

벌꿀중 High Fructose Corn Syrup 含量에 關한 研究(第1報)

食品分析科

李 燦 秀 · 李 德 行

Studies on Contents of High Fructose Corn Syrup in Honey

Food Analysis Division

Chan Soo Lee and Deuk Heng Lee

= Abstract =

High Fructose Corn Syrup of honey was investigated by the charcoal column chromatography method.

The results were as follows.

The spots appeared 0.35 Rf value with in pure honey, but appeared less than 0.35 Rf value with specifically and weakly shape in chestnut honey.

Intermixing HFCS was discovered in over its amount 5%.

緒 論

벌꿀은 東洋古代로 부터 珍貴하게 여겨왔던 代表的인 天然食品으로 人類의 健康과 疾患의 治療劑로 사용되어 온 甘味營養食品이다. 벌꿀은 Stahl¹⁾, White²⁾, Honda 등³⁾이 報告한 바와 같이 Glucose(葡萄糖)나 Fructose(菓糖)가 主成分을 이루고 있으며 少量의 Sucrose(蔗糖), Maltose(麥芽糖) 微量의 無機物과 Vitamin 등이 含有되어 있다.

1980년대 이후 급속한 국민 경제성장과 함께 국민들의 健康食品에 대한 인식이 높아져 벌꿀의 수요는 증가되고 있으나 國土의 한정된 密源속에 벌꿀의 生産量은 늘어나지 못하여 항상 벌꿀의 眞爲시비가 계속되고 있다. 特히 不良食品 벌꿀제조에 糖類로 사용되는 異性化糖(High Fructose Corn Syrup; 이하 HFCS라 함)은 성분조성이 벌꿀과 흡사하여, 美國을 비롯하여 日本에서도 문제

가 되고 있어 벌꿀중의 HFCS에 對한 研究가 繼續되고 있다.

HFCS는 1965년 日本에서 最初로 酵素에 依해 液狀으로 製造되었으며 美國의 Clinton社가 工業化하면서 새로운 甘味料로 자리잡게 되었다.

우리나라에서는 1975년 이후부터 5個社에서 生産되고 있으며 1988년 249,471 M/T의 HFCS가 生産되어⁶⁾ 食品添加甘味料로 使用되고 있다.

異性化糖은 日本農林規格⁵⁾과 KSH 2014⁶⁾(한국공업규격) 및 液狀菓糖規格⁴⁾이 設定되어 品質管理를 하고 있으며 異性化된 糖液은 70~75%의 濃度로 精製濃縮되어 商品化되어 市販되고 있다.

벌꿀중의 HFCS 分析에서는 微量物質인 Prorine과 Na/K比¹⁰⁾ 그리고 HFCS에 存在하는 Psicosis 등¹⁰⁾의 差異로 判別하기도 하며 Doner 등⁷⁾의 isomaltose/maltose 및 White 등²⁾의 炭素同位元素 비율 C¹³/C¹²에 의한 分析方法들이 널리 利用되고 있다.

한편 活性炭 칼럼法⁹⁾은 칼럼의 제조 및 시료의 전처리 시간이 많이 소요되는 단점을 보완하려고 최근에는 HFCS에 Oligosaccharide 量이 최고 8% 정도 함유하는 特徵을 利用하여 HPLC로 분석을 시도하고 있으나 벌꿀속에 HFCS가 혼입되면 전화당의 濃度는 증가하고 Oligosaccharide의 濃度는 희석되어 分析의 再現性에 문제가 있어 HPLC에 의한 HFCS의 分析을 더욱 어렵게 하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 따라서 채택된 方法이 活性炭 칼럼에 의한 薄層크로마토그래피 方法이다. 위 方法은 市販벌꿀중에 混入되어 있는 HFCS의 分離에 效果가 우수하여 벌꿀의 밀원별 分離능과 HFCS 混入量 檢出의 限界점을 aniline-diphenylamine 용액을 분무하여 좋은 結果를 얻었기에 다음과 같이 보고한다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

標準試料 벌꿀로는 1990년에 生産된 土蜂(韓國種) 5個를 韓國養蜂協會로 부터 求得하였으며 當研究院에서 飼養하여 직접 채밀한 벌꿀 5個, 그리고 마케팅 벌꿀 5個는 當研究院 保管品이며, HFCS 標準試料는 M社의 F-42%와 F-55% 各各 2個씩 4個와 J社의 F-42%~F-55% 各各 2個씩 4個를 求得하여 24個 試料를 본 시험에 사용했다.

2. 試藥 및 器具

- Deionized water (Waters milipore U.S.A.)
- Acetone (HPLC용 Fisher Co.)
- n-Butyl alcohol (Junse, Japan)
- Acetic acid (HPLC용 Fisher Co.)
- Aniline (Hayashi Pure Chem, Japan)
- Diphenyl amine (Shiryo Pure Chem, Japan)
- Phosphoric acid (Hori Pharmaceutical, Japan)
- Ethyl alcohol (HPLC용 Fisher Co.)
- Rotary evaporator (Büchi Schweiz)
- Vacuum-pump-MDA 15 (Ulvac, Japan)
- TLC-plate-silica Gel 60 F 254 (Merck Germany)
- Activate carborn-Darco-G 60 (100 mesh) (Ardrich chemical company U.S.A.)
- Celite-545 (Shin-Yo pure Chem, Japan)
- Development tank-glass with cover 25×10×25 cm

- Microsyringe-10 μ l (Waters U.S.A.)
- Dry oven-90~95°C (Woo Chang Co.)

3. 分析方法

Kushinir 등⁸⁾의 方法과 AOAC⁹⁾ 및 食品公典⁴⁾을 準용하여 分析實驗을 行하였으며 試料의 分析過程은 Fig. 1과 같다.

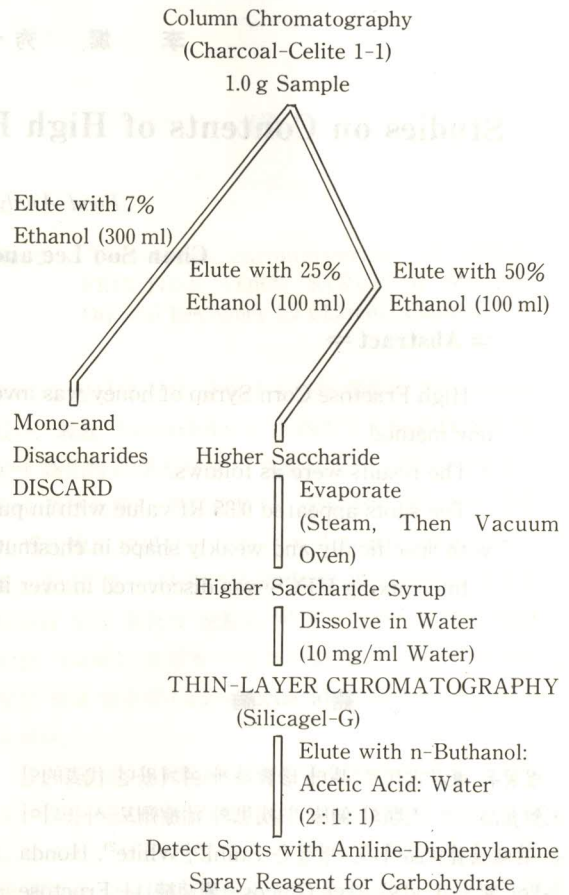


Fig. 1. Thin-layer chromatographic test for honey adulteration.

1) 活性炭 칼럼

바깥지름 22 mm, 길이 370 mm의 유리칼럼에 세라이트 No. 545 약 2g을 소량의 물에 分散시켜 넣고 세라이트를 침강시킨다. 그위에 흡착제 活性炭素 Darco-G 60, 10g과 세라이트 No. 545 10g을 충분히 혼합한 후 그중 12g을 取해 약 150 ml의 물에 分散시켜 흡인장치를 이용하여 흡착제를 침강시키고, 그 위에 세라이트 약

2g을 소량의 물에 分散시켜 칼럼에 넣은 후 물 250 ml 을 흘려보내 씻고, 세라이트 상층에 물이 약간 남을 때 까지 流出시킨다.

2) 檢液의 調劑

검체 1g을 물 10 ml에 녹인 후 흡인장치를 이용하여 칼럼에 넣고 7% 에탄올 300 ml로 씻고 다음에 25% 에탄올 100 ml로 씻어 버린 후, 항량된 수기에 50% 에탄올 100 ml 流出시킨다. 감압농축 시키거나 유출액을 비이커에 옮겨 60°C 수욕중에서 공기나 질소를 흘려 보내거나 이와 동등한 방법으로 濃縮한다. 잔류물을 1 ml의 물로 씻어 시험관(13×100 mm)에 옮기고 농축하여 0.1~0.2 ml 물에 잔류물을 녹여 시험용액으로 한다.

3) 박층크로마토그래피

시리카겔 G박층 하단에서 2 cm의 일직선상에 시험용액과 순수한 벌꿀 및 異性化糖이 혼합된 벌꿀로 시험용액과 동등한 방법으로 만들어진 용액을 동시에 찍고 이를 展開溶媒에 담그어 展開시킨다. 展開가 끝나면 건조한 후 發色液을 분부하고 溶媒를 날려 보낸 후 15 min 간 건조기에 넣고 정색시킨다. 판정으로는 순수한 벌꿀은 Rf치 0.35 이상에서 비교적 큰 斑點이 1~2개 나타나며 이성화당이나 물엿이 혼합된 벌꿀의 경우는 원점에서 부터 斑點이 나타난다.

檢體가 原點에서 Rf치 約 0.35 사이에 斑點이 나타나면 양성으로 한다.

展開溶媒는 n-부탄올 : 초산 : 물 (2 : 1 : 1) 했고 발색액은 아닐린(사용전에 아연만을 넣어 재증류한 것) 1 ml 와 디페닐아민 염산염 1g을 50 ml의 아세톤에 용해하고 인산(85%) 5 ml를 가한 다음, 0°C 이하에서 보관하거나 사용시 조제한다.

結果 및 考察

1. 異性化當의 分離

澱粉糖化製品 特有의 Oligosaccharide가 벌꿀중에 含有하는 Oligosaccharide와 組成量의 差異가 있어 Kushinir 등⁸⁾의 方法으로 活性炭 칼럼과 알콜용액을 사용하여 高分子糖을 分離하고 濃縮하여 試料를 薄層크로마토그래피로 展開한 후 Aniline-Diphenylamine 溶液에 依해 確認한 結果 순수한 벌꿀과 HFCS가 混入된 벌꿀은 Fig. 2, 3, 4와 같이 나타났다.

Fig. 2의 標準벌꿀로 사용된 韓國土種꿀은 Rf值 0.35 위에 짙은 靑色의 斑點이 타원형으로 한두개 뭉쳐져 있



Fig. 2. Thin-layer chromatogram of HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP in Standard Oriental bee honey by Charcoal Column.

으며 그 상단에 작은 갈색의 희미한 斑點이 하나 나타나 있다. 最近 우리나라에서도 天然벌꿀에서 HFCS가 벌꿀에 爲化物로 문제가 되어 保社部에서는 서둘러 食品公典에 異性化糖의 規格基準⁴⁾을 設定하여 HFCS가 벌꿀의 爲化物로 使用되는 것을 억제하고 있다. Fig. 2는 순수도중벌꿀을 나타낸 것으로 Rf值 0.35위에 누에고치 모양의 짙은 靑色의 斑點을 이루고 있다. 그리고 Rf值 0.35 아래에는 흐릿한 테일모양을 볼 수 있는데 이것이 벌꿀 원래 함유한 Oligosaccharide의 흔적이 아닌가 사료된다.

Fig. 3은 當 研究院에서 벌통을 飼養하여 직접 밀원별로 채밀한 순수 아카시아 벌꿀 A와 잡화벌꿀 B 및 밤꿀 C 등으로서 이들 벌꿀 모두가 Rf치 0.35 위에 짙은 靑色 斑點을 나타내는 規格基準에 適合品으로 나타났으며 Fig. 3에서 HFCS 混入 벌꿀은 D(F-42), E(F-55)와 같이 原點에서 부터 서명한 靑色의 斑點이 나타나 순수 벌꿀과 HFCS가 섞인 벌꿀의 구분을 그림에서 確認할 수 있었다. Fig. 4는 當院에 市販순수벌꿀 保管品을 나타낸 것으로서 Fig. 3의 것과 대등한 결과를 나타내었다.

Kanematsu 등¹⁰⁾은 상수리나무 꿀에 약 10 mg/100 g의 올리고당이 함유하고 있다고 報告한 바 있다. 또한 金 등¹¹⁾도 HPLC 분석 피크에서 밤꿀의 올리고당이 특이하게 많이 나타났다고 報告했다. 본 實驗중 Fig. 3의

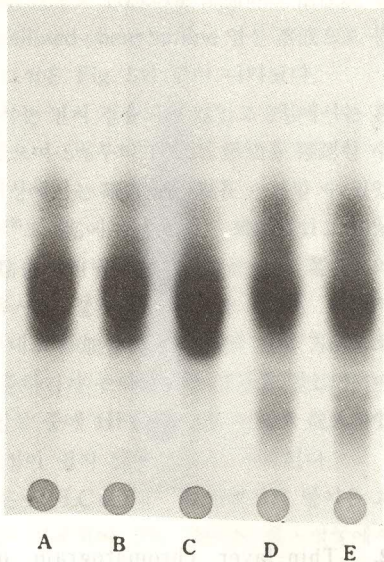


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP in Western Pure Honey by fed-bee on SIHE and Standard HFCS.
 A. Acacia Honey
 B. Wild Honey
 C. Chestnut Honey
 D. 42%-HFCS (J. co)
 E. 55%-HFCS (J. co)

밤꿀 C에서도 다른 순수벌꿀 보다 올리고당의 發色帶가 確認됨을 볼 수 있었다. 따라서 蜜源에 따라 밤꿀과 같이 올리고당이 특이적으로 나타나는 것이 있어 이에 대한 조사가 더 필요할 것으로 사료된다.

Kushnir 등⁸⁾은 벌꿀에 HFCS를 混入시켜 저장된 것 일지라도 HFCS의 올리고당 함량 검출에는 영향을 미치지 않았다고 報告하고 있다. 따라서 本 實驗에서도 벌꿀에 HFCS를 混入한 경우 HFCS 검출에는 장애가 되지 않는 것으로 나타났다. 試料의 Spot量은 2 μ l씩 TLC에 올리는 것이 分離에 가장 좋은 결과를 얻었다. 그러나 판정하기가 분명하지 않으면 시료를 6 ml씩 Spot하여 再確認하였다.

試料의 Spot量은 올리고당의 分離 및 定量에 필요한 것으로 李 등¹³⁾, Stahl 등¹⁴⁾이 벌꿀 당 분리에서 1~3 μ l의 Spot量이 좋았다고 報告했는데, HFCS 分離에서는 2 μ l Spot가 Oligosaccharide 分離에 最 적 조건임을 알 수 있게 되었다.



Fig. 4. Thin-layer chromatogram of HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP in Pure marketing Honey and Standard HFCS.
 A. Acacia Honey
 B. 42%-HFCS (M. co)
 C. 55%-HFCS (M. co)
 D. Rape Honey
 E. Wild Honey

2. 벌꿀중 HFCS 검출한계

活性炭 칼럼에서 벌꿀중의 HFCS를 검출할 수 있는 限界量을 찾아 보기 위하여 市販 HFCS 제품에 따라 올리고당 함량의 차이는 있지만 標準試料로 求得한 HFCS (F-42)를 標準벌꿀로 使用한 土種꿀에 1%, 3%, 5%,

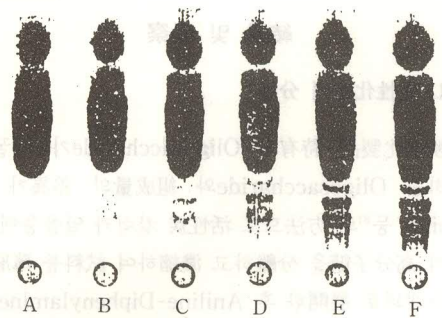


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of the mixed honey HFCS (F-42) and orient honey.
 A. 1%-HFCS B. 3%-HFCS C. 5%-HFCS
 D. 10%-HFCS E. 25%-HFCS F. 50%-HFCS

10%, 25%, 50% 比率로 HFCS를 添加하여 活性炭 칼럼에 통과하여 anilined-phenylamine 염산 溶液으로 분무하여 發色된 그림은 Fig. 5와 같이 나타났다.

HFCS 1%에서는 전혀 검출되지 않았고 3%에서는 흔적정도로 나타났으며 5%부터 HFCS 添加를 確認할 수 있었다. 10% 이상에서는 確實한 班點을 判定할 수 있는데 Claude 등¹²⁾도 5%에서는 흔적이 確認되었고 10%부터 確實한 班點을 나타냈다고 報告했는데 本 著者들의 結果도 이와 유사한 結果를 보여주고 있다. 따라서 HFCS를 5% 이내로 添加할 경우 活性炭 칼럼 方法으로는 HFCS를 검출하기가 곤란하다는 結果를 얻었다. 따라서 市販爲化벌꿀 중에 HFCS를 5% 이내로 混入하였을 때는 검출판정이 쉽지 않을 것으로 사료된다.

한편 金 등¹³⁾은 HPLC로 Ca^{++} 을 치환시킨 양이온 교환 수지 칼럼을 사용하여 3% HFCS 混入벌꿀에서 HFCS를 검출해낼 수 있다고 報告하고 있으나, 아직도 HFCS의 올리고당 混入 비율을 찾아내는데는 그 實現성에 難題가 많은 것으로 사료된다.

그러므로 앞으로는 벌꿀중 爲化벌꿀의 HFCS 混入량을 定量하는데 더욱 많은 研究를 해야 할 것으로 思料된다.

結 論

活性炭 칼럼법에 의한 벌꿀중의 HFCS 실험결과 밀원 벌로 순수벌꿀에서는 Rf 0.35 위에 班點이 나타났으며, 예외적으로 밤꿀에서는 Rf치 0.35 아래에서 미미한 班點이 特變의으로 나타남을 確認했으며 HFCS 混入量檢출은 HFCS 5% 添加부터 判定確認이 가능하였다.

參 考 文 獻

1. Egon Stahl: Thin-layer chromatography (2nd

George Allen & Unwin Ltd London New York, p. 811 (1973).

2. Jonathan W. White: Sugar and sugar product. J. Assoc. off Anal. Chem. 62:3 (1973).

3. S. Honda: A Sensitive fluorimetric detection of carbohydrates with ethylene diamine sulfate. Analytica Chemica Acta 64:30 (1973).

4. 保健社會部: 食品公典 (1991).

5. 農林水産省: 異性化糖液 日本農林規格 農林規格協會, (1988).

6. 申東彬: 國內물엿工業의 現況. 食品 KS 情報(5), (1989).

7. L. Doner and W. White: Gas-liquid chromatographic test for test for honey adulteration by high fructose corn syrup. J. Associ Anal. Chem. 62:1 (1979).

8. Kushinir: J. Associ off Anal Chem. 62 (1979).

9. AOAC: Edited by kenneth health fifteenth Edition. p. 1028 Virginia U.S.A. (1990).

10. 벌꿀의 실상: (補) 異性糖混入 ハチミツの 檢出試驗法(薄層クロマトウフ). 日本, p. 53 (1980).

11. 金在吉: HPLC와 TLC를 利用한 벌꿀중의 異性化糖 檢출. Korean J. Apiculture. 6(1):48 (1991).

12. Claude A. Lucchesi: The Analytical Approach 224A. Analytical Chem. 51(2):224 (1979).

13. 李燦秀, 吳秀暻: 薄層크로마토그래프에 의한 糖分析. SIHE, 18:46 (1982).

14. Egon Stahl and Ulrich Kaltenbach: Dünnschicht-chromatographie. J. Chromato. 5:351 (1961).