J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 2, pp. 118~121 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

HPLC-MS/MS를 이용한 어린이 기호식품중의 감미료 분석

김일영* · 두옥주 · 이성득 · 박영혜 · 김미선 · 배청호 · 채영주
서울특별시보건환경연구원 식품분석팀

Determination of Six Sweeteners in Children's Favorite Foods by HPLC-MS/MS

Il-Young Kim*, Ok-Ju Du, Sung-Dck Lee, Young-He Park, Mi-Sun Kim, Chung-ho Bea, and Young-Zoo Chae
Food Analysis Team, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment
(Received February 1, 2010/Revised March 8, 2010/Accepted April 21, 2010)

ABSTRACT – A HPLC-MS/MS method was developed for simultaneous determination of six sweeteners (ace-sulfame-K, cyclamate, saccharin, sucralose, stevioside, aspartame) in children's favorite foods. The procedure involves an extraction of the six sweeteners with 50% methanol solution, sample clean-up using the Carrez clearing reagent and filtering with cartridge filter. The HPLC separation was performed on a Hypersil Gold (150 mm × 2.1 mm 5 um) column using the water/acetonitrile mobile phase (95:5). Mass spectrometric analysis was carried out using the TSQ Quantum Ultra operated in negative and positive ESI/SRM. With this method, good linear relationship, sensitivity and reproducibility were obtained. The spike recoveries of six sweeteners for 2 kinds of foods spiked into 0.4 mg/kg ranged from 87.4 to 114.7%. The detection limits were above 0.02 mg/kg. The method has been applied to determination of six sweeteners in children's favorite foods.

Key words: sweeteners, ESI, children's favorite foods

감미료는 대부분이 설탕에 비하여 단맛이 강하고 값이 싸며, 칼로리원이 되지 않고, 갈변하지 않으며, 보관 및 취급이 간단한 것 등 여러 가지 특징이 있기 때문에 식품의 제조, 가공 또는 조리에 많이 사용되고 있다[1]. 감미료의 사용 유래 살펴보면 1879년 미국에서 설탕의 300배 이상의 단맛을 가진 삭카린나트륨을 생산된 이래 1958년 미국에서 감미도 30인 싸이클라메이트, 1971년 일본에서 상업화된 감미도 300인 스테비오사이트, 1988년 감미도 180-200배인 아스파탐 등이 사용되었으나 식품안전성에 대한 소비자의 인식이 증가하여 인체에 미칠 수 있는 잠재적인 위험을 방지하기 위해서 식품 중 감미료 사용에 대한 규제가 필요하다. 이러한 첨가물의 사용은 필요에 의하여 상용하는 것이므로 그 종류와 사용량을 준수하여 안전한 가공 식품을 소비자에게 제공하여야하며 인체에 유해한 감미료 사용여부에 대한 감시가 필요하다. 현재 우리나라에서 식품첨가물로 허용된 감미료는 삭카린나트륨, 아스파탐, 아세설팜칼륨 및 수크랄로스 등이 있으며, 현행 식품 첨가물공전에서는 사용대상 식품과 그 사용량을 엄격히 규제하고 있다[2].

현재 감미료의 분석은 고속액체크로마토그래피[3,4], 이온크로마토그래피[5] 등을 이용한 분석에 관한 연구가 이루지고 있으나 식품 전반에 다양하게 사용되고 있는 허용 감미료 및 유해 감미료를 신속 정밀하게 분석할 수 있는 전처리 및 다성분 동시분석법 개발이 절실히 필요하며, 이를 위해 식품 자체 메트릭스로의 간섭이 적고 분석활용도가 높은 HPLC/MS/MS를 이용한 6종의 감미료 동시분석법을 확립하고자 한다.

*Correspondence to: Il-Young Kim, Food Analysis Team, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, 18, Yongmerri-2gil, Gwacheon-City, Gyeonggi-do 427-070, Korea
Tel: +82-2-570-3230, E-mail: indekiy@seoul.go.kr

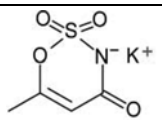
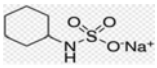
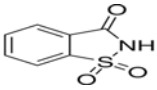
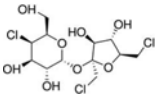
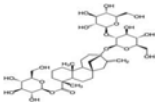
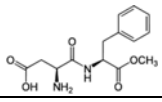
재료 및 방법

시약 및 기구

표준품으로 Wako사의 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이드, 및 아스파탐를 사용하였고 그 구조와 상대감미도는 Table 1과 같으며, 추출 및 HPLC/MS/MS분석을 위해 potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (Wako), zinc sulfate heptahydrate (Wako), acetonitrile, methanol (HPLC용, J.T.Baker)을 사용하였다.

전처리를 위해 분쇄기(한국), 초음파 장치(BRANSON 8200, USA) 및 교반기 (Maxi Mix II, USA)를 사용하였다.

Table 1. Formular, Molecular weight and Chemical Structure of 6 Sweeteners

Sweetener	Formular	Chemical Structure	Relative sweetness
Acesulfame K	C4-H4-KNO4-S		200
Cyclamate	C6-H13-NO3S		30
Saccharin	C7-H5-NO3-S		300
Sucralose	C12-H19-Cl3-O8		600
Stevioside	C38-H60-O18		300
Aspartame	C14-H18-N2-O5		180

표준용액조제 및 표준검량선 작성

감미료 표준품은 methanol용액으로 각각 표준원액(100 mg/kg)을 제조한 후, 그 농도를 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/L로 희석하여 LC/MS/MS로 분석하여 표준 검량선을 작성하였다.

시료전처리

분쇄기로 파쇄한 시료 10 g, 50% methanol 25 mL과 Carrez clearing reagent I, II 2 ml을 추출용기 50 ml에 넣고 교반기로 교반후 초음파(100 Speed, 20분)로 추출한다[6]. 추출 후 0.20 μm cartridge filter로 여과하여 LC/MS/MS분석하였다.

회수율 검토 및 검출한계

혼합 감미료 표준액(0.4 mg/kg)을 재료에 첨가한 후 과자, 캔디를 만들어, 시료 전처리와 동일한 방법으로 처리하여 회수율을 구하였으며, 검출한계를 위해 표준액을 단계적으로 희석하여 외부표준법에 의한 검량선에 적용하여 3회 반복 실험하였다.

분석기기

감미료를 분석하기 위해 Accela^{tm} LC system이 부착된 TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific)를 사용하였고, HPLC 조건은 Hypersil GOLD (150 mm × 2.1 mm 5 um) 컬럼을 사용하였으며 이동상으로는 water와 acetonitrile (95:5)를 이용하여 0분에서 2분까지 용리한 후, 2분에서 10분까지 linear gradient로 acetonitrile이 80%가 되도록 하여 1분간 유지한 다음 20분까지 acetonitrile 5%로 유지하면서 0.3 ml/min의 유속으로 분석하였고 시료는 10 ul 주입하였다. 검출을 위한 MS/MS 분석조건은 ESI (electrospary ionization)이온화 방식을 선택하였다. positive & negative mode에서 SRM (selected reaction monitoring) 방식을 사용하여 nebulizing gas로 질소가스, collision gas 로 아르곤 가스를 사용하였고 기타 MS/MS 파라미터는 spray voltage 3800 V, sheath gas pressure 20 psi, auxiliary gas pressure 25 psi, ion transfer capillary temperature 350°C로 설정하여 최적화하였다.

결과 및 고찰

기기분석

인공감미료 표준물질을 대상으로 LC 컬럼을 통과시키지 않고 직접 질량분석기로 주입한 후 ESI모드에서 양이온(+)모드와 음이온(-)모드를 사용하여 각성분의 모드를 살펴 본 결과 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이드의 경우에는 음이온 모드에서 아스파탐은 양이온 모드에서 좋은 감도를 보였고, 분석의 선택성과 검출강도를 높이기 위해 MS/MS 분석 시 SRM (selected reaction monitoring)모드로 각 성분별로 감응도가 큰 collision energy를 선정하여, 각각의 성분에 대한 최적의 분석 조건을 얻은 결과 Table 2에서와 같이 각 감미료의 최적 collision energy는 아세설팜칼륨(16, 34 V), 싸이클라메이트(31, 24 V), 삭카린나트륨(20, 29 V), 수크랄로스(12 V), 스테비오사이드(35, 25 V), 아스파탐(25, 11 V)로 이때 각각의 parent ion, quantization ion, confirm ion은 아세설팜칼륨(162, 82, 78 m/z), 싸이클라메이트(178, 80, 96 m/z), 삭카린나트륨(182, 106, 42 m/z), 수크랄로스 (395, -, 359 m/z), 스테비오사이드(803, 479, 641 m/z), 아스파탐(295, 119,

Table 2. SRM (Selective Reaction Monitoring) transition of 6 sweeteners

Compounds	Parent ion (m/z)	Quantization ion (m/z)	Confirm ion (m/z)	CE (v)	Pol
Acesulfame K	162	82	78	16,34	Neg
Cyclamate	178	80	96	31,24	Neg
Saccharin	182	106	42	20,29	Neg
Sucralose	395	359	-	12	Neg
Stevioside	803	479	641	35,25	Neg
Aspartame	295	119	235	25,11	Pos

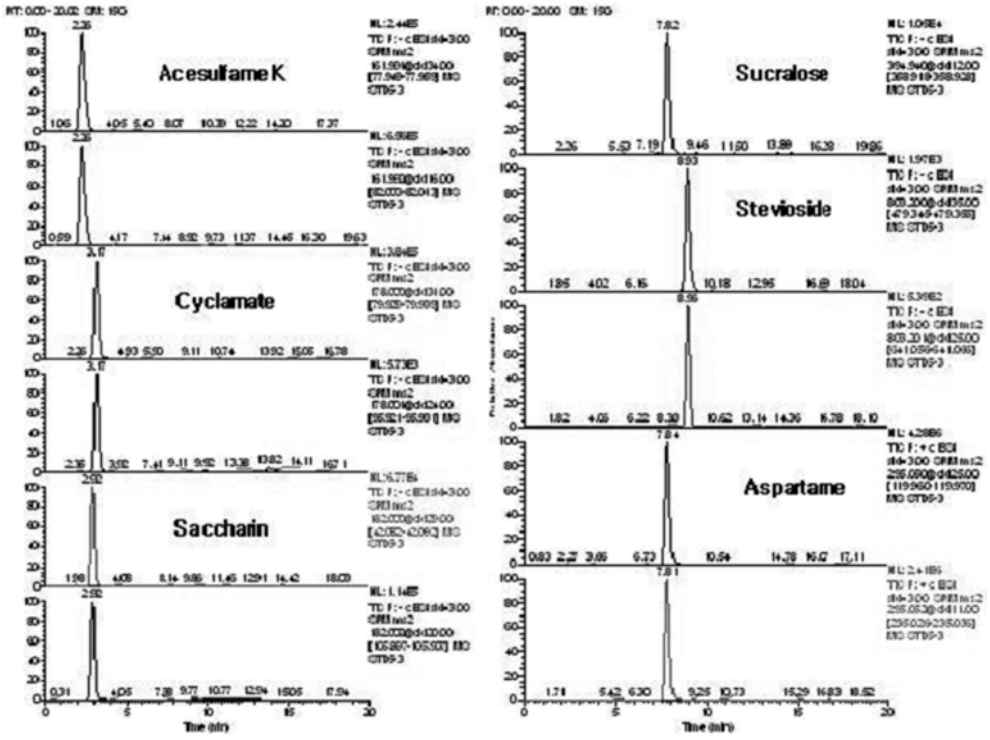


Fig. 1. SRM (Selective Reaction Monitoring) chromatogram of 6 Sweeteners.

235 m/z)이었다.

Fig. 1은 감미료의 SRM 크로마토그램을 나타낸 것으로, 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이드, 및 아스파탐의 고유한 confirm ion과 quantization ion으로 확인 및 정량하였고 머므름 시간은 2.26~8.96로 10분 이내로 분석이 가능하였다. 김[3,4] 등이 HPLC를 이용한 감미료 분석 시 두 개의 검출기 사용하여 동시 분석이 어려웠으나 본 실험의 경우 동시 분석이 가능하였다. Ni[7], Matsumoto[8] 등이 소주와 식품에서 스테비오사이드, 아스파탐을 LC/MS/MS로 분석 한 스펙트럼과 일치하였고 정성에 그치지 않고 정량함으로서 기존 분석방법과 차별화되는 결과를 얻었다.

검량선 작성 및 회수율 검토

6종의 감미료 표준액을 0.01~1.0 mg/kg의 농도로 조제한 후 분석 검량선을 작성한 결과 각각 감미료의 상관계수(R^2)은 0.9986~0.9999로 양호한 직선상의 그래프를 얻을 수 있었다. 각각의 감미료를 단계적으로 희석하여 분석한 결과 검출한계는 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이드, 및 아스파탐의 경우 0.02 mg/kg이었다. 이는 낮은 농도의 감미료 분석이 가능함을 나타내고 있다.

시료에 대한 감미료의 분석법의 회수율은 과자 및 캔디 10 g에 혼합표준용액(각각 농도 0.4 mg/L)을 첨가한 후 회수율 시험을 3회 반복한 결과는 Table 3에서보는 바와 같이 과자의 회수율은 87.40~106.93% 이고 캔디는 99.84~114.7%로 전반적으로 좋은 회수율을 보였다. 김 등[4]의 식품에서 아세설팜칼륨, 삭카린나트륨, 수크랄로스를 HPLC로 분석한 회수율 92.5%~97.3%의 결과와 유사하였다.

어린이 기호식품 감미료 분석

서울 시내에서 유통 중인 어린이 기호식품 25건(과자류 15건, 캔디류 10)에서 6종류의 감미료를 측정 결과는 과자

Table 3. Recoveries and LOD of 6 sweeteners

Compounds	R^2	Recoveries(%)		Limit of Detection (mg/kg)
Acesulfame K	0.9998	Candy	106.70 ± 4.72	0.02
		Cookie	101.52 ± 3.45	
Cyclamate	0.9999	Candy	103.15 ± 5.19	0.02
		Cookie	97.87 ± 5.76	
Saccharin	0.9999	Candy	103.56 ± 4.66	0.02
		Cookie	98.92 ± 5.90	
Sucralose	0.9997	Candy	114.73 ± 3.68	0.02
		Cookie	106.93 ± 4.96	
Stevioside	0.9986	Candy	95.14 ± 2.78	0.02
		Cookie	87.40 ± 2.39	
Aspartame	0.9991	Candy	99.84 ± 5.57	0.02
		Cookie	94.78 ± 4.91	

Table 4. 6 sweetener in children's favorite foods

Item	Sample No.	Compounds	No of detected sample	Range (mg/kg)	Standard
Cookies	15	Acesulfame K	-	N. D.	Not more than 2.5 mg/kg
		Cyclamate	-	N. D.	Ban
		Saccharin	-	N. D.	Ban
		Sucralose	-	N. D.	Not more than 1.8 g/kg
		Stevioside	3	2.52~10.21	Unlimited use
		Aspartame	2	0.162, 0.547	Not more than 0.5%
Candies	10	Acesulfame K	-	N. D.	Not more than 1.0 mg/kg
		Cyclamate	-	N. D.	Ban
		Saccharin	-	N. D.	Ban
		Sucralose	-	N. D.	Not more than 0.58 g/kg
		Stevioside	-	N. D.	Ban
		Aspartame	2	10.74, 15.26	Unlimited use

(N. D. : Not detected)

류에서 스테비오사이드 3건, 아스파탐 2건이 검출되었으며 그 농도는 각각 2.52~10.21 mg/kg, 0.162, 0.547 mg/kg이었다. 캔디의 경우 아스파탐 2건에서 10.74, 15.26 mg/kg이 검출되었다. 검출 감미료는 사용 가능한 감미료였으며, 사용 금지된 감미료는 검출되지 않았다.

요 약

아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이드, 아스파탐을 HPLC/MS/MS를 이용하여 동시 분석한 결과 각 감미료 별로 고유한 스팩트럼을 얻어 정량하여 머므름 시간은 2.26~8.96로 10분 이내로 분석이 가능하였다. 각각 감미료의 상관계수(R^2)은 0.9986~0.9999로 양호한 직선상의 그래프를 얻을 수 있었고 각각의 감미료를 단계적으로 희석하여 분석한 결과 검출한계는 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이트, 및 아스파탐의 경우 0.02 mg/kg이었다. 시료에 대한 6종의 감미료에 대한 분석법의 회수율은 과자 87.4~106.9%, 캔디 99.8~114.7%로 전반적으로 좋은 회수율을 보여 어린이기호식품에서의 감미료 분석에 적용하였다.

참고문헌

1. 문범수 : 식품첨가물, 수학사, (2002).
2. 식품의약품안전청 : 식품첨가물공전, (2008).
3. 김명길, 윤미혜, 전일형, 김양희, 정진아 : 식품 중 합성첨가물 사용실태 조사연구, 한국식품위생학회지 **14**(3), 244-248 (1999).
4. 김희연, 윤혜정, 홍기형, 이창희, 박성관, 최장덕, 최우정, 박선영, 김지혜, 이철원 : 식품중 인공감미료의 분석법에 관한 연구, 한국식품과학회지 36(1), 14-18 (2004).
5. Yan zhu, Yingying Guo, Mingli Ye and Frit S. James : Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography, Journal of Chromatography A, **1085**, 143-146 (2005).
6. 식품의약품안전청 : 식품 중 식품첨가물분석법, (2007).
7. Fan Ni, Jeffrey Ammann and Abudul Mabud : Moniering stevioside in Soju by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry, Journal of AOAC International, **90**(5), 1365-1372 (2007).
8. Hiroko Matsumoto, KeikoHirata, Narue Sakamaki, Kayo Hagino and Hirofumi Ushiyama : Simultaneous determination of neotame, alitame and aspartame in foods in HPLC, Journal of the food hyginenic society of japan, **49**(1), 31-36 (2008).