여 HPLC로 분석하여 fructose/glucose 조성비를 보고하였다.

국내에서는 토종꿀에 대한 이화학적 특성 연구¹³, 정미성분에 관한 연구¹⁴, 유기산과 지방산 특성연구¹⁵가 보고된 바 있으나, 당 조성에 관한 화학계량학적 연구가 아직 없는 실정이다. 본 연구에서는 국내에서 유통되는 꿀의 당조성의 지표를 제시할 목적으로 amine 컬럼과 굴절률검출기를 이용한 HPLC로 꿀의 당성분을 정량하였다. 그리고 산지와 밀원꽃이 서로 다른 꿀들의 당성분 조성 패턴을 비교하기 위하여 주성분 분석에 의한 화학계량학(chemometrics)적 고찰을 시도하였다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 재료

실험에 사용한 fructose, glucose, sucrose, maltose 표준물질은 Sigma(U.S.A) 특급 제품을 사용하였다. HPLC용 acetonitrile은 chromatographic grade의 Merck(U.S.A) 제품을 사용하였다. 모든 물은 증류수를 탈이온화시킨 후 E-pure water purification system(Barnstead, U.S.A.)으로 정제하여 0.2 micrometer Anodisc membrane filter(Anotec, U.S.A.)로 감압여과한 초순수를 사용하였다. 국내에 유통되는 꿀은 여과분리한 꿀과 천연 꿀이라는 것을 강조하기 위하여 벌집과 함께 들어 있는 벌집꿀이 있다. 생산지와 밀원꽃이 서로 다른 지리산 진달래꿀, 전라도 아카시아 벌집꿀, 전라도 밤나무꿀, 강원도 아카시아꿀 시판품과 오스트레일리아산 Halcion orange 벌집꿀을 실험재료로 사용하였다.

2.2. 시료조제

당 표준물질을 HPLC 이동상인 acetonitrile : water(83 : 17, v/v%)에 녹여 각각 4mg/mL 농도의 보존용액을 조제하고 필요에 따라 희석하여 일련의 표

준용액을 만들고 각각 20 μ L를 HPLC에 주입하여 농도 변화에 따른 피크 면적의 검정곡선을 작성하였다. 꿀 1g씩을 10mL volumetric flask에 정확히 칭량하여 초순수로 녹이고 sonication시켜 녹지 않는 것과 입자를 제거하기 위하여 0.45 μ m membrane filter로 여과하고 초순수로 표선까지 채우고 그 중 20 μ L를 HPLC로 분석하였다.

2.3. HPLC 조건

HPLC 펌프는 LC-9A 모델(Shimadzu, Japan)을 사용하였고, 6-A RI 모델(Shimadzu, Japan)의 굴절률 검출기를 이용하여 8×10^6 RIUFS로 검출하여 CR-6A integrator(Shimadzu, Japan)로 기록하였다. 분리용 컬럼은 carbohydrate analysis column(Waters, 3.9mm i. d. \times 300mm, 10 μ m)을 사용하였고 acetonitrile : water(83:17, v/v%)를 이동상으로 하여 흐름속도 1.0mL/min으로 하였다. CTO-6A oven(Shimadzu, Japan)를 이용해서 컬럼 온도를 35 $^{\circ}$ C로 유지시켰으며, 시료는 Rheodyne injector 7125로 20 μ L를 주입하였다.

2.4. 화학계량학적 해석

n개 꿀시료 중의 당성분별 함량 p개 값들로부터 $n \times p$ 행렬을 만들고 이 행렬로부터 분산 공분산 행렬, 고유값(eigenvalue), 고유값 벡터, 기여율, 누적기여율, p개 주성분점수를 n개 시료별로 전산처리하였다. 전산처리에는 본 연구실에서 자체 개발한 MVSAP(multivariate statistical analysis program, version 3.1)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 크로마토그램과 검량곡선

실험방법에 따라 당표준물질을 HPLC로 분리한 결과 Fig. 1과 같은 크로마토그램을 얻었다. 본 실험에 사용한 carbohydrate column은 amorphous silica에 amino propylmethylsilyl이 결합된 것으로 단당류인 fructose, glucose뿐 아니라 이당류인 sucrose, maltose까지 동시분리에 적합하였다. 실험방법에 주어진 조건에서 분리능 2.17~3.53으로 양호한 분리를 보였다. 컬럼내의 정지상과 이동상 사이에서 당이 분배될 때 당이 정지상의 amino기와 수소결합을 형성하는 과정에

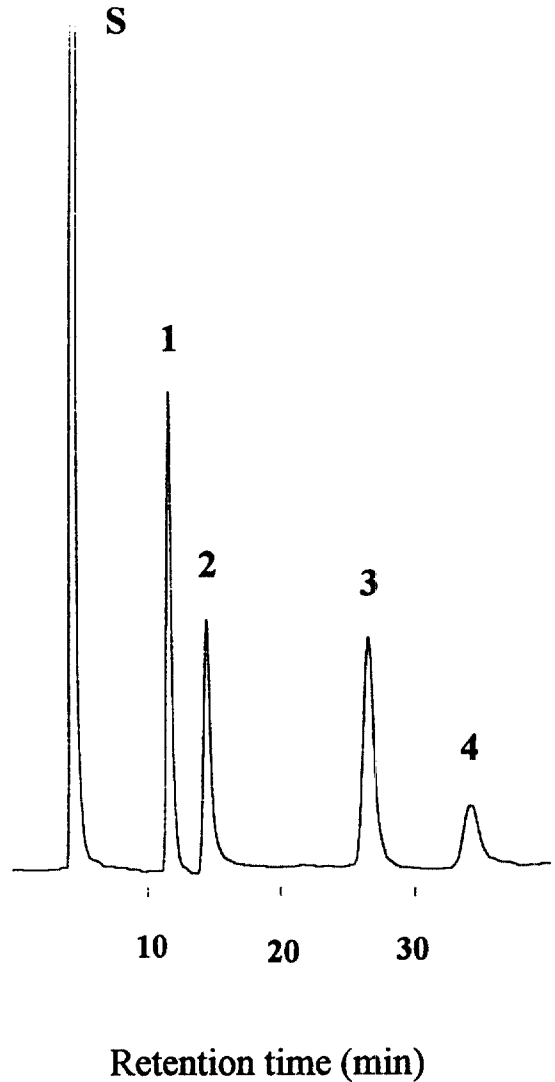


Fig. 1. Chromatogram of sugar standards : S, solvent; 1, fructose; 2, glucose; 3, sucrose; 4, maltose. Column: Carbohydrate column(Waters, 3.9mm i. d., 300mm, 10 μ m), mobile phase: acetonitrile/water(83:17v/v%), flow rate: 1.0mL/min, column temperature: 35 $^{\circ}$ C, sample size : 20 μ L.

서 머무름에 차이가 나타나는 것으로 추측된다. 분자량이 커질수록 머무름시간은 더 길었으며 Honda 등¹⁶의 실험결과와 일치된 용리순서를 나타내었다. 이동상 중 물의 비율이 커질수록 분자량이 큰 당성분이 빨리 용리되고 단당류의 분리가 어려웠다. 분자량이 같은 fructose와 glucose의 경우 furanose형인 fructose가

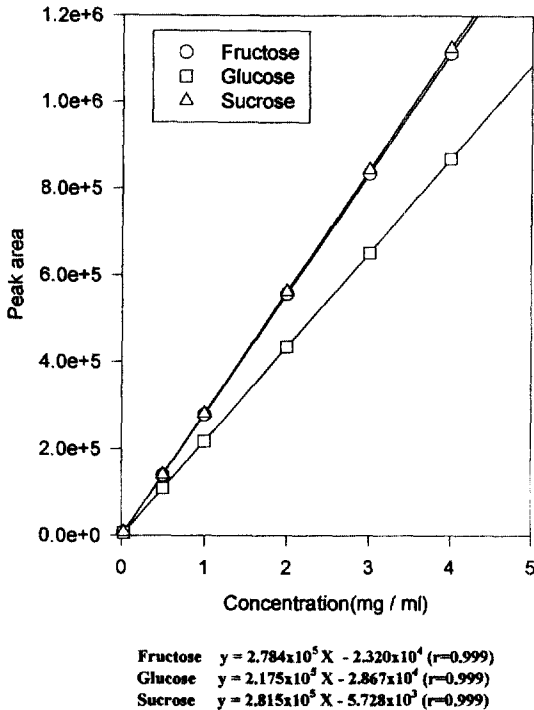


Fig. 2. Calibration curves.

pyranose형인 glucose보다 공간배열이 더 조밀하여 정지상과의 상호작용이 상대적으로 적어 먼저 용리되는 것으로 해석된다.

당 표준용액의 검량곡선을 작성한 결과 0.25~4mg/mL 범위에서 $r=0.999$ 이상의 직선성을 보였다

(Fig. 2). 신호 대 잡음비(S/N)=2를 기준으로 검출한계를 구한 결과 $6\mu\text{g/mL}$ 이하였으며, 재현성(상대 표준편차)은 3.56~9.55%였다.

3.2. 꿀 중 당성분 조성의 원산지별, 밀원별 비교

생산지와 밀원이 다른 5종의 꿀을 실험방법에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램은 Fig. 3과 같다. 일부 시료의 경우 30분대 부근의 머무름시간에서 나타난 작은 피크는 올리고당으로 예측된다. 주된 당 성분은 fructose와 glucose였으며, 전라도산 밤나무꿀을 제외하고 sucrose는 검출되지 않았다. 검량곡선법에 의해 정량한 시료별 당 함량은 Table 1과 같았다. 당 함량은 지리산 진달래꿀이 가장 많았고, 강원도 아카시아꿀, 전라도 아카시아 벌집꿀, 전라도 밤나무꿀 순이었다. 호주산 오렌지 벌집꿀의 당 함량은 지리산 진달래꿀 당 함량의 53% 정도로 당 함량이 분석시료 중 가장 낮았다. Fructose/glucose 함량비는 꿀의 품질평가 지표로 이용되는데, 호주산 오렌지 벌집꿀이 1.54로 가장 높았고 강원도 아카시아꿀, 전라도 밤나무꿀, 전라도 아카시아 벌집꿀, 지리산 진달래꿀 순으로 낮았다. 그러나 지리산 진달래꿀이 fructose/glucose=0.99로 가장 낮았지만 fructose 함량은 호주산의 1.5배 이상 크게 나타났다. Swallow 등¹²의 보고에 따르면 미국 Ohio locust clover꿀의 fructose/glucose비가 1.80이며, 캐나다 Alberta canola꿀이 0.91이고 북미주 지역산 꿀의 fructose/glucose 함량비는 1.1~1.6 정도라

Table 1. Amount of sugars in honeys determined by HPLC.

Sample	Geographical origin (Botanical origin)	Amount of sugar (mean±s.d.)			Fructose/glucose ratio
		Fructose	Glucose	Sucrose	
A	Chullado-1 (Acacia)	18.8±1.5	17.2±0.2	n.d.	1.096
B	Chullado-2 (Nut)	17.7±1.4	15.9±0.3	3.7±1.0	1.110
C	Jirisan (Azalea)	25.2±1.9	25.5±1.0	n.d.	0.989
D	Kangwondo (Acacia)	20.5±1.8	15.6±0.5	n.d.	1.310
E	Australia Halcion (Orange)	16.2±0.4	10.4±0.6	n.d.	1.544

Unit = g/100g (n=3)

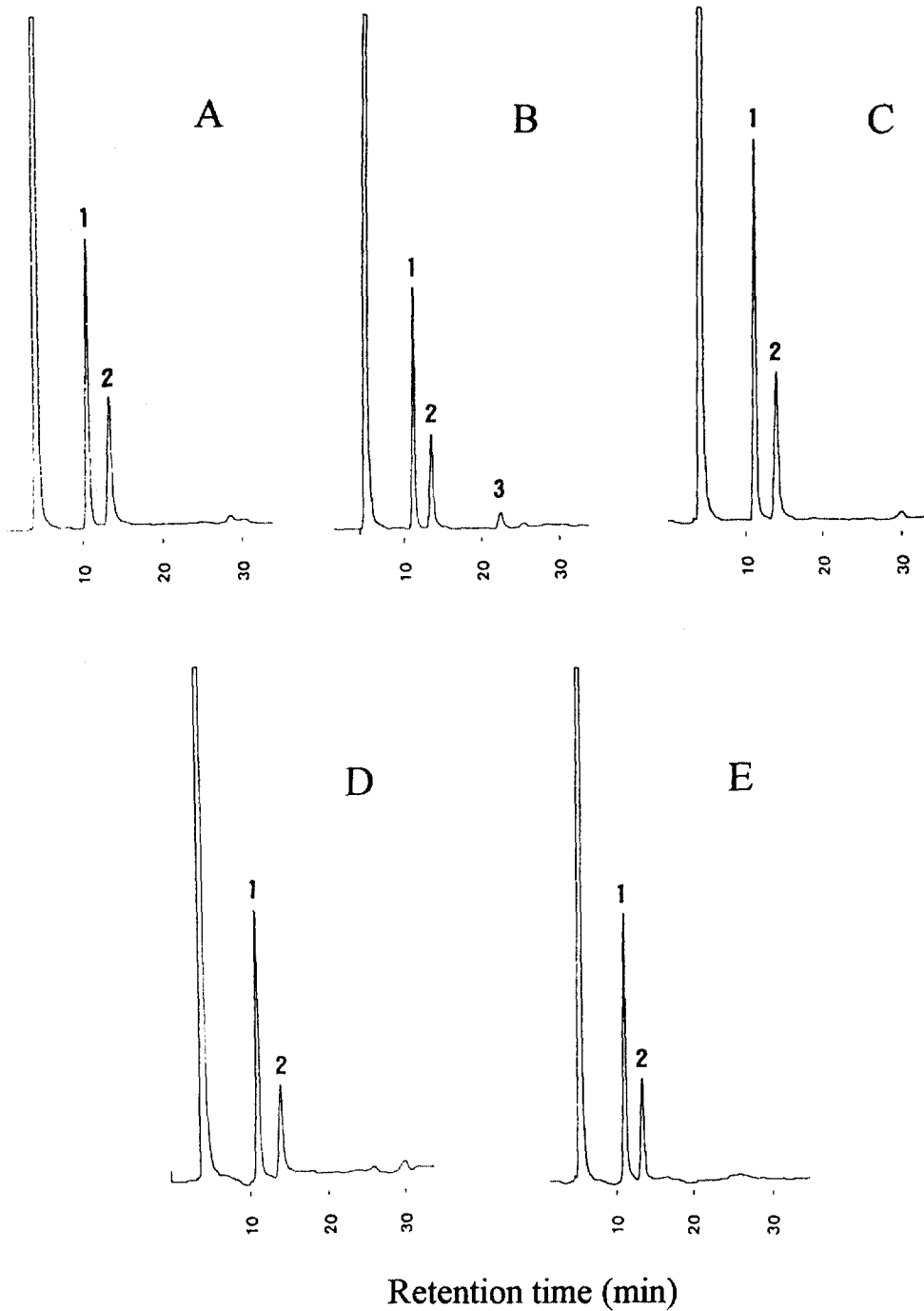


Fig. 3. Chromatograms of honeys samples: A, Chullado-1(acacia); B, Chullado-2(nut); C, Jirisan (azalea); D, Kangwondo(acacia); E, Australia Halcion(orange).

한다. 본 연구에서도 이와 비슷한 결과를 얻었다. 분석 시료의 종류와 시료수가 작아 속단하긴 어렵지만 한국

산 진달래꿀의 당 함량이 높다는 것은 그 품질의 우수성을 시사하는 것으로 생각된다. 밀원꽃의 종류, 채취

시기, 채취 방법에 따른 함량분석이 앞으로 추가 확대 된다면 품질평가 또는 개량에 유익한 결과를 도출할 수 있으리라 사료된다.

3.3. 화학계량학적 고찰

5종의 꿀 중 당성분 분석자료로부터 주성분 분석을 시행한 다음 Scree graph를 작성한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 주성분 분석에서 몇 개의 주성분이 유효한가를 판단하는 데는 Kaiser 척도법과 Scree graph법이 있다. Kaiser 척도법은 eigenvalue가 1 이상이면 유효한 주성분으로 간주한다. 각각의 주성분이 설명해 주는 분산값들을 합하여 변량의 수로 나누면 평균값이 되고 그 eigenvalue값은 1이다. Kaiser 척도는 결국 분산의 평균값보다 더 많이 전체를 대표해 주는 주성분을 중요시하는 검증방법이다. Scree graph는 eigenvalue number에 대한 eigenvalue값의 상관관계를 도시한 것이다. 일반적으로 Scree graph는 곡선이 꺾인 후 직선형을 나타내는데, 유효 주성분의 수는 일직선상의 첫 지점 혹은 그 직전까지이다. 주성분 분석은 거대한 자료군으로부터 대표적인 주성분 정보가 추출되도록 압축 요약하는 기법이다. 따라서 본 연구에서 얻은 Fig. 4는 제2주성분까지가 전체 정보를 대표하는 주성분들임을 의미한다.

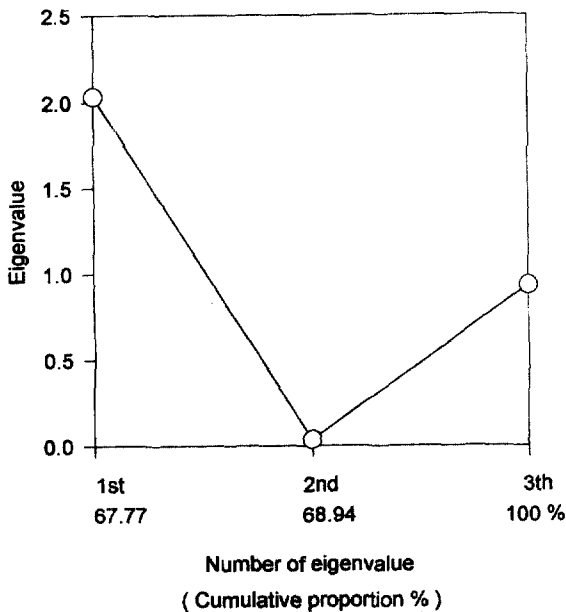


Fig. 4. Scree graph for honeys samples.

제1주성분 점수와 제2주성분 점수의 상관관계를 도시한 PCA plot은 Fig. 5와 같았다. 꿀의 생산지 또는 밀원꽃별로 뚜렷한 집락을 나타내었다. 지리산 진달래 꿀(C)은 호주산 오렌지꿀(E)과 서로 확연하게 구분되었다. 제1주성분 점수 및 제2주성분 점수와 변량, 즉 fructose, glucose, sucrose 함량(%)과의 상호관계를 도시한 것이 Fig. 6과 Fig. 7이다. Fig. 6은 제1주성분 점수가 클수록 fructose 및 glucose 함량이 크다는 것을 의미한다. 한편, Fig. 7은 제2주성분 점수가 클수록 fructose, glucose뿐 아니라 sucrose 함량까지도 커지는 경향을 나타내었다. 따라서 Fig. 5의 PCA plot에서 오른쪽 위로 갈수록 당 함량이 커진다는 것을 의미한다.

Fig. 8 및 Fig. 9에 도시된 바와 같이 fructose/glucose 함량비는 제1주성분 점수 또는 제2주성분 점수와 직선적인 상관관계를 보였다. 주성분점수가 커질수록 fructose/glucose 함량비는 감소 경향을 보였으며, fructose/glucose 함량비가 꿀의 품질평가 수단으로 매우 유용하다는 것을 입증한 것이라 판단된다. 이상에서 고찰한 바와 같이 각각의 분석자료를 독립적으로 보았을 때는 알 수 없었던 거시적이고도 총괄적인 정보를 추출할 수 있었다. 화학계량학적 고찰은 꿀의 당조성 패턴의 비교, 품질평가, 부정화 적발, 상호 유사성

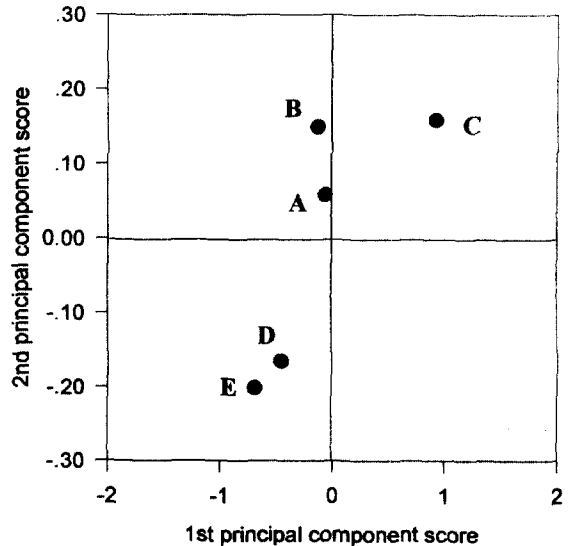


Fig. 5. PCA plot for the honeys samples : A, Chullado-1(acacia); B, Chullado-2(nut); C, Jirisan(azalea); D, Kangwondo(acacia); E, Australia Halcion(orange).

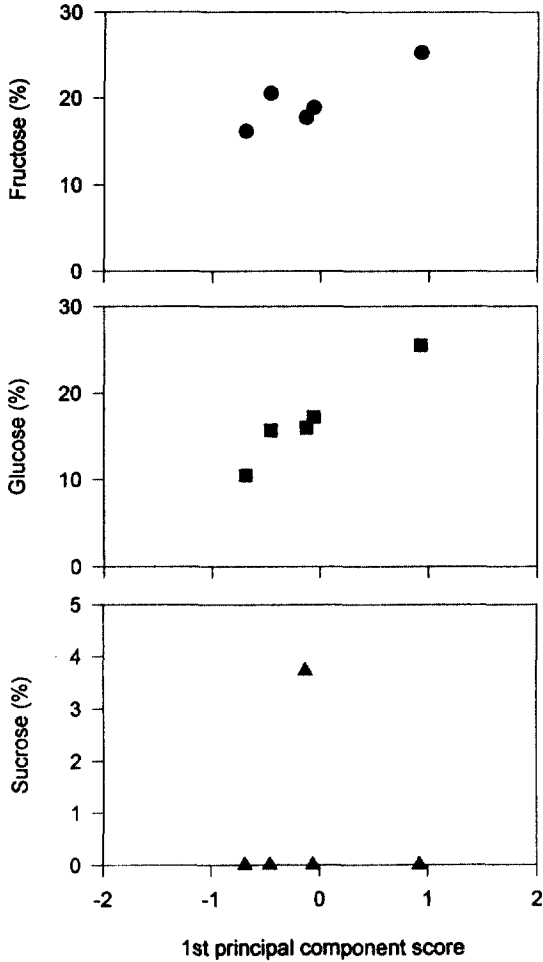


Fig. 6. The relationship between the first principal component score and fructose, glucose, sucrose(%) for the honeys samples.

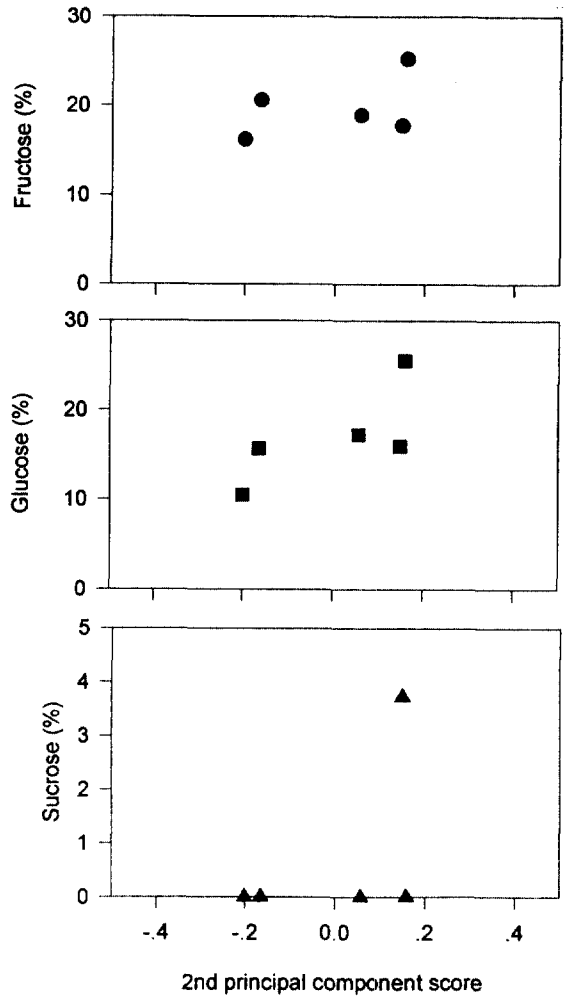


Fig. 7. The relationship between the second principal component score and fructose, glucose, sucrose(%) for the honeys samples.

과악에 매우 효과적인 방법이라 사료된다.

4. 결론

국내에서 유통되는 꿀의 품질지표를 제시할 목적으로 HPLC를 이용하여 꿀 중의 당성분을 분석한 다음 화학계량학적 고찰을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

당표준물질은 fructose, glucose, sucrose, maltose 순으로 분리되었으며, 검출한계는 6µg/mL 이하였다. 꿀의 주된 당성분은 fructose, glucose였고, 전라도 밤나무꿀에서 sucrose가 소량 검출되었다. 당 함량은 지

리산 진달래꿀>강원도 아카시아꿀>전라도 아카시아 벌집꿀>전라도 밤나무꿀>호주산 오렌지 벌집꿀 순이었다. Fructose/glucose 함량비는 0.99~1.55 범위였으며, 호주산 오렌지 벌집꿀>강원도 아카시아꿀>전라도 밤나무꿀>전라도 아카시아 벌집꿀>지리산 진달래꿀 순이었다. 꿀 중의 당성분 분석자료로부터 주성분 분석을 시행한 결과 Scree graph는 제1 및 제2 주성분이 자료 전체를 대표하는 유효 주성분을 보여 주었다. PCA plot은 지리산 진달래꿀과 호주산 오렌지꿀이 확연하게 구분되었다. 주성분 점수가 클수록 fructose, glucose뿐 아니라 sucrose 함량까지도 커지

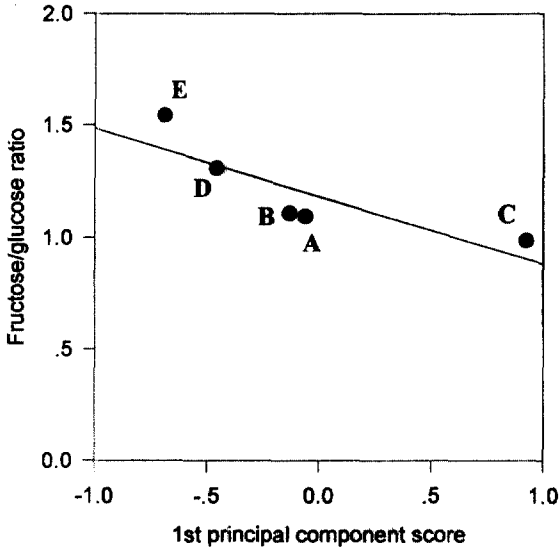


Fig. 8. The relationship between the first principal component score and fructose/glucose ratio for the honeys samples. A, Chullado-1(acacia); B, Chullado-2 (nut); C, Jirisan (azalea); D, Kangwondo(acacia); E, Australia Halcion(orange).

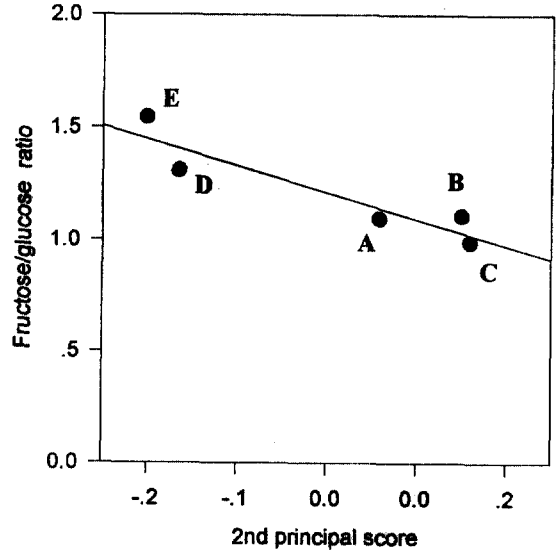


Fig. 9. The relationship between the second principal component score and fructose/glucose ratio for the honeys samples. A, Chullado-1(acacia); B, Chullado-2 (nut); C, Jirisan(azalea); D, Kangwondo(acacia); E, Australia Halcion(orange).

는 경향을 나타내었다. 주성분 점수가 커질수록 fructose/glucose 함량비는 감소경향을 보였으며, fructose/glucose 함량비가 꿀의 품질평가수단으로 매우 유용하였다. 화학계량학적 접근방법은 꿀의 당 조성 패턴을 비교하고 품질평가, 부정화 적발 등에 매우 유용한 정보를 추출하는 데 그 효용성이 크다는 결론을 얻었다.

참고문헌

1. M. A. Clarke, "Encyclopedia of Analytical Science," vol. 9, p.5091, Townshend, A. Ed., Academic, London, UK, 1995.
2. L. W. Doner, *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**, 443-456(1977).
3. J. W. White, *Bee World*, **61**, 29-37(1980).
4. C. A. Luccheci, *Anal. Chem.*, **51**, 224A-232A(1979).
5. T. Echigo, *Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ.*, **10**, 3-12(1970).
6. K.W. Swallow and N. H. Low, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1828-1832(1990).
7. M. E. Tate and C. T. Bishop, *Can. J. Chem.*, **40**, 2497-2507(1963).
8. L. R. Croft, *Trends Anal. Chem.*, **8**, 206-209(1987).
9. AOAC, "Official Methods of Analysis of AOAC International," 16th ed. vol. II, Ch. 44, Patricia Cunniff Ed. AOAC, Arlington, U.S.A., 1995.
10. J. W. White, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **75**, 543(1992).
11. F. A. Tomas-Barberan, F. Ferreres, M. A. Blazquez, C. Garcia-Viguera and F. Tomas-Lorente, *J. Chromatogr.*, **643**, 41-46(1993).
12. K. W. Swallow and N. H. Low, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **77**, 695-702(1994).
13. 김택제, 한국산 토종벌꿀의 이화학적 특성에 관한 연구, 한국과학기술원 보고서(BS G-492-1887-6), 1983. 2.
14. S. W. Lee, K. S. Kim, K. R. Lee, S. Y. Cho, K. J. Lee and K. H. Kim, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **3**, 168-171(1971).
15. 김복남, 김택제, 최홍식, 한국영양식량학회지, **20**, 52(1991).
16. S. Honda, *Anal. Biochem.*, **140**, 1-47(1984).