

HPLC를 이용한 감초 추출물의 당 분석법 연구

권영주* · 장기철 · 나효환 · 김용하 · 이문수
KT&G 중앙연구원
(2005년 5월 31일 접수)

The Study of Sugar Analysis in Licorice Extract by HPLC

Young-Ju Kwon*, Gi-Chul Jang, Hyo-Hwan Rah, Yong-Ha Kim and Moon-Su Rhee
KT&G Central Research Institute
(Received May 31, 2005)

ABSTRACT : The study was carried out to develop quantitative analysis method of individual sugars in licorice extract. Individual sugars were analyzed by HPLC equipped with Refractive Index(RI) Detector. R values of sucrose and glucose were 1.0000 and R values of fructose and maltose were 0.9999. Standard calibration curve showed good linearity. Detection limit of sugars was in the range of 1.58 to 3.92 μg . Recovery rate of fructose, glucose, sucrose and maltose was 99.4~102.0%, 92.3~97.9%, 99.4~102.0%, 91.1~101.0% respectively. Measure uncertainty was calculated to confirm trust and accuracy of analytical results. Main uncertainty factors were standard purity and HPLC replication injection. In 95% trust level expanded uncertainty of sugars in licorice extract were fructose 1.98 ± 0.047 , glucose 1.32 ± 0.065 , sucrose 11.69 ± 1.177 , maltose 1.06 ± 0.042 g/100 g.

Key words : licorice extract., individual sugars, HPLC analysis, uncertainty

감초 추출물은 콩과에 속하는 *glycyrrhiza glabra* 식물의 뿌리 및 근경의 추출물로 강한 단맛과 spicy한 향 특성, 약리성분 등을 지니고 있어 식품, 음료, 의약품, 담배향료 및 건강식품 등에 다양하게 응용되고 있다. 특히 담배 산업에서 감초 추출물은 향료 및 감미료, 보습제의 대체 재료로서 깃연시 연기의 자극 완화, 불쾌취의 masking 및 조화감 부여 및 담배의 수분을 보유하여 담배의 저장수명 및 안전성을 증진시키는 역할 등을 한다(김 등, 1977).

감초 추출물은 추출물을 분말화한 분무건조 분말, 고형화한 block, 일정 농도로 농축한 extract 형태로 이용되고 있다. 감초의 품질과 가격에 중요한 영향을 미치는 주성분으로는 glycyrrhizin, cane sugar, reducing sugar, starch, gums, inorganic salts 등이 있다(Vora, 1984).

감초 추출물 중 당 성분은 추출물 형태에 따라 다소 차이는 있으나 함량이 14-21% 정도로서 주요 개별 당은 sucrose, fructose, glucose이며 maltose도 소량 함유되어 있다. 감초 중의 당 성

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

분은 saccharose의 50배의 단맛을 가지는 glycyrrhizin과 함께 단맛을 증진시키는 시너지 효과를 내는 것으로 알려져 있다(Gury, 1992).

HPLC에 의한 개별당 분석 연구로는 Hec-kman(1985)이 담배 중에 sucrose, glucose, fructose 등의 분석을 시도하였고, Risner 등(1986)은 담배 가향액 중의 glucose, fructose, sucrose, maltose 분석법을 보고한 바 있다. 감초 추출물 중의 개별 당 분석은 Vola(1984)가 fructose, glucose, sucrose 분석 결과를 보고하였으나 시료 전처리 및 HPLC 분석에 대한 구체적인 분석법은 언급되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 담배의 품질에 중요한 영향을 미치는 감초 추출물의 개별당의 HPLC 분석법을 확립코자 하였다. 또한 확립된 감초의 당 분석법에 대한 신뢰성 확보를 위하여 당 함량 분석과정에서 발생하는 불확도(Uncertainty)를 산출코자하였다. ISO Guide인 "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (측정 불확도 표현 지침서, GUM)"에 따르면 불확도란 "충분히 타당성 있는 이유에 의해 측정값에 영향을 미치는 값의 분포를 특성화한 패러미터"로 정의하고 있으며, 측정결과의 신뢰성의 척도로서 국제적으로 이 지침에 따라 측정값과 함께 측정결과의 불확도를 표기하도록 하고 있다(ISO,1993; NIST). 따라서 본 연구에서는 감초의 개별 당 분석법 확립과 아울러 분석값에 영향을 미치는 측정 불확도를 산출하므로써 데이터의 신뢰성을 확보코자 하였다.

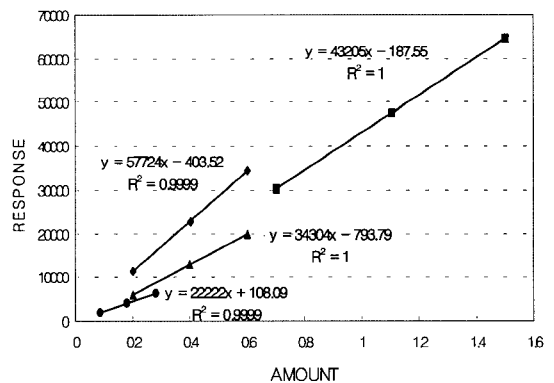
재료 및 방법

본 시험에 사용한 시료는 감초 근경을 85°C에서 물 추출하여 여과, 농축한 후 Brix 70°로 조정하여 실험 재료로 이용하였다. 시료 전처리에는 10 g의 시료에 증류수 100 ml를 넣어 잘 용해시키고 C₁₈ SPE cartridge를 통과시켜 비극성 성분을 제거한 후 0.45 µm 필터로 여과하여 HPLC 주입시료로 사용하였다. 회수율 분석 시험은 감초 추출물에 함유된 개별 당 함량을 기준으로 50%, 100%, 200% 농도로 첨가하여 3반복 분석

시험을 행하였으며, 당 함량 분석과정에서 발생될 수 있는 불확도 측정은 GUM에 따른 불확도 산출법에 준하여 계산하였다(황 등, 2003). 즉, 감초추출물 중의 당 분석 과정에서 발생할 수 있는 불확도 요인을 모두 포함하는 전체 관계식을 설정하고 불확도 요인을 A형과 B형 불확도로 분류하여 표준 불확도(standard uncertainty)를 계산하고, 계산된 각 표준 불확도를 합성하여 최종 확장 불확도(expanded uncertainty)를 산출하였다. 분석조건은 High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)는 Waters system with Empower를 이용하였고, 컬럼은 YMC-Pack polyamine(250 mm x 4.6 mm, 5 µm)을 사용하였으며, 이동상은 Acetonitrile : H₂O = 73:27(v/v%), 유속은 12분까지 1.0 mL/min, 12분에서 20분까지는 1.3 mL/min, 20분에서 35분까지는 1.0 mL/min, 검출기는 Refractive Index(RI)를 사용하여 표준용액으로 검량곡선을 작성하여 시험액 중의 개별 당 함량을 정량하였다.

결과 및 고찰

감초 추출물의 당 분석법 정립을 위해 감초 추출물의 주요 개별 당의 표준 용액의 검량선을 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 각 개별 (Vora, 1984).당별로 검량선 분석 결과를 보면



■ sucrose, ◆ fructose, ▲ glucose, ● maltose
Fig. 1. Calibration curves of sugar standards.

Table 1. Detection limits of sugars

Sugars	Detection Limit(μg)
Sucrose	2.07
Fructose	1.58
Glucose	2.80
Maltose	3.92

sucrose, glucose 검량선의 R값이 1.0000, fructose, maltose 검량선의 R값이 0.9999로서 매우 우수한 직선성을 나타내었다. 또한 각 개별당의 검출한계(detection limit)는 S/N비의 3배로 계산한 값으로 Table 1에서 보는 바와 같이 fructose 1.58 μg , sucrose 2.07 μg , glucose 2.80 μg , maltose 3.92 μg 으로 나타났다. 감초 추출물 분석 정량값의 정확성을 검증하기 위하여 감초 추출물 시료에 fructose, glucose, sucrose, maltose를 시료에 함유되어 있는 개별당 수준의 50%, 100%, 200% 농도별로 첨가하여 3반복 시험을 행하여 각 개별당별로 회수율을 분석하였다 (Table 2). 각 개별당의 농도별 회수율 분석 결과는 fructose 97.4~97.7%, glucose 92.3~97.9%, sucrose 99.4~102.0%, maltose 91.1~101.0%로 나타났다. 다른 개별 당에 비해 함량이 높은 sucrose가 가장 높은 회수율을 나타내었고, 함량이 가장 낮은 maltose가 상대적으로 회수율 편차가 높게 나타났는데 이러한 결과는 maltose의 retention time이 늦어서 피크 확장이 일어나고,

Table 2. Recovery rates of individual sugars (%)

Sugars	Level 1	Level 2	Level 3
Fructose	97.4±1.90	97.7±1.39	97.6±0.76
Glucose	92.3±2.23	94.7±1.88	97.9±2.30
Sucrose	99.4±1.15	100.1±1.76	102.0±2.17
Maltose	101.1±2.04	94.9±1.71	91.1±1.58

다른 당에 비해 상대적으로 함량이 낮아 정량값에 편차 요인이 크게 영향이 있는 것으로 추측된다.

감초 추출물 시료의 개별 당 분석 결과는 Table 3에서와 같이 각 개별 당의 함량은 sucrose 11.69%, fructose 1.98%, glucose 1.32%, maltose 1.06%로 나타났다. Vola (1984)는 HPLC를 이용하여 감초 추출물 중의 당을 분석한 결과 fructose 3.0~9.5%, glucose 1.2~12.4%, sucrose 3.7~7.4%, 그리고 소량의 maltose가 함유되어 있음을 보고한 바 있는데, 이 같은 결과로 미루어 볼 때 감초 추출물은 추출 형태 및 산지에 따라 당 함량 및 조성의 차이가 많이 있음을 알 수 있었다. 감초 추출물의 당 성분 중 sucrose-reducing sugar의 비율은 감초의 품질에 주요한 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(Vora 1984).

Table 3. The results of individual sugars in licorice extract

Sugars	Results(%)
Sucrose	11.69
Fructose	1.98
Glucose	1.32
Maltose	1.06

분석결과와 정확성 및 신뢰성 향상을 위하여 감초 추출물 중의 당 함량 분석과정에서 발생할 수 있는 불확도를 측정하였다. 불확도는 ISO Guide 에 따른 불확도 산출법에 준하여 불확도 값을 산출하였다(황 등, 2003). 감초의 개별 당 함량에 영향을 미치는 불확도 요인으로는 시료용액 조제, 표준용액 조제, 표준물질 순도, 표준용액 검량선 및 HPLC 반복성 등에 기인한 불확도 요인을 들 수 있는데 이들 불확도 인자들 중에서 표준 물질 순도, 표준용액 검량선 및 HPLC 반복성이 불확도에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났으며, 시료 추출이나 표준용액 조제 시 저울의 반복 사용 및 플라스크의 온도에 따른 부피 팽창

HPLC를 이용한 감초 추출물의 당 분석법 연구

Table 4. Main uncertainty factors of sugar analysis in licorice extract

Description		Value	STD Uncertainty	Relative STD Uncertainty
Sample ext.	Sample Wt.	10	0.0001225	0.00001225
	Flask vol.	100	0.055	0.00055
STD Soln. Preparation	STD Wt. 1	0.2016	0.0001225	0.000608
	STD Wt. 2	0.4037	0.000125	0.000303
	STD Wt. 3	0.6025	0.0801	0.000203
	Flask vol.	100	0.005774	0.000801
STD Purity		0.99	0.0019	0.00583
Calibration Curve		0.1981	0.0039	0.0094
HPLC Replication Injection(RSD)		1		0.0039

계수들은 불확도 요인에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(Table 4). 일반적으로 화학 분석 과정에서 최종 불확도 측정값에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 시료의 전처리 과정인데 감초의 당 분석법은 전처리 과정이 비교적 단순하여 불확도 값에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한 HPLC 크로마토그램 상에 나타난 피크를 기준으로 당 함량을 정량할 때 피크 면적 보다는 피크 높이를 이용하여 정량하는 것이 본

연구에서는 불확도 값을 다소 줄일 수 있는 것으로 나타났다(Table 5). 감초 추출물중의 fructose, glucose, sucrose, 및 maltose 함량분석에서 얻어진 확장 불확도 값은 95% 신뢰 수준에서 각각 1.98 ± 0.047 , 1.32 ± 0.065 , 11.69 ± 0.177 및 1.06 ± 0.042 g/100g 수준으로 각 개별 당 분석 결과의 relative standard deviation(RSD, %)는 5% 이내로 나타났다(Table 5).

Table 5. Measure uncertainty of sugars in licorice extract

구 분	Fructose		Glucose		Sucrose		Maltose	
	Area	Height	Area	Height	Area	Height	Area	Height
Combined standard uncertainty	0.01263	0.01179	0.03328	0.02487	0.00789	0.00759	0.02800	0.01999
Coverage factor(95%)	2	2	2	2	2	2	2	2
Result of a measurement (g/100g)	2.10	1.98	1.33	1.32	11.24	11.69	1.08	1.06
Expanded uncertainty (g/100g)	0.053	0.047	0.088	0.065	0.177	0.177	0.061	0.042
RSD(%)	2.53	2.36	6.66	4.97	1.58	1.52	5.60	4.00

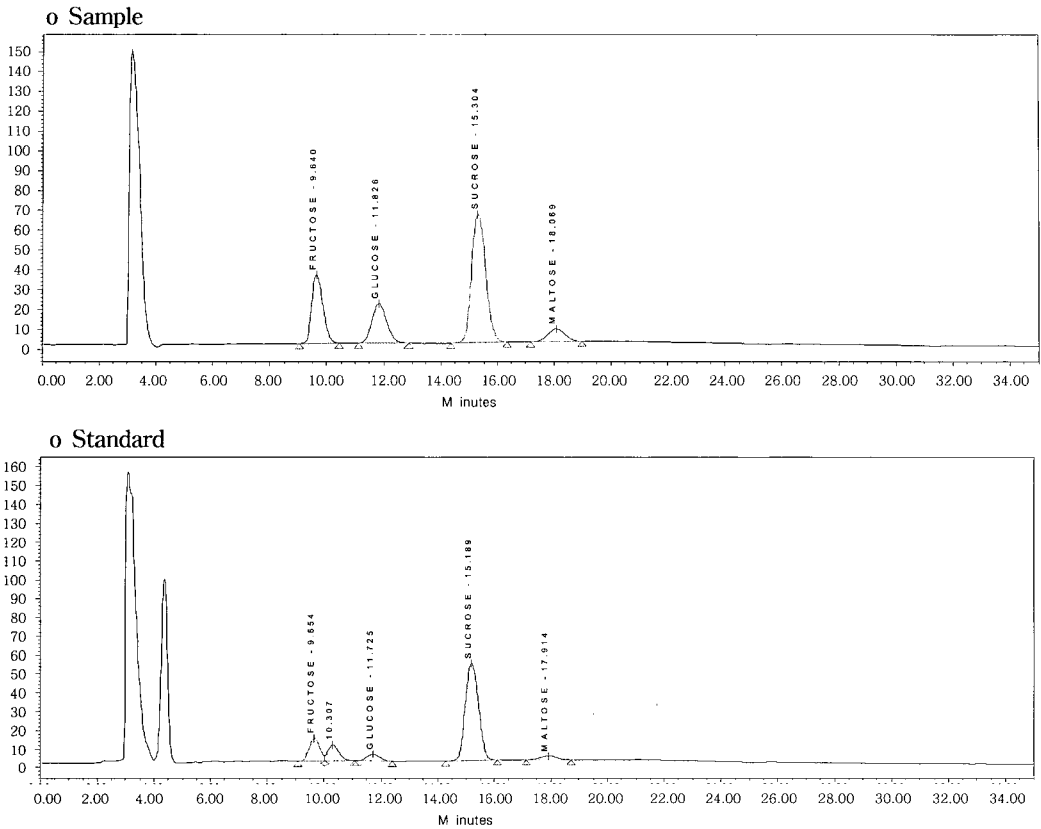


Fig. 2. Chromatograms of standard and licorice extract sample.

결 론

HPLC를 이용한 감초 추출물의 개별 당 분석법 연구결과 표준물질의 검량선 R값은 sucrose, glucose가 1.0000, fructose, maltose가 0.9999로서 매우 우수한 직선성을 보였으며, 검출한계는 1.58~3.92 ug 수준으로 나타났다. 또한 회수율은 첨가 수준에 따라 91.9~102.0%로 양호하게 나타났다. 또한 당 함량 분석 시 실험결과에 영향을 미칠 수 있는 불확도 요인을 산출하여 얻어진 fructose, glucose, sucrose, 및 maltose의 확장 불확도 값은 각각 1.98 ± 0.047 , 1.32 ± 0.065 , 11.69 ± 0.177 , 1.06 ± 0.042 g/100g 수준이었으며, 각 개별 당 분석결과 RSD(%)는 5% 이내로 나타났다.

따라서 신뢰성 있고 재현성 있는 감초 추출물의 당 분석법을 정립함으로써 감초 추출물의 당 분석 시 적절히 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- Kim, O. C., Kim, Y. H. Lee, J. I. and Kim, K. S. (1977) Recent Trand and prospect of Tobacco Flaver. p 147-166. *The Korean Society of Tobacco Science, korea*
- Vora, P. S. (1984) Characteristics and Applications of Licorice Products in Tobacco. *Tobacco International* 27:13-20.

- Gury R. (1994) Source book of flavors. 2nd ed p631-632, chapman & Hall New York, USA.
- Robert, A. H. (1985) Analysis of glycerin and propylene glycol in tobacco by HPLC. RJR, Analysis Methods, p1-28.
- Risner, C. H. and Conner, T. R. (1986) The determination of glycerin fructose, glucose, sucrose and maltose in cigarette tobacco casings by HPLC. RJR, Analysis Methods, p1-41
- Cho, S. E., Kim, M. J. Ji, S. U. Hwang, K. J. and Rhee, M. S. (2004) Uncertainty Evaluation of Nicotine in Cigarette Mainstream Smoke Using Two point Re-calibration Method. *J. Korean Soc. Tobacco Sci.* 23 :168-178
- Vola P.S (1984) The behavior of licorice components during the burning process of tobacco products. Mac Andrews and Forbes Company, U.S.A.
- AOAC Official Methods of Analysis (1990), Sugars in Licorice Extracts :909.
- Robert, D.L. (1997) Development of cigarette flavors: Now and in the future. p114-133, The Korean society of Tobacco Science, Korea.
- KOLAS 교육과정 (2001) 측정 불확도 이론. 한국 화학시험연구원, KOLAS 사업실, Korea
- 황의진, 우진춘, 최종오 (2003) 화학 분석의 불확도 평가. 물질량표준부, 한국표준과학 연구원, p.15-106 , Korea