

HPLC-ELSD를 이용한 발효유 제품 중의 Isomaltooligosaccharides 분석법 개발

고진혁^{1,2} · 이문석² · 광병만² · 안장혁² · 박종수² · 권중호^{1*}

¹경북대학교 식품공학부, ²남양유업 중앙연구소 식품안전센터

Determination of Isomaltooligosaccharides in Yoghurts by Using HPLC-ELSD

Jinhyouk Ko^{1,2}, Moon-seok Lee², Byung-Man Kwak², Jang-Hyuk Ahn², Jong-Su Park², and Joong-Ho Kwon^{1*}

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Food Safety Center, Research and Development Institute, Namyang Dairy Co. Ltd, Sejong 314-914, Korea

Abstract

A rapid and simple analytical method for the determination of 9 isomaltooligosaccharides (IMO) species in yoghurts was developed using dispersive solid phase extraction (dSPE) clean-up technic and high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). In this study, 9 IMO were extracted from samples simply with chemical reagent using ISO22662 IDF198 method and additional dSPE clean-up. The optimum instrument conditions for the determination were used carbohydrate ES 5 μ column with gradient elution of water and acetonitrile and ELS detector. The linearity of this method was expressed as the correlation coefficient (r^2), the results of IMO 9 species were shown in 0.9999. LOD and LOQ were respectively 7.9-22.1 mg/kg, 25.9-72.8 mg/kg. The accuracy of intra- and inter-day measurements were in the range from 84.3 \pm 4.5 to 104.9 \pm 6.5%, and the precession of the intra- and inter-day measurements were in the range from 0.8 to 7.7%. The recoveries were from 84.3 \pm 4.5 to 104.9 \pm 6.5%. The determination results of IMO 9 species for the 9 yoghurts circulated in the market were in the range from 0.317 \pm 0.007 to 1.624 \pm 0.050 g/100 g. The newly developed method is appropriate for the determination of IMO in yoghurts, is a rapid and simple method with excellent resolution in compared with previous method.

Key words: isomaltooligosaccharides, HPLC, ELSD, yoghurts

서 론

난소화성 올리고당(Non-digestible oligosaccharides, NDOs)은 낮은 칼로리와 장내 유용 미생물의 성장에 도움을 주는 역할을 하는 식품소재로서, 최근 웰빙이나 건강의 증진을 목적으로 식품산업에서 많이 이용되고 있다(Mussatto and Mancilha, 2007). 올리고당의 주요 물리화학적 특징은 설탕보다 0.3-0.6배 물에 잘 녹으며, 단당류 혹은 이당류에 비해 높은 분자량을 가지기 때문에 점도가 높으며, 이로 인해 식품의 식감을 증가시키는 역할을 한다. 이와 함께 올리고당의 생리학적 특성은 설탕의 대체제, 낮은 칼로리 식품 또는 당뇨병 환자를 위한 식품으로도 많이 이용되며(Crittenden and Playne, 1996; Rivero-Urgell and Santamaria-Orleans, 2001), prebiotics로서 장내의 비피더스 균의 생육을 촉진시

키고, 병원성 박테리아의 성장을 억제시킨다(Sako *et al.*, 1999). 비타민 B 복합체(B₁, B₂, B₆ and B₁₂)와 나이아신 및 엽산을 생산하며, 또한 철, 칼슘, 마그네슘과 같은 미네랄과 흡착되어 미네랄의 흡수를 촉진시킨다(Sangeetha *et al.*, 2005; Voragen, 1998).

올리고당 중에서 상업적으로 이용이 가능한 종은 13종류로, 각각은 사이클로 텍스트린(cyclodextrins), 프락토올리고당(fructooligosaccharides), 갈락토올리고당(galactooligosaccharides), 겐티오올리고당(gentiooligosaccharides), 글리코실 슈크로스(glycosylsucrose), 이소말토올리고당(isomaltooligosaccharides), 이소말추로스(isomaltulose, or palatinose), 락토 슈크로스(lactosucrose), 락추로스(lactulose), 말토올리고당(maltooligosaccharides), 라피노스(raffinose), 콩올리고당(soybean oligosaccharides), 자일로올리고당(xylooligosaccharides)이 이에 포함된다(Sako *et al.*, 1999).

이 중에서 이소말토올리고당은 식품공전에 의하면 당질 원료를 포도당분자가 분지결합의 기본구조를 갖도록 효소를 작용시켜 얻은 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분

*Corresponding author: Joong-Ho Kwon, School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea. Tel: 82-53-950-5775, Fax: 82-53-950-6772, E-mail: jhkwon@knu.ac.kr

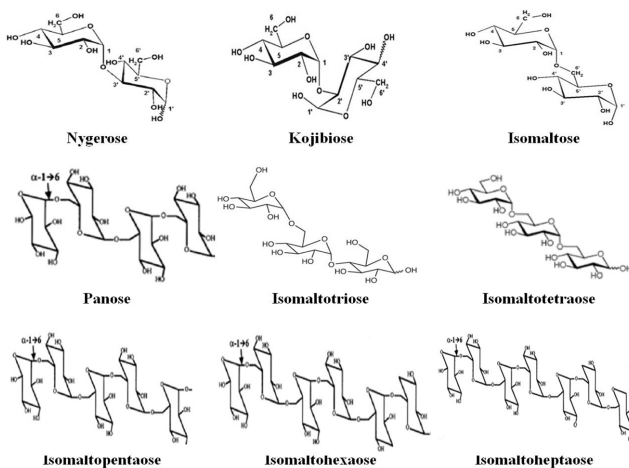


Fig. 1. The chemical structures of isomaltooligosaccharides.

말상의 것으로 중합도(DP) 2-7까지의 분지당 총 9종을 말한다(KFDA, 2012a). 이소말토올리고당 9종의 화학구조는 Fig. 1과 같이 나타내었으며, 이소말토올리고당 9종의 중합도를 포함한 화학적 특성을 Table 1과 같이 나타내었다.

최근에는 웰빙을 트렌드로 한 제품들 중 prebiotics를 제품에 포함한 기능성 발효유 제품들이 많이 유통된다. 특히, 이소말토올리고당은 효과대비가 가격적인 면에서 경제적이기 때문에 국내나 일본에서 전체 올리고당 수요의 반을 차지할 정도로 그 사용량이 많다.

이처럼 식품소재로서 많은 사용빈도를 차지하고 있음에도 불구하고, 이소말토올리고당에 대한 연구는 주로 효소를 이용하여 상업적으로 이용 가능한 소재의 제작에 관한 것이 대부분이며(Crittenden and Playne, 1996; Rivero-Urgell and Santamaria-Orleans, 2001), 정량 분석에 관한 연구는 찾기가 매우 어렵다. 뿐만 아니라 분석에 관한 연구의 대부분은 원료 및 시럽의 분석에 관한 내용으로, 이소말토올리고당이 함유된 제품을 시료로 한 연구는 거의 전무한 상태이다.

전통적으로 이소말토올리고당의 분석방법에는 국내의 경우 식품공전법의 올리고당 시럽을 시료로 하는 고성능 액체 크로마토그래피-시차굴절계 검출기(High performance

liquid chromatography-Refractive Index detection, HPLC-RID)를 이용한 분석법이 거의 유일하다(KFDA, 2012a). 이외에 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC)법을 이용하여 이소말토올리고당을 분석하였으며(Robyt and Mukerjee, 1994), anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection(AEC-PAD)에 의한 분석법이 연구되었지만(Goffin *et al.*, 2009; Goffin *et al.*, 2011) 이 또한 이소말토올리고당 원료에 대한 분석법으로, 이소말토올리고당이 첨가된 발효유 제품에 대한 분석법은 거의 전무하다.

본 연구에서는 prebiotics의 주 원료로 최근 각광받고 있는 이소말토올리고당의 기능성을 검증하기 위해, 국내 및 일본에서 주로 사용되는 이소말토올리고당의 현행 분석법의 한계점을 극복하고, 원료 시럽뿐만 아니라 발효유 제품 중에 존재하는 미량의 이소말토올리고당을 신속 정확하고, 효과적으로 추출, 정제 및 정량하기 위한 신규 분석법 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

정량분석을 위해 사용된 9종의 이소말토올리고당 표준물질 중 nigerose, kojibiose, isomaltose, panose, isomaltotriose는 Sigma사(USA)로부터 구입하였으며, isomaltotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose, isomaltoheptaose는 US Bio사(USA)로부터 구입하였다. 이소말토올리고당의 선택성 및 다른 단당류, 이당류, 올리고당류와의 분리능을 확인하기 위해 이소말토올리고당 이외의 9종의 표준물질이 사용되었으며, fructose, glucose, sucrose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose는 Supelco (USA)로부터 구입하였다. 모든 실험에 사용된 물은 HPLC grade로 Budick & Jackson사(Korea)로부터 구입하였으며, 실험에 사용된 시약으로 zinc acetate dihydrate, phosphotungstic acid monohydrate는 Sigma (USA)로부터 구입하였으며, glacial acetic acid는 Junsei사(Japan)로부터 구입하였다.

개발된 분석법 적용을 위한 분석시료는 이소말토올리고당 시럽 8종과 이소말토올리고당이 첨가된 발효유 9종이 사용되었으며, 17종 시료 모두 대전의 마트에서 유통중인 것을 구입하였으며, 구입 후 균질기로 충분히 균질시킨 후 시럽은 상온에서 보관하였으며, 발효유는 4°C 이하의 냉장보관 후 분석에 사용하였다.

실험기구 및 분석기기

본 실험에 사용된 실험기구는 일반적인 정량분석을 위해 이용되는 실험기구들이 사용되었으며, 전처리된 시약을 여과하기 위해 filter paper(Whatman filterpaper No.1, Whatman, England)가 사용되었으며, dispersive solid phase ext-

Table 1. The chemical properties of isomaltooligosaccharides

Oligosaccharides	DP value	Linkage type	Molecular formula	Molar mass
Nigerose	DP2	α-1-3	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
Kojibiose	DP2	α-1-2	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
Isomaltose	DP2	α-1-6	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
Panose	DP3	α-1-4 α-1-6	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.44
Isomaltotriose	DP3	α-1-6	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.44
Isomaltotetraose	DP4	α-1-6	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666.6
Isomaltopentaose	DP5	α-1-6	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	828.7
Isomaltohexaose	DP6	α-1-6	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	990.9
Isomaltoheptaose	DP7	α-1-6	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₆	1153.0

reaction(dSPE) clean-up 기술을 적용한 정제를 위해 primary secondary amine(PSA, Agilent, USA)과 C₁₈ (Agilent, USA)이 사용되었다. 최종적으로 추출된 용액을 필터하기 위해 나일론 필터(Nylon 0.2 µm, Sartorius, Korea)가 사용되었다. 최종 추출 용액의 조단백질 분석을 위해 단백질 분석기(Vapodest 50S, Gerhardt, Germany)가 사용되었다.

크로마토그램을 얻기 위한 분리용 컬럼으로는 당 분석 전용 컬럼(Prevail carbohydrate ES 5 µm, Alltech, USA)이 사용되었으며, 분석을 위한 분석기기로는 HPLC(Agilent 1100, Agilent, USA)와 검출기는 증기화 광산란 검출기(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)인 ELSD(Alltech ELSD 2000ES, Alltech, USA)가 사용되었다.

국내 공인분석법인 식품공전법과의 비교를 위해 배제형 이온교환계를 위한 분석용 컬럼(φ8 mm×200 mm MCI GEL CKO 4S, Mitsubishi chemical, Japan)과 가드 컬럼(φ8 mm×50 mm MCI GEL CKO 8S, Mitsubishi chemical, Japan)이 사용되었으며, 역상분배계의 적용을 위해 분석용 컬럼(φ4.6 mm×250 mm TSK GEL NH₂-60, Tosoh, Japan)이 사용되었다. 분석을 위한 분석기기로는 HPLC(Agilent 1100, Agilent, USA)와 검출기(RID, Waters, USA)가 사용되었다.

표준용액 조제

이소말토올리고당 9종의 stock standard solution의 조제를 위해 이소말토올리고당 9종 각각의 표준물질 10 mg을 e-tube에 계량한 후 증류수 1 mL로 mass up한 후 각각 10,000 mg/L가 되도록 한다. 검량선을 작성하기 위한 working standard solution의 조제를 위해 이소말토올리고당 9종 100 µL씩을 각각 취한 후 증류수 1 mL로 mass up한 후 이소말토올리고당 9종 mixture 1,000 mg/L가 되도록 조제한 후 이를 증류수로 희석하여 62.5, 125, 250, 500 mg/L가 되도록 조제하여 최종 working standard solution으로 사용하였다. 단, stock standard solution과 working standard solution은 실험 시마다 조제하여 사용하였다.

시료 전처리 방법

본 연구에서는 ISO22662 IDF198 전처리 method인 milk and milk products-determination of lactose content by HPLC (ISO and IDF, 2007)에 사용된 전처리 방법에 추가적으로 잔류 지방 및 간섭물질의 제거를 위해 dispersive solid phase extraction (dSPE) clean-up technic (AOAC international, 2007)을 적용한 simple한 전처리 방법을 적용하였다.

이소말토올리고당 시료 및 발효유 시료 1 g을 10 mL volumetric 플라스크에 검체한 후 5 mL의 증류수를 첨가하고 vortex mixer를 이용하여 1분간 가볍게 vortexing을 하면서 시료를 녹였다. 이 때 거품이 많이 발생하지 않도록 주의해야 한다. 2 mL의 Biggs-Szijarto solution (200 mL volumetric 플라스크에 25 g의 zinc acetate dihydrate와 12.5 g

phosphortungstic acid monohydrate를 첨가 후 100 mL 증류수로 녹이고 최종 증류수로 mass up한 후 20 mL의 glacial acetic acid를 첨가한 용액을 첨가한 후 vortex mixer로 1분간 가볍게 vortexing하였다. 다음으로 dSPE technic을 적용한 정제과정을 위해 Primary Secondary Amine(PSA)과 C₁₈ 각각 50 mg을 첨가한 후 증류수로 10 mL이 되도록 mass up하였다. 그 후 10분간 방치시킨 후 이 과정을 2회 더 반복하면서 시험용액을 추출 및 정제하였다. 추출 및 정제된 시험용액을 여과하기 위해 Whatman filterpaper No.1을 이용하여 자연압을 이용해 여과한 후 여과액은 다시 Nylon filter 0.2 µm를 이용하여 필터한 후 최종시료로 사용하였다.

기기 분석 조건

최적의 기기분석조건을 설정하기 위해 HPLC 및 ELSD를 이용하여 분석을 실시하였다. 발효유 중의 이소말토올리고당을 효과적으로 검출하기 위해 감도가 낮고 이동상의 기울기 용리가 불가능한 RID 대신 ELSD를 이용하여 분석을 실시하였다. 분석은 당 분석전용 컬럼(Prevail carbohydrate ES 5 µm, Alltech, USA)을 사용하였고, 이소말토올리고당 9종을 포함한 단당류, 이당류 및 기타 올리고당 총 18종에 대한 분리에 사용하였다. 이동상은 아세트니트릴과 물을 사용하였으며, 분자량이 동일하거나 유사한 당들을 분리하기 위해 각각의 이동상을 기울기 용리 조건으로 분석하였다. 최적의 기울기 용리 조건을 설정하기 위해 조건 설정 실험을 진행하였다. 본 연구에서 사용된 최적의 기울기 용리 조건은 아세트니트릴 함량이 0분에서 60분까지 95%에서 65%로 감소되고, 60분에서 75분까지 65%에서 50%, 75분에서 75.1분까지 50%에서 95%, 80분까지 95%에 95%로 조건을 변화시켰다. 이동상의 유속은 0.8 mL이며, 컬럼의 온도는 30°C, 총 분석시간은 80분, 시료 주입량은 10 µL 설정하였다. ELSD의 기기 분석 조건은 튜브의 온도는 95°C, 가스는 일반질소를 사용하였으며, 가스 flow는 2.0 L/min, Gain값은 1, impactor는 off 상태로 분석 조건을 설정하였다.

분석법 유효성 검증 시험

본 연구에서 새롭게 개발된 분석법의 유효성 검증(validation)은 식약청 의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 해설서(KFDA, 2008), ICH harmonized tripartite guideline (ICH Expert Working Group, 2005), IUPAC technical report (Thompson *et al.*, 2002) 그리고 AOAC guideline (AOAC Committee report, 1989)에 의해 수행하였다. 분석법의 유효성 검증을 위해 선택성, 직선성, 검출한계와 정량한계, 회수율 실험을 통한 정확성 및 정밀성을 평가하였다. 유효성 검증에 관련된 실험은 모두 3반복으로 수행하였다. 이소말토올리고당 9종 각각의 표준물질을 62.5, 125, 250, 500, 1000 mg/L의 5개의 표준물질을 이용하여 직선성을 평가하였으며, 각 농도별로 intensity

를 측정하여 검량선을 작성하였다. 직선성의 결과는 상관 계수(correlation coefficient, r^2)로 표현하였다.

검출한계와 정량한계를 평가하기 위해 이소말토올리고당 9종 각각의 표준용액을 적정 농도로 희석하여 크로마토그램 상에서 Signal to noise ratio(S/N ratio)가 3일 때의 농도를 검출한계로, 10일 때의 농도를 정량한계로 설정하였다.

이소말토올리고당 9종 각각에 대해 발효유 제품 중에 존재할 수 있는 수준인 100 mg/kg의 농도를 인위적으로 첨가하여 첨가 전·후의 회수율을 비교함으로써 회수율을 평가하였다. 일내 정확성을 측정하기 위해 하루에 3반복 실험을 하였으며, 일간 정확성을 측정하기 위해 3일간 반복 실험하였다. 정확성과 동일하게 일내 정밀성과 일간 정밀성을 측정하였으며, 결과값은 이소말토올리고당 9종의 각각의 피크에 대한 면적의 표준편차를 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

통계분석

실험의 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 일간 정확성의 일별 실험결과에 대한 유의적인 차이를 확인하기 위해 일원배치분산분석(One-way ANOVA)에 의해 신뢰수준 95%에서 검증하였다.

결과 및 고찰

현재 공인 분석법 전처리 방법의 한계

식품공전의 분석법(KFDA, 2012a)의 전처리 방법은 펄라이트를 이용한 탈지과정과 활성탄 및 이온교환수지를 이용한 정제과정을 거치는 복잡한 전처리 과정을 가지고 있다. 그리고 활성탄 및 이온교환수지를 직접 제조하여 정제과정에 이용해야 하므로 전처리 시간이 오래 걸리고 분석결과 재현성이 저하되는 문제점으로 인해 신뢰성 있는 분석 결과를 도출하기 어렵다.

시료 전처리 방법의 최적화

현행 분석법의 시료 전처리 방법을 개선하기 위해 본 연구에서는 발효유 중의 ISO22662 IDF198 전처리 method인 milk and milk products-determination of lactose content by HPLC (ISO and IDF, 2007)에 사용된 전처리 방법을 적용하였으며, 시료 중에 잔류 가능한 지방 및 단백질과 같은 간섭물질을 추가적으로 제거하기 위해 최근의 연구에서와 같이 잔류농약의 신속 분석에서 효과적인 시료 전처리를 위해 이용되어지는 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) method 중의 SPE 정제과정에서 사용되는 충진제를 이용하여 신속한 정제를 위해 새롭게 개발된 dSPE 기술을 적용하였다(AOAC international, 2007).

본 연구에서는 primary secondary amine(PSA)와 C_{18} 을 각각 50 mg을 첨가하여 dSPE 정제를 수행하였으며, 시료 중

의 지방산, 유기산 및 기타 비극성 방해물질을 제거함으로써 이소말토올리고당 분석을 위한 전처리 방법을 최적화하였다. 발효유 3종류를 전처리하여 최종 추출된 용액에 대해 식품공전 방법에 의해 조단백질(KFDA, 2012b) 및 조지방(KFDA, 2012c)의 함량분석을 실시하였다. 분석결과 조지방은 전 시료에서 검출되지 않았으며, 조단백질은 0.036-0.075% 수준으로 측정되었다. 이를 통해 새롭게 개발된 시료전처리 방법은 발효유 중의 간섭물질을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하였다.

현재 공인 분석법 기기 분석 방법의 한계

식품공전법의 역상분배계 컬럼($\phi 4.6$ mm \times 250 mm TSK GEL NH_2 -60, Tosoh, Japan)과 시차굴절계 검출기를 이용하여 이소말토올리고당 9종, 단당류, 이당류 및 기타올리고당 총 18종의 500 mg/L 표준물질 mixture를 측정 후 얻은 크로마토그램을 Fig. 2(a)에 나타내었다. 즉, 아세트니트릴 : 물 (63:37, v/v)의 이동상을 단일 농도구배로 해서 시차굴절계 검출기로 분석한 결과 분자량이 유사하거나 동일한 단당류와 이당류가 거의 동시에 나와 분리능이 매우 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 22분 이후에 나오는 당류는 시차굴절계 검출기의 낮은 감도로 인해 500 mg/L 수준의 농도도 검출이 불가능하였다. 그림의 크로마토그램과 같이 현행 분석법을 이용하여 이소말토올리고당을 분석할 경우 낮은 분리능과 감도로 인해 신뢰성있는 결과값을 얻는 데에 한계가 있었다.

기기 분석 방법의 최적화

이소말토올리고당 9종, 기타 단당류, 이당류 및 올리고당의 분리능을 최적화하기 위해 당 전용 컬럼인 Prevail carbohydrate ES 5 μ m를 사용하였다. 본 연구에서는 당류 18종의 분리능을 최적화하기 이동상으로 아세트니트릴과 물을 이용하여 기울기 용리 조건을 적용하였다. 다양한 기울기 용리조건 테스트 결과 아세트니트릴 함량이 0분에서 60분까지 95%에서 65%로 감소되고, 60분에서 75분까지 65%에서 50%, 75분에서 75.1분까지 50%에서 95%, 80분까지 95%에 95%로 변화되도록 하였으며, 이동상의 유속은 모두 0.8 mL/min으로 분석 조건을 최적화시켰다. 컬럼의 온도는 30°C, 시료 주입량은 10 μ L로 분석조건을 설정하였다. 최적화된 분석조건을 적용하여 500 mg/L 농도의 당류 18종 mixture를 분리한 크로마토그램을 Fig. 2(b)와 같이 나타내었다. 크로마토그램상의 분리된 당류 18종은 단당류 2종(fructose, glucose), 2당류 5종(sucrose, nigerose, maltose, kojibiose, isomaltose), 3당류 3종(maltotriose, pannose, isomaltotriose), 4당류(maltotetraose, isomaltotetraose), 5당류 2종(maltopentaose, isomaltopentaose), 6당류 2종(maltohexaose, isomaltohexaose), 7당류 2종(maltoheptaose, isomaltoheptaose)이다. 현행분석법에서는 단일 용리구배 조건을 사용함

으로써 중합도별 당이 거의 분리가 이루어지지 않고 한꺼번에 용출되어 각각의 당 피크에 대한 매우 낮은 선택성을 나타냈으나, 최적화된 분석 조건을 적용한 결과 Fig. 2(b)에서 보는 바와 같이 중합도별 그리고 분자량이 유사하거나 동일한 당들도 뚜렷하게 분리가 되었음을 확인할 수 있었다.

분석법 유효성 검증

선택성

농도 1000 mg/L의 이소말토올리고당 9종 mixture의 표준물질(a)와 이소말토올리고당이 첨가되지 않은 발효유에 100 mg/kg 농도의 이소말토올리고당 9종을 첨가한 시료(b)에 대한 크로마토그램을 Fig. 3과 같이 나타내었다. 각각의 피크는 독립적으로 분리되어 시료 중에서 이소말토올리고당만을 선택적으로 분리 가능하였으며, 본 연구에서 개발된 전처리 및 기기분석 조건이 충분히 선택적임을 확인할 수 있었다.

직선성

이소말토올리고당 표준물질들의 직선성을 확인하였다. ELSD의 특성상 검량선은 linear하지 않고 quadratic한 특성을 가지므로 각각의 회귀방정식은 2차 방정식으로 표현하였으며(Peng *et al.*, 2006), 그 결과, nigerose, kojibiose, isomaltose, pannose, isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose, isomaltoheptaose 모두 상관계수 (correlation coefficient, r^2)가 0.9999로 우수한 직선성을 나타내었다. 이소말토올리고당 9종의 검량선과 상관계수를

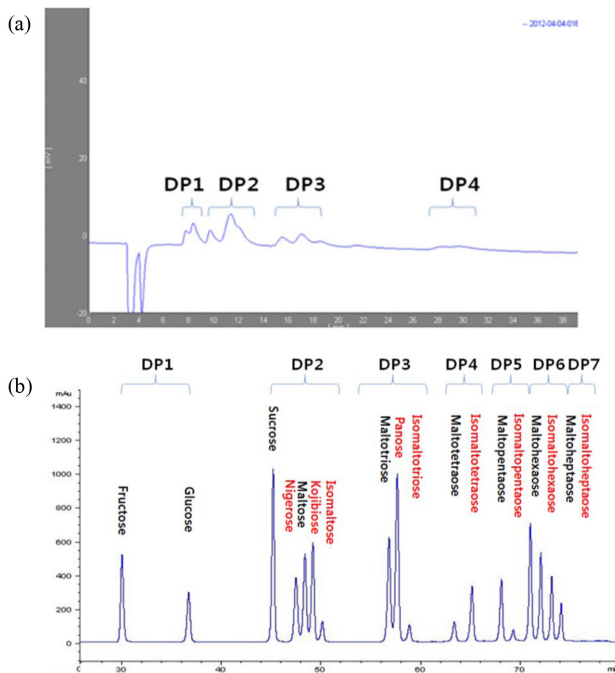


Fig. 2. Reverse phase HPLC-RID chromatogram of isomaltooligosaccharides (a), HPLC-ELSD chromatogram of isomaltooligosaccharides (b).

Fig. 4와 같이 나타내었다.

검출한계 및 정량한계

이소말토올리고당 9종에 대한 검출한계 및 정량한계를 Table 2에 나타내었다. 검출한계와 정량한계가 가장 낮은 것은 isomaltoheptaose 로 각각 7.9, 25.9 mg/kg으로 가장 감도가 높았으며, isomaltose의 검출한계와 정량한계가 각각 22.1, 72.8 mg/kg으로 가장 낮은 감도를 나타내었다.

회수율, 정확성 및 정밀성

회수율, 정확성 및 정밀성 측정결과를 Table 2로 나타내었다. 회수율 측정 결과 이소말토올리고당 9종에 대해 84.3 ±6.8-104.9±6.5%로 양호한 결과값을 나타내었다. 일내 및 일간 정확성 및 정밀성을 측정한 결과 일내 정확성은 84.3±4.5-104.9±6.5%, 일내 정밀성은 0.8-7.7%로 나타났으며, 일간 정확성 및 정밀성을 측정한 결과 일간 정확성은 89.9±0.9-102.9±4.8%, 일간 정밀성은 1.0-5.7%로, 일내, 일간 정확성 및 정밀성 모두 양호한 결과값을 얻었다. 3일간의 일간 정확성의 유의적인 차이를 검증하기 위해 일원 배치분산분석(One way anova)에 의한 검증 결과 신뢰수준 95%에서 일간 실험결과 간에는 유의적인 차이가 없었다.

시럽 및 발효유 함량 분석

본 연구에서 개발된 신규 분석법을 이용하여 대전시내에서 유통중인 이소말토올리고당 시럽제품 8종과 발효유 9종에 대한 이소말토올리고당 정량 분석을 실시하였다. 시럽 제품에 대한 정량 분석 결과는 Table 3에 나타내었다. 시럽 A, C, D는 nigerose, isomaltotetraose, isomaltopentaose, iso-

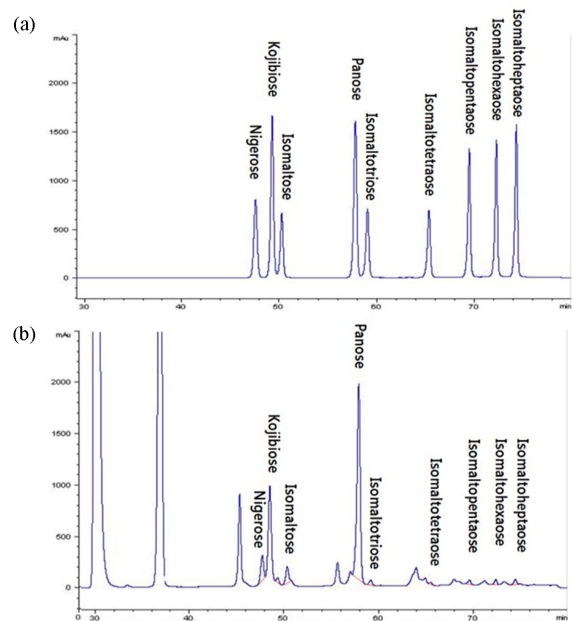


Fig. 3. HPLC-ELSD chromatogram of isomaltooligosaccharides standard (a), fortified sample at 100 mg/kg (b).

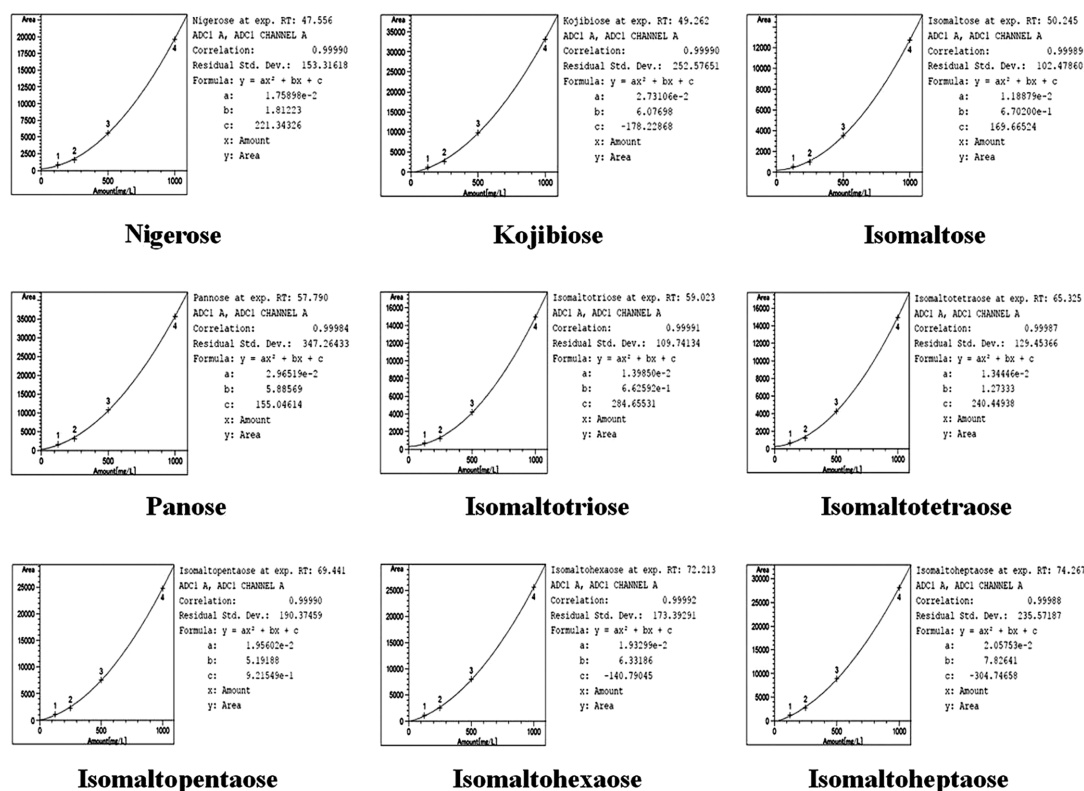


Fig. 4. Calibration curves for isomaltooligosaccharides.

maltohexaose는 검출되지 않았으며, panose가 약 11%로 가장 높게 검출되었으며, isomaltose, isomaltotriose, isomaltoheptaose, kojibiose 함량 순으로 검출되었다. 시럽 B와 E의 경우는 nigerose, kojibiose, isomaltotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose는 검출되지 않았으며, panose가 가장 높게 검출되었으며, 그 다음은 isomaltose가 높게 검출되었으며, isomaltotriose, isomaltoheptaose는 비슷한 수준으로 검출되었다. G 시럽의 경우는 nigerose, kojibiose, isomaltotetraose, isomaltopentaose는 검출되지 않았으며, 다른 시료와는 달리 isomaltotriose가 검출되지 않았고, isomaltohexaose가 미량 검출되었다. Panose가 가장 많이 검출되었으며, 그 다

음으로 isomaltose와 isomaltoheptaose가 검출되었다. F와 H 시료의 경우는 다른 6종의 시료와는 다르게 isomaltose가 panose에 비해 더 높게 검출되었다. Panose와 isomaltotriose가 유사한 수준으로 검출되었으며, 다른 시료에서 볼 수 없었던 nigerose와 isomaltotetraose가 유사한 수준으로 검출되었다.

시중에서 유통중인 이소말토올리고당 시럽 검사 결과 중합도 2-3인 Panose와 isomaltose가 가장 많은 함량을 구성하고 있었으며, 그 외 미량 수준으로 nigerose, kojibiose, isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltohexaose, isomaltoheptaose가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 중합도가 4 이상인 이소말토올리고당은 아주 미량으로 존재하는

Table 2. Recovery, accuracy, precision, detective and quantitative limits of isomaltooligosaccharide by HPLC-ELSD

Oligosaccharides	Spiked content (mg/kg)	Recovery (%)	Intraday (n=3)		Interday (n=3)		LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
			Precision (CV, %)	Accuracy (%)	Precision (CV, %)	Accuracy (%)		
Nigerose	100	95.7±3.8 ¹⁾	95.7±3.8	4.0	99.5±2.9 ²⁾	2.9	17.0	56.3
Kojibiose	100	94.6±1.7	94.6±1.7	1.8	93.9±4.5 ²⁾	4.8	9.6	31.7
Isomaltose	100	101.7±4.9	101.7±4.9	4.9	93.7±2.6 ²⁾	2.7	22.1	72.8
Pannose	100	84.3±4.5	84.3±4.5	5.3	95.5±4.8 ²⁾	5.0	8.0	26.5
Isomaltotriose	100	104.9±6.5	104.9±6.5	6.2	96.6±4.2 ²⁾	4.3	19.7	65.1
Isomaltotetraose	100	92.4±4.5	92.4±4.5	4.8	89.9±0.9 ²⁾	1.0	16.7	55.0
Isomaltopentaose	100	94.7±0.7	94.7±0.7	0.8	102.9±4.9 ²⁾	4.8	9.2	30.4
Isomaltohexaose	100	87.9±6.8	87.9±6.8	7.7	92.2±3.3 ²⁾	3.5	8.1	26.6
Isomaltoheptaose	100	102.3±1.2	102.3±1.2	1.2	95.7±3.2 ²⁾	3.3	7.9	25.9

¹⁾Mean±S.D (n=3), ²⁾Interday precision was not significantly different by one-way ANOVA ($p>0.05$).

것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 중합도 5의 isomalto-pentaose는 어느 시료 중에서도 검출되지 않았다. 이러한 결과는 이전에 발표된(Goffin *et al.*, 2011) 연구결과에서 언급한 것처럼 isomaltooligosaccharide 중에서 isomaltos와 panose가 가장 풍부하게 존재한다는 것과 일치한 결과이다. 시료 8종에 대한 이소말토올리고당 함량의 총합은 $14.488 \pm 0.146 - 32.892 \pm 0.429$ g/100 g 수준으로 검출되었다.

발효유 제품에 대한 정량 분석 결과는 Table 4와 같이 나타내었다. 발효유 b-g의 경우는 시럽에서의 분석결과와 거의 유사하다. Nigerose, isomlatotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose는 검출되지 않았으며, panose가 가장 높게 검출되었으며, 그 다음으로 isomaltose가 높게 검출되었으며, 그 외의 kojibiose, isomaltotriose, isomaltoheptaose는 불검출 혹은 미량 수준으로 검출되었다. 발효유 a의 경우도 b-g 시료와 유사하게 panose가 가장 높은 수준으로 검출되었으나, 다른 발효유 시료에서는 나타나지 않은 nigerose 및 isomaltohexaose가 미량의 수준으로 검출되었다. 발효유 h와 i의 경우는 a-g 시료와는 다르게 isomaltotriose가 가장 높은 수준으로 검출되었으며, 그 다음으로 isomaltose, panose 수준으로 검출되었다. 그 외 kojibiose와 isomaltoheptaose가 미량 수준으로 검출되었으며, 다른 발효유와 마찬가지로 nigerose, isomlatotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose는 검출되지 않았다.

발효유 제품중의 이소말토올리고당 분석결과 시럽에서의 분석결과와 거의 유사하게 나타났으며, 시럽에서와 마찬가지로 기존에 발표된(Goffin *et al.*, 2011) 연구결과에서 언급한 것과 일치하는 결론을 얻었으며, 발효유 중의 이소말토올리고당 함량의 총합은 $0.317 \pm 0.007 - 1.624 \pm 0.050$ g/100 g 수준으로 검출되었다. 새롭게 개발된 HPLC-ELSD를 이용한 이소말토올리고당 분석법은 고농도로 존재하는 시럽 시료뿐만 아니라, 미량으로 존재하는 발효유 중에서의 이소말토올리고당 정량 분석에도 적합하였다.

요 약

본 연구를 통해 현행 이소말토올리고당 분석법의 한계를 극복하고 원료 시럽뿐만 아니라 발효유 중의 미량의 이소말토올리고당 함량을 신속, 정확하게 분석하기 위한 새로운 분석법을 개발하였다. IDF method와 dSPE 기술을 적용하여 전처리 방법을 개선하였고, 당 전용 컬럼과 ELSD를 이용하여 기기분석조건을 최적화하였다. 새롭게 개발된 분석법은 유효성 검증 절차에 의해 선택성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 회수율, 정확성 및 정밀성이 유효함을 확인하였다. 또한 시장에서 유통 중인 시럽 및 발효유 제품을 분석한 결과 이전에 발표된 연구결과와 일치하는 결론을 얻었으며(Goffin *et al.*, 2011), 이소말토올리고당을 구성하는

Table 3. Contents of isomaltooligosaccharides in syrups circulated in the market (g/100 g)

Oligosaccharides	Syrup A	Syrup B	Syrup C	Syrup D	Syrup E	Syrup F	Syrup G	Syrup H
Nigerose	N.D. ¹⁾	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.887±0.028	N.D.	0.711±0.014
Kojibiose	0.437±0.018 ²⁾	N.D.	0.575±0.022	0.679±0.019	N.D.	1.749±0.042	N.D.	1.827±0.051
Isomaltose	6.033±0.144	3.609±0.093	6.456±0.057	6.534±0.189	4.954±0.121	16.049±0.187	3.427±0.038	14.851±0.301
Panose	11.567±0.484	8.135±0.118	11.068±0.328	11.075±0.444	12.006±0.224	3.974±0.083	11.640±0.269	8.336±0.179
Isomaltotriose	2.198±0.026	1.330±0.042	2.131±0.010	1.157±0.031	0.821±0.011	7.964±0.129	N.D.	6.436±0.158
Isomaltotetraose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.473±0.061	N.D.	0.732±0.018
Isomaltopentaose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isomaltohexaose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.721±0.023	N.D.
Isomaltoheptaose	1.792±0.059	1.414±0.015	1.813±0.042	1.172±0.037	1.317±0.059	N.D.	1.153±0.029	N.D.
Total	22.027±0.465	14.488±0.146	22.043±0.241	20.617±0.704	19.099±0.405	32.096±0.319	16.941±0.309	32.892±0.429

¹⁾Not detected, ²⁾Mean±S.D (n=3).

Table 4. Contents of isomaltooligosaccharides in the yoghurts circulated in the market (g/100 g)

Oligosaccharides	Yoghurt a	Yoghurt b	Yoghurt c	Yoghurt d	Yoghurt e	Yoghurt f	Yoghurt g	Yoghurt h	Yoghurt i
Nigerose	0.094±0.002 ²⁾	N.D. ¹⁾	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kojibiose	N.D.	0.049±0.001	0.055±0.001	0.049±0.001	0.042±0.001	0.073±0.001	0.064±0.001	0.056±0.001	0.050±0.002
Isomaltose	0.069±0.002	0.316±0.003	0.337±0.018	0.278±0.008	0.059±0.002	0.487±0.008	0.302±0.011	0.191±0.003	0.167±0.008
Panose	0.120±0.004	0.557±0.018	0.607±0.003	0.478±0.010	0.132±0.004	0.781±0.032	0.481±0.011	0.117±0.003	0.096±0.003
Isomaltotriose	N.D.	0.120±0.004	0.125±0.005	0.087±0.002	N.D.	0.185±0.007	0.110±0.002	1.114±0.041	1.056±0.034
Isomaltotetraose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isomaltopentaose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isomaltohexaose	0.051±0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isomaltoheptaose	0.075±0.001	0.092±0.001	0.089±0.001	0.090±0.002	0.084±0.003	0.099±0.004	0.083±0.002	0.044±0.003	0.035±0.001
Total	0.409±0.007	1.133±0.021	1.213±0.024	0.981±0.010	0.317±0.007	1.624±0.050	1.040±0.007	1.522±0.040	1.404±0.047

¹⁾Not detected, ²⁾Mean±S.D (n=3).

성분 중 panose, isomaltose 및 isomaltotriose가 가장 많은 비율을 차지하는 것을 확인하였다.

본 연구 결과는 지방 및 단백질이 많고 유화의 특성을 가진 발효유 중에서의 이소말토올리고당 함량을 신속, 정확하게 분석할 수 있는 기술이 될 것으로 기대된다. 이러한 분석 기술은 향후 식품산업현장에는 물론 발효유를 소비하는 소비자들에게 발효유의 기능성에 대한 정확한 평가를 가능하게 하고, 이소말토올리고당 뿐만 아니라 당 분석을 위한 기초 연구자료로 활용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. AOAC Committee report. (1989) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 694-704.
2. AOAC international. (2007) Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. Maryland, USA.
3. Crittenden, R. G. and Playne, M. J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* **7**, 353-361.
4. Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., and Paquot, M. (2011) Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **5**, 394-409.
5. Goffin, D., Robert, C., Wathelet, B., Blecker, C., Malmendier, Y., and Paquot, M. (2009) A Step-forward method of quantitative analysis of enzymatically produced isomaltooligosaccharide preparations by AEC-PAD. *Chromatogr.* **69**, 287-293.
6. ICH Expert Working Group. (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised tripartite guideline. **Step 4**, 1-18.
7. ISO and IDF. (2007) ISO22662 IDF198 first edition. Milk and milk products-determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method). Switzerland.
8. KFDA (Korea Food and Drug Administration). (2008) The handbook for the method validation guidelines about drug products. Administrative publications 11-1470000-001693-01. Seoul, Korea.
9. KFDA (Korea Food and Drug Administration). (2012a) Food Standards Codes. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 65-71.
10. KFDA (Korea Food and Drug Administration). (2012b) Food Standards Codes II. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 12-13.
11. KFDA (Korea Food and Drug Administration). (2012c) Food Standards Codes II. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 35-36.
12. Mussatto, S. I. and Mancilha, I. M. (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **68**, 587-597.
13. Peng, C. A., Ferreira, J. F. S., and Wood, A. J. (2006) Direct analysis of artemisinin from *artemisia annua L.* using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector, and gas chromatography with flame ionization detector. *J. Chromatogr. A.* **1133**, 254-258.
14. Rivero-Urgell, M. and Santamaria-Orleans, A. (2001) Oligosaccharides: Application in infant food. *Early Human Development.* **65**, S43-S52.
15. Robyt, J. F. and Mukerjea, R. (1994) Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.* **251**, 187-202.
16. Sako, T., Matsumoto, K., and Tanaka, R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.* **9**, 69-80.
17. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., and Prapulla, S. G. (2005) Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 442-457.
18. Thompson, M., Ellison S. L. R., and Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835-855.
19. Voragen, A. G. J. (1998) Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 328-335.

(Received 2013.3.18/Accepted 2013.6.11)