

KRISS/TR--2022-019

HPLC를 이용한 당류와 당알코올 정량 분석 측정가이드

Measurement guide for quantitative analysis
the sugars and sugar alcohols
by HPLC(High performance liquid chromatography)

2022. 05.

한국표준과학연구원

이 측정가이드는 측정·시험 절차가 없는 신제품(기술)에 대한 신뢰성 제고를 위해 개발되었습니다. 현재까지의 축적된 경험과 과학적 사실에 근거해 해당분야 전문가에 의해 작성되었고 새로운 과학적 타당성이 확인될 경우 언제든지 개정될 수 있습니다.

또한, 이 측정가이드에 기술된 내용은 권고사항으로 법적인 구속력을 갖지 않습니다. 제시된 방법은 최신의 규정과 과학적 근거를 바탕으로 기술한 것으로 추후 관련 규정 개정 및 과학의 발전으로 수정 될 수 있습니다.

이 측정가이드에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 한국표준과학연구원 중소기업협력그룹으로 연락주시기 바랍니다.

전화번호: (042)868-5411

측정가이드 제·개정 이력

개정 번호	일 시	개정사유	작 성 자	
			소 속	성 명
0	2022.05.11	최초 제정	한 국 표 준 과 학 연 구 원	서정기
최종 제·개정 심의위원			(주) 대덕분석기술연구원 (주) 대덕분석기술연구원 한국건설생활환경시험연구 (주) 대덕분석기술연구원	김상돈 박지현 유찬주 최병인

※ 심의위원 명단은 '가나다' 순서임.

목 차

1. 요약문	1
2. 적용범위	1
3. 참고문서 및 문헌	1
4. 용어의 정의	1
5. 시험 방법의 개요	2
6. 시약 및 재료	2
7. 시험장치	3
8. 시험용액의 준비	4
9. 품질관리	5
10. 시험방법	6
11. 기기 분석	7
12. 시험 결과의 계산	7
13. 시험 결과의 작성	8

HPLC를 이용한 당류와 당알코올 정량 분석 측정가이드
Measurement guide for quantitative analysis the sugars and sugar alcohols
by HPLC(High performance liquid chromatography)

1. 요약문

이 가이드는 이화학분야에서 정성, 정량분석을 하기 위해 사용되는 고성능액체크로마토그래프(HPLC)를 이용하여 당류와 당 알코올을 분석하는데 필요한 절차와 방법에 대한 것이다. 당류와 당 알코올 분석에는 RI검출기가 사용된다.

이 측정가이드는 위와 같은 시험에 필요한 각종 장비 및 절차, 측정 결과 분석, 시험성적서 작성법 등을 제공하고 있다. 이 가이드는 바이오 제약 분야에서 요구되는 당류와 당 알코올의 정성, 정량 분석에 활용하기 위하여 개발되었다.

2. 적용범위

이 측정가이드는 초음파 추출, 속슬렛 추출 등 전처리 및 필터한 용액을 HPLC를 이용하여 RI 검출기로 정성, 정량 분석하는데 적용한다. 시험범위는 당류와 당 알코올류이다.

3. 참고문서 및 문헌

- 3.1 고성능 액체크로마토그래프 기기의 성능검증을 위한 밸리데이션 가이드라인에 대한 연구, 2013. 조선대 약대 화학과
- 3.2 기기분석법에 의한 당류의 정량, 2014, 식품첨가물공전
- 3.3 어린이 기호식품 중 당류 및 당알코올류 함량 분석, 2014, 서울시 보건환경연구원
- 3.4 HPLC를 이용한 식품 중 당알코올 8종 동시 분석, 2011, 식품의약품안전평가원
- 3.5 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 2015, 식품의약품안전평가원
- 3.6 KS M 0033:2008 고속액체크로마토그래피의 분석 방법 통칙

4. 용어의 정의

4.1 고속액체크로마토그래피(HPLC)

송액 펌프를 사용하여 용리액을 분리관에 주입하여 고속도, 고성능으로 각 성분을 분리하는 장치를 말하며, 용리액조, 펌프, 시료주입장치, 분리관, 검출기, 기록계로 구성되어있다.

4.2 당

식용 결정체이고 단맛을 내는 물질을 말한다. 대표적으로 과당(Fructose), 포도당(Glucose), 설탕(Sucrose), 유당(Lactose) 등이 있다.

4.3 당알코올

일반적으로 당으로부터 유도된 유기 화합물로, 각 탄소 원자에 한 개의 하이드록시기(-OH)가 부착되어있다. 대표적으로 에리스리톨(Erythritol), 이노시톨(Inositol), 자일리톨(Xylitol), 만니톨(Mannitol) 등이 있다.

5. 시험 방법의 개요

당류와 당 알코올류는 발색단이 없으므로 가장 흔하게 사용되는 자외선검출기로 분석이 불가능하며, 굴절률검출기를 사용하여 검출한다. 시료 내 함유하고 있는 당류 및 당 알코올류의 함량을 계산하기 위하여 용액의 비율, 분리관 규격, 검출기 온도 등의 변수를 이용하여 시료 내 당류 및 당 알코올류와 방해물질을 분리해낸다. 그리고 분리해낸 시료를 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 검출 반응값을 사용하여 정량 분석을 계산한다. 무게를 알고 있는 시료를 이동상에 희석하고, 극성 칼럼이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피 내로 이 용액의 일정량을 주입한다. 이 컬럼은 당류 및 당알코올류에 대하여 뚜렷한 선택성을 보이지만 알데하이드류를 비롯한 타 유기물질에는 거의 친화력을 갖지 않는다. 분리관은 분리관에서 분리된 성분을 검출하는 RI 검출기로 연결된다. 검출기로부터의 전기적 신호는 데이터 프로세서에 의해 계속적으로 모니터되며, 시료로부터의 신호 높낮이는 이전에 실행된 검량 기준으로부터 얻어진 값과 비교함으로써 시료 내 당류 및 당 알코올류의 질량 퍼센트를 계산한다.

6. 시약 및 재료

6.1 아세트나이트릴

고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 등급

6.2 정제수

고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 등급

6.3 당류 및 당알코올류 표준물질

순도 99 % 이상

- 비고 1. 사용 전 고성능 액체크로마토그래피 이동상을 퍼지할 것을 권장한다. 이는 헬륨으로 온라인에서 또는 초음파세척기에서 오프라인으로 편리하게 행할 수 있다.
- 비고 2. 표준물질은 가능한 소급성이 명시된 인증표준물질을 구입하여 측정농도에 맞게 직접 사용하거나 저농도로 희석하여 사용한다.

표 1. 당류 및 당알코올류

시료 No.	물질명	특징과 기능
1	Xylitol	설탕 대용품이나 치아 관리용품에 이용
2	Fructose	액상 과당의 형태로 가공식품과 음료에 많이 이용됨
3	Glucose	뇌, 신경, 폐 조직의 에너지원
4	Mannose	사람의 물질대사, 특히 특정 단백질의 글리코실화의 핵심
5	Galactose	동맥경화증 치료, 특정 암세포의 사멸
6	Sucrose	식물에서 추출한 후 정제하여 일상에서 소비하는 설탕을 만들
7	Maltose	말테이스에 의해 분해되어 2분자의 포도당을 생성(에너지 생산)
8	Lactose	알칼리성 용액에서 락툴로스로 이성질화됨(변비 치료에 이용)
9	Raffinose	비피두스균의 증식원

7. 시험 장치

7.1 액체 크로마토그래피

본 측정가이드에서 규정하는 시험 조건에 따라 1 % 이하의 흔들림과 0.5 % 이상의 정밀도를 가지고 0.5 ~ 1.5 mL/min의 유량에서 이동상을 이송할 수 있는 고성능 장치로 구성된 것

7.2 시료 주입 시스템

1 % 이상의 반복성을 가지며 시료 용액 5 μ L ~ 30 μ L 주입이 가능한 시스템

7.3 시료 필터

기공이 0.45 μ m 또는 그 이하의 마이크로 필터로 구성된 것. 시료 용액으로부터의 입자상 물질을 제거하기 위해 사용된다.

7.4 분리관 시스템

3 μ m, 5 μ m 또는 10 μ m 극성 아미노 결합 실리카 정지상으로 충전된 스테인리스 스틸 고성능 액체크로마토그래피 분리관으로 구성된 시스템

7.5 온도 조절

(30 \pm 10) $^{\circ}$ C의 범위 내에서 일정한 온도로 유지 가능하며, 고성능 액체크로마토그래피 분리관 오븐을 조절할 수 있는 것

7.6 RI검출기

주어진 감도 요구사항을 만족하고, 데이터 시스템에서 적절한 출력 신호를 가질 수 있는 것

7.7 컴퓨터 또는 적분기

머무름 시간과 피크 영역 측정이 가능하고 RI 검출기와 호환되는 데이터 시스템으로 구성된 시스템

7.8 부피플라스크

10 mL, 50 mL, 100 mL의 A등급 또는 교정된 것

7.9 비커

50 mL, 100 mL, 500 mL 용량의 것

7.9 자동 저울

±0.1 mg의 정확성을 가지는 저울

7.10 매스실린더

50 mL, 100 mL, 500 mL의 A등급 또는 교정된 것

7.11 매스피펫

0.1 mL, 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL의 A등급 또는 교정된 것

7.12 초음파 추출기

7.13 HPLC용 바이알 (2 mL)

7.14 40 mL 실험용 바이알

8. 시험 용액의 준비

8.1 당류 및 당 알코올류 검정표준용액 조제

검정표준용액은 아래와 같이 직접 조제 또는 공인된 시판품을 구입하여 사용 가능하다.

8.1.1 1 % 개별표준흡합저장용액

표 1의 표준물질들을 각각 1.0 g씩 0.001g까지 정확하게 취하여 100 mL 비커에 넣은 후 소량의 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25)으로 녹인 다음, 100 mL 부피플라스크에 옮겨 눈금까지 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25)으로 눈금까지 채운 후 잘 흔들어 섞는다. (필요 시, 초음파추출기를 사용할 수 있다.)

8.1.2 HPLC 분석을 위한 1000 mg/L 중간표준혼합용액

1 % 개별저장표준용액을 10 mL 정확하게 취하여 100 mL 부피측정용 플라스크에 넣고 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25)으로 눈금까지 채워 당류 및 당 알코올류 분석용 200 mg/L 중간표준용액을 조제한다.

8.1.3 HPLC 분석을 위한 2000 mg/L 중간표준혼합용액

1 % 개별저장표준용액을 20 mL 정확하게 취하여 100 mL 부피측정용 플라스크에 넣고 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25)으로 눈금까지 채워 당류 및 당 알코올류 분석용 200 mg/L 중간표준용액을 조제한다.

8.1.3 HPLC 분석을 위한 5000 mg/L 중간표준혼합용액

1 % 개별저장표준용액을 50 mL 정확하게 취하여 100 mL 부피측정용 플라스크에 넣고 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25)으로 눈금까지 채워 당류 및 당 알코올류 분석용 200 mg/L 중간표준용액을 조제한다.

9. 품질관리

9.1 정량범위 내에서 3개 이상의 농도에 대하여 검정곡선을 작성하고 얻어진 검정곡선 상관계수(R²)는 0.995 이상이어야 한다.

9.2 기기 재현성은 중간농도의 검정 표준용액의 농도편차를 확인함으로써 관찰한다. 검정 곡선 작성 후, 시료 20개마다 중간 검정 용액을 1회씩 분석하고, 모든 시료들의 분석이 끝난 후 기기의 재현성을 계산하고, 이때 허용오차는 $\pm 25\%$ 이내이어야 한다.

9.3 바탕시험은 6개 이상 20개 이하 시료마다 수행해야 한다. 바탕시험 값은 정량한계 미만이어야 한다.

9.4 중복시료는 시료 6개 이상 20개 이하 시료마다 수행해야 하며, 시료 개수가 5개 이하일 경우는 수행하지 않는다. 중복시험의 허용오차는 $\pm 30\%$ 이내이어야 한다.

9.5 표 2를 참조하여 측정 시 품질관리에 활용토록 한다.

순서	측정	측정 목적	비고
1	검정표준용액1	정확한 농도 측정을 위한 검정 곡선 작성	검정곡선 상관계수, ($R^2 \geq 0.995$)
2	검정표준용액2		
3	검정표준용액3		
4	검정표준용액4		
5	점검용 검정표준용액 (2 또는 3)	기기의 재현성 확인	허용오차 $\pm 25\%$ 이내
6	바탕시험	오염 여부 확인용	6개 이상 20개 이하의 시료마다 측정함, 정량한계 미만
7~26	시료 1 시료 2 ~ 시료 20	시료의 농도 측정	
27	중복시료	측정된 시료 중 하나의 시료를 반복 측정하여 반복성을 확인함	시료 6개 이상 20개 이하의 시료마다 수행함, 허용오차 $\pm 30\%$ 이내
28	점검용 검정표준용액 (2 또는 3)	기기의 재현성 확인	허용오차 $\pm 25\%$ 이내

10. 시험방법

10.1 시료 준비

고상의 경우 시료를 자르고 잘 섞은 후 냉동분쇄기를 이용하여 입자의 크기를 0.5 mm 이하로 분쇄하며, 액상 시료는 그대로 사용한다.

10.2 초음파 장치로 이용한 시료 추출

10.2.1 10.1에서 준비된 시료를 약 1.0 g을 전자저울을 이용하여 0.1 mg까지 정확히 잰 후 40 mL 바이알에 넣는다.

10.2.2 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25) 10 mL를 40 mL 바이알에 넣고, 60 °C의 초음파 추출기에 넣은 후 약 1시간 동안 처리하여 시료를 추출한 후 실온에서 냉각시킨다.

10.3 추출물의 정제

정제과정은 당류 및 당알코올류 분석을 간섭할 수 있는 화합물이 존재할 경우에 사용될 수 있다. 무시할 정도의 간섭 물질이 존재한다면 정제는 필수사항이 아니며 선택사항이 된다.

10.3.1 추출물을 정제하기 위해 최소 0.5 g의 실리카겔이 들어 있는 정제용 칼럼 또는 카트리지를 준비한다.

10.3.2 초음파 추출(추출용매:이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25))에 사용된 용매를 이용하여 정제용 칼럼 혹은 카트리지 내의 실리카겔을 세정한 후 건조되지 않도록

한다.

10.3.3 초음파 추출물을 정제용 칼럼 혹은 카트리지가 실리카겔 내로 서서히 스며들도록 한다.

10.3.4 정제용 칼럼 혹은 카트리지에 초음파 추출에 사용한 이동상 용액(아세트니트릴:정제수 = 75:25) 5 mL를 2회에 걸쳐 실리카 내로 스며들게 하여 당류 및 당 알코올류를 용리한다.

10.3.5 이 용액에 질소를 약하게 흘려주면서 질소농축기를 이용하여 농축한 후 최종 부피를 확인하여 정량 계산에 사용한다.

11. 기기 분석

11.1 고성능 액체크로마토그래프-RI검출기의 분석 조건

11.1.1 칼럼

아민(길이 150 mm, 안지름 4.6 mm) 또는 이와 동등한 분리 성능을 갖는 것

11.1.2 이동상

아세트니트릴:정제수 = 75:25

11.1.3 이동상 유량: 1.0 mL/min

11.1.4 칼럼 온도: 35 °C

11.1.4 검출기 온도: 35 °C

11.1.5 시료 주입량: 5 µL

12. 시험 결과의 계산

검정곡선에 의하여 시험 용액을 측정된 결과로부터 시료 중의 당류 및 당 알코올류 함유량을 다음 식에 따라 계산한다.

$$\text{시료내 개별 당류 및 당알코올류 함량}(mg/kg) = \frac{C \times V}{W} \times D.F$$

여기에서, C : 시료 용액 중의 측정된 당류 및 당알코올류 농도 (mg/L)

V : 시료 용액의 최종 부피 (mL)

W : 시료의 무게 (g)

$D.F$: 회석배율

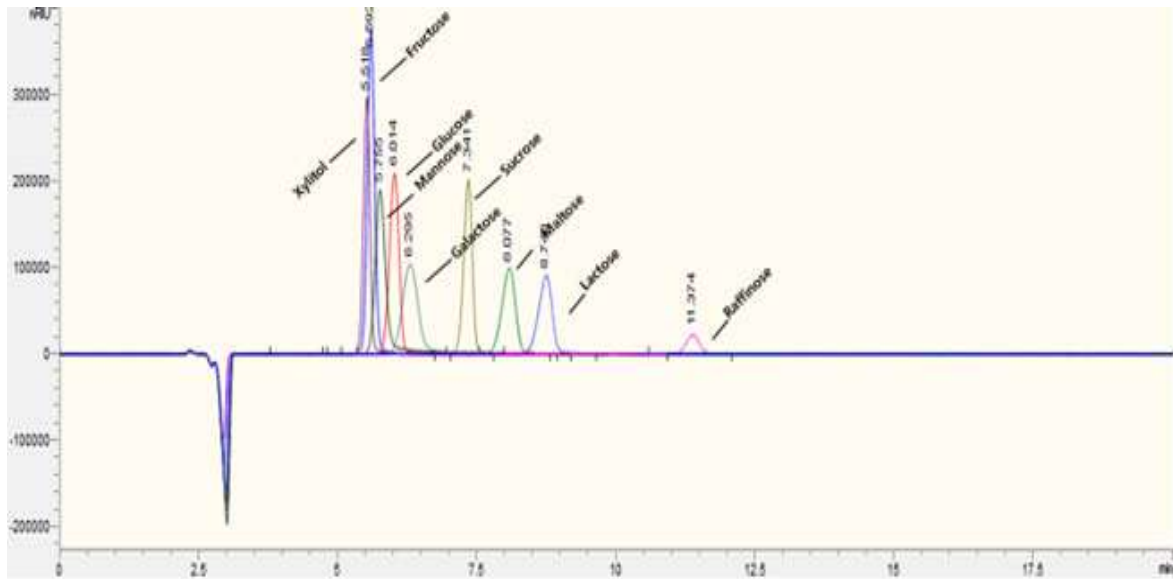


그림 1. 당류 및 당알코올류 9종 분석 크로마토그램

13. 시험 결과의 작성

13.1 시험성적서에 일반적으로 표기하여야 할 사항은 다음과 같다.

- 시료 구분
- 시험 방법
- 측정 결과
- 측정에 사용된 기기

주 의

1. 이 보고서는 한국표준과학연구원에서 시행한 주요사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국표준과학연구원에서 시행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개 하여서는 안 됩니다.