

## HPLC-MS/MS를 이용한 어린이 기호식품의 인공감미료 분석 및 실태조사연구

이승주<sup>†</sup> · 윤호철 · 정재훈 · 이지윤 · 조현철 · 진성현  
식품분석과

### Determination of Sweeteners in Children's Favorite Foods by HPLC-MS/MS and Monitoring

Lee Seung-ju<sup>†</sup>, Yun Ho-cheol, Jung Jae-hun, Lee Ji-yoon, Jo Hyeon-cheol and Jin Seong-hyeon  
Food Analysis Division

#### Abstracts

In this study, we investigated five sweeteners (acesulfame-K, cyclamate, saccharin, stevioside and aspartame) in children's favorite foods which are sold in around the school.

HPLC-MS/MS method was developed for simultaneous determination of five sweeteners (acesulfame-K, cyclamate, saccharin, stevioside and aspartame) in children's favorite foods.

The procedure involves an extraction of the five 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 HECTOR-M C18 (150 mm X 2.1 mm 5 $\mu$ m) column using the water / acetonitrile mobile phase (95:5). Mass spectrometric analysis was carried out using the TSQ Quantum in negative and positive ESI/SRM. With this method, good linear relationship, sensitivity and reproducibility were obtained. The spike recoveries of five sweeteners for 2 kinds of foods spiked into 0.5 mg/kg ranged from 88.4% to 97.6%.

Aspartame contents in candies and cookies were 9.06, 89.04 and 17.21 mg/kg.

Concentrations of stevioside in cookies were 4.41 and 16.52 mg/kg. The method has been effected to detection of five sweeteners in children's favorite foods.

**Key words** : Sweeteners, SRM(Selective Reaction Monitoring), Children's food

#### 서 론

오늘날 식생활 문화가 서구화 되고 다양한 가공식품이 개발됨에 따라 식품첨가물의 섭취가 불가피 하게 되었다<sup>1)</sup>. 식품첨가물이란 식품의 보존성과 기호성을 향상시키며 식품의 가치를 높이기 위해 의도적으로 사용되고 있는 물질을 말한다<sup>2)</sup>. 대부분 화학적으로 합성 또는 천연유래물

질에서 용매 등을 사용하여 추출·정제하여 제조하기 때문에 안전성을 확보해야 하며 식품에 미량성분으로 첨가되지만 음식을 통해 일생동안 섭취 한다는 점에서 인체에 미치는 영향이 크다고 볼 수 있다<sup>3)</sup>. 식품첨가물 중 인공 감미료는 다양한 가공식품, 인스턴트 식품에서 설탕을 대신해 감미를 주는 재료로서 사용되고 있으며, 그 사용량 또한 증가하고 있다. 그러나 감미료는 과량섭취시 비만,

<sup>†</sup> Corresponding author, E-mail : nowhappy@korea.kr  
Tel : +82-51-309-2843, Fax : +82-51-309-2849

당뇨병, 동맥경화, 충치, 심장질환등의 발병과 깊은 상관 관계를 갖고 있어 소비자의 관심이 날로 증가되고 있다<sup>4)</sup>. 식품의약품 안전청은 인공감미료의 안전성 확보를 위하여 국제식량농업기구/세계보건기구 합동 식품 첨가물 자문 위원회에서 정하는 일일섭취허용량을 기초로 인공감미료의 종류와 첨가물을 관리하고 있다<sup>5)</sup>. 최근에는 식품에 대한 이해가 부족한 어린이들이 건강을 고려하여 식품을 선택할 수 있도록 신호등 표시 등 다양한 표시방법의 개발이나 안전한 식품 환경을 조성하려는 노력이 전세계적으로 확산되고 있으며 어린이 기호 식품의 수입도 증가되고 있어 식품첨가물 사용에 대한 안전성 문제가 지속적으로 대두되고 있다<sup>6-7)</sup>. 현재 일반가공식품을 대상으로 인공감미료에 대한 섭취량 조사가 수행되고 있으나 학교주변에서 판매되는 어린이 기호식품의 인공감미료 함유현황에 대한 조사는 부족한 실정이다. 이러한 첨가물의 사용은 필요에 의하여 사용하는 것이므로 그 종류와 사용량을 준수하여 안전한 가공식품을 소비자에게 제공하여야 하며 인체에 유해한 감미료 사용여부에 대한 감시가 필요하다. 현재 우리나라에서 식품첨가물로 허용된 감미료는 삭카린나트륨, 아스파탐, 아세설팜칼륨 및 수크랄로스 등이 있으며 현행 식품 첨가물 공전에서는 사용대상 식품과 그 사용량을 엄격히 규제하고 있다. 현재 감미료의 분석은 고속액체크로마토그래피<sup>8-9)</sup>, 이온크로마토그래피 등<sup>10)</sup>을 이용한 분석에 관한 연구가 이루어 지고 있으나 식품 전반에 다양하게 사용되고 있는 허용 감미료 및 유해 감미료를 신속 정밀하게 분석 할 수 있는 전처리 및 다성분 동시분석법 개발이 절실히 필요하며 이를 위해 식품 자체 매트릭스로의 간섭이 적고 분석 활용도가 높은 HPLC/MS/MS를 이용한 5종의 감미료 동시분석법을 확립하고자 한다.

그러나, 국가간 식품산업이나 식습관, 지정 필요성 등의 이유로 식품 첨가물 지정 현황이 상이함에 따라 최근 수입되는 식품 중 국내에서 허용되지 않는 식품첨가물이 검출되는 사례가 빈번히 발생되고 있으며 현재 식품첨가물 공전에 수재된 총 653품목으로 식품공전의 인공감미료 시험법에는 삭카린나트륨 시험법만 수재되어 있으며<sup>10)</sup>, 식품첨가물 분석법에는 아세설팜칼륨, 아스파탐, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 돌신 및 싸이클라메이트 6품목의 분석법이 수재되어 있다. 국내 인공감미료 분석법은 식품공전 일반시험법 중 인공감미료 시험법에 삭카린나트륨 시험법(HPLC-UV법)이 수재되어 있으며, 「식품 중 식품첨가물 분석법」에는 삭카린나트륨(GC, HPLC-UV), 수크랄로스(HPLC-RI), 아스파탐(HPLC-UV), 아세설팜

칼륨(HPLC-UV), 싸이클라메이트(HPLC-UV), 돌신(HPLC-UV)분석법이 수재 되어 있다. 따라서 서로 다른 분석방법으로 개별 인공감미료들을 각각 분석할 경우 번거롭고 시간이 많이 소요되므로 여러 인공감미료를 동시에 분석할 수 있는 분석방법 확립이 필요하다. 지금까지 발표된 다수의 인공감미료 동시분석법은 소수의 인공감미료만을 검출 하는데 초점이 맞춰져 왔으나<sup>11-12)</sup>, 최근 보다 많은 인공감미료를 포함한 분석 방법들이 발표되는 등 일부 진전이 있어 왔다<sup>13-16)</sup>. 최근에 HPLC-MS/MS법을 이용한 인공감미료등 동시분석법이 보고되고 있어 본 연구는 학교주변 문구점 등 소규모 소매상에서 유통되고 있는 수입산, 국내산 어린이 기호식품을 대상으로 HPLC-MS/MS를 이용하여 5종의 동시분석법을 확립하기 위하여 분석조건 및 국내유통 가공식품 중 함유량 조사를 위해 다수의 시료를 동시분석하는 방법이라 판단되어져 시험방법 등 제·개정안에 대한 기초 자료로 활용하고 안전관리방안을 마련하는데 있다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

초등학교 주변의 문구점 등을 대상으로 과자류, 캔디류, 초코릿류 등 93건을 검사하였다.

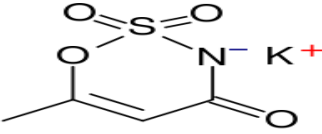
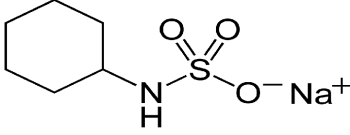
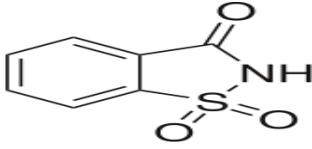
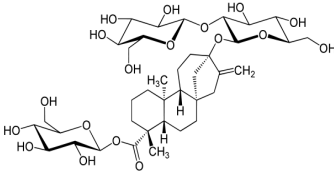
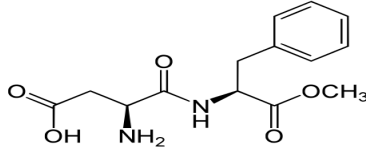
### 시약 및 기구

표준품으로 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 스테비오사이드 및 아스파탐을 사용하였고 그 구조와 상대 감미도는 Table 1과 같으며, 추출 및 HPLC-MS/MS분석을 위해 potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate(Wako), acetonitril, methanol(HPLC, J.T.baker)를 사용하였다. 전처리를 위하여 분쇄기, 초음파 장치 및 교반기를 사용하였다.

### 표준용액 조제 및 표준검량선 작성

인공감미료 분석에 사용된 표준품으로 삭카린나트륨(Sodium saccharin, Sigma) 아스파탐(Aspartame, Sigma), 아세설팜칼륨(Acesulfame potassium, Fluka), 스테비오사이드(Stevioside, Sigma), 싸이클라메이트(Cyclamate, Sigma)제품을 사용하여 methanol 용액으로 각각 표준원액 (100mg/kg)을 제조한 후, 그 농도를 0.05, 0.1, 0.5mg/L 로 희석하여 HPLC-MS/MS로 분

Table 1. Chemical structure and Relative sweetness of five sweeteners

Sweetener	Chemical structure	Relative sweetness
Acesulfame K		200
Cyclamate		30
Saccharin		300
Stevioside		300
Aspartame		180

석하여 표준 검량선을 작성하였다.

#### 시험용액의 조제

분쇄기로 파쇄한 시료 10g, 50% methanol 25mL과 침전용 Carrez 시액으로는 페로시안 칼륨(potassium ferrocyanide 3-hydrate) 150g에 물을 가하여 1,000mL 한 것을 Clearing reagent I로 황산아연 (Zinc sulfate 7-hydrate) 300g에 물을 가하여 1,000mL 한 것을 Clearing reagent II로 사용하여 Clearing reagent I, II 2mL를 추출용기 50mL에 넣고 교반기로 교반 후 초음파처리(37 kW, 1200W, 30 분)로 추출한다. 추출 후 0.22 $\mu$ m cartridge filter (Millipore corporation, USA)로 여과하여 HPLC-MS/MS로 분석하였다.

#### 회수율

혼합 감미료 표준액(0.5mg/kg)을 재료에 첨가한 후 시료 전처리와 동일한 방법으로 처리하여 회수율을 구하였으

며, 3회 반복 실험하였다.

#### 기기 조건

감미료를 분석하기 위해 Accela<sup>TM</sup> LC system이 부착된 TSQ Quantum Ultra(Thermo Scientific)를 사용하였고, HPLC 조건은 HECTOR-M C18 (150mm X 2.1 mm 5 $\mu$ m)컬럼을 사용하였으며 이동상으로는 water 와 acetonitril (95:5)를 이용하여 0분에서 2분간 용리 한 후 2분에서 10분까지 linear gradient로 acetonitril이 80%가 되도록 7분간 유지 한 다음 20분 까지 acetonitril 5%로 유지하면서 0.3mL/min의 유속으로 분석하였고 시료는 10 $\mu$ L 주입하였다. 검출을 위한 MS/MS 분석조건은 ESI(electrospray ionization) 이온화 방식을 선택하였다. positive 와 negative mode에서 SRM (selected reaction monitoring) 방식을 사용하여 nebulizing gas 로 질소가스, collision gas로 아르곤 가스를 사용하였고 기타 MS/MS 파라미터는 spray voltage 3800V, sheath gas pressure 20psi,

auxiliary gas 25psi, ion transfer capillary temperature 350℃로 설정하여 최적화 하였다.

## 결과 및 고찰

### 원산지별 현황

총 93의 시료를 원산지별로 분류하면 중국 34건, 한국 27건, 인도네시아 11건, 말레이시아 7건, 일본 4건, 터키 3건, 필리핀, 미국 각각 2건이며, 인도, 스페인, 독일이 각각 1건이었다(Fig. 1).

### 식품종별 현황

총 93의 시료를 식품종별로 분류하면 사탕이 49건, 과

자 32건, 츄잉검 9건, 기타어육가공품,

기타코코아가공품, 밀크초코릿 등이 각각 1건으로 나타났다(Fig. 2).

### 기기분석

인공감미료 표준물질을 질량분석기로 주입한 후 ESI모드에서 양이온 (+) 모드와 음이온(-) 모드를 사용하여 각 성분의 모드를 살펴 본 결과 아세살팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 수크랄로스, 스테비오사이드의 경우에는 음이온 모드에서 아스파탐은 양이온 모드에서 좋은 감도를 보였고, 분석의 선택성과 검출강도를 높이기 위해 MS/MS 분석시 SRM(selected reaction monitoring)모드로 각 성분별로 감응도가 큰 collision energy를 선정하여 각각의 성분에 대한 최적의 분석 조건을 얻은 결과

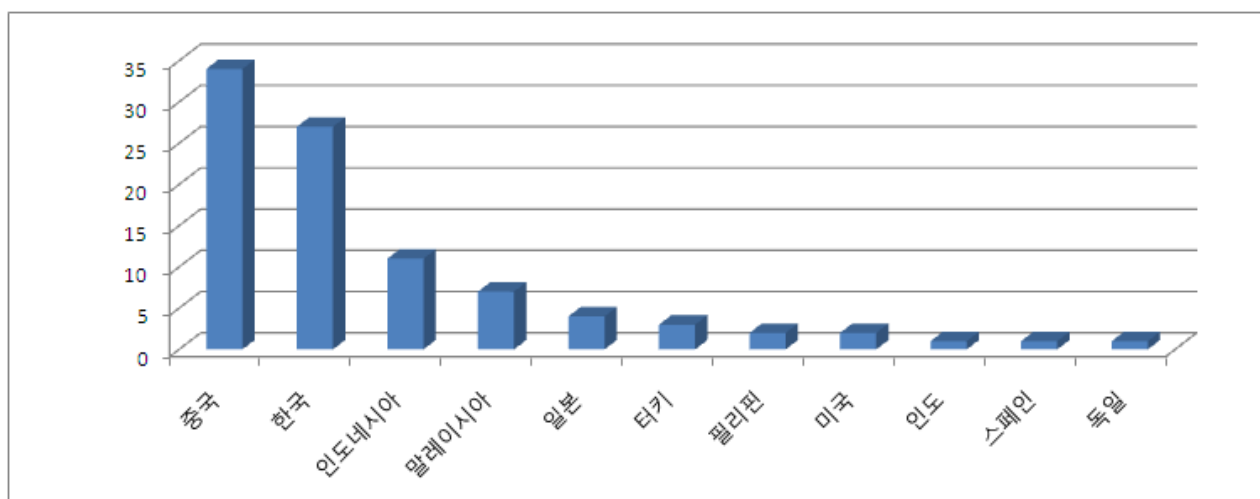


Fig. 1. Classification according to origin of country in 93 samples.

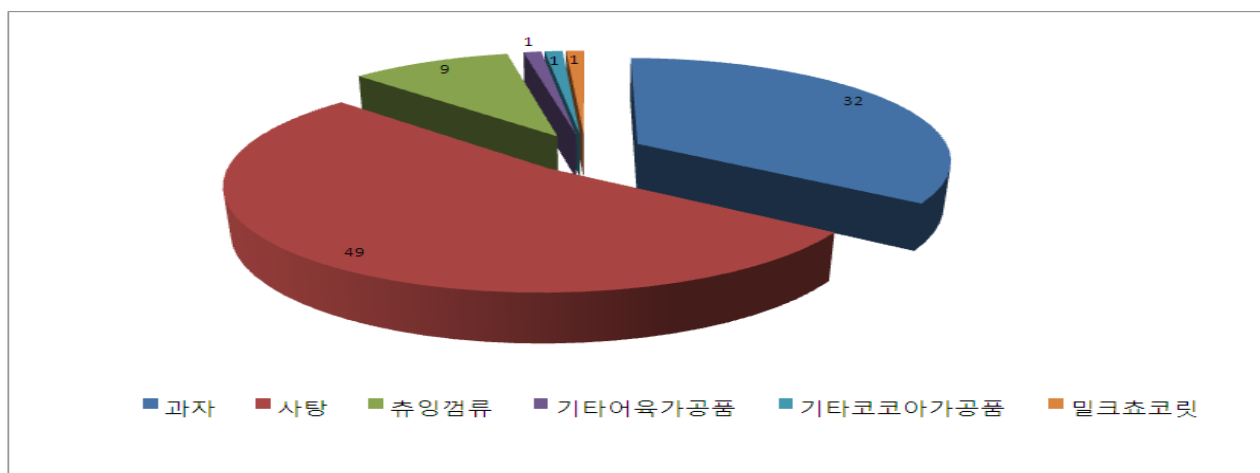


Fig. 2. Distribution according to food type in 93 samples.

Table 3 에서와 같이 각 감미료의 최적 collision energy 는 아세설팜칼륨(14, 40V), 싸이클라메이트 (27, 23V), 삭카린나트륨(18, 35V), 스테비오사이드(35, 36V), 아스파탐(29, 11V)로 이때 각각의 parent ion, quantization ion, confirm ion은 아세설팜칼륨(162,

82, 78 m/z), 싸이클라메이트(178, 80, 96m/z), 삭카린 나트륨(182, 106, 42m/z), 스테비오사이드(803, 479, 641 m/z), 아스파탐(295, 120, 235m/z)이었다. Fig. 3 은 감미료의 SRM 크로마토그램에서는 아세설팜칼륨, 싸이클라메이트, 삭카린나트륨, 스테비오사이드 및 아스파

Table 3. SRM (Selective Reaction Monitoring) transition of five sweeteners

Compounds	Parents ion(m/z)	Quantization ion(m/z)	Confirm ion(m/z)	Collision Energy	Polarity
Acesulfame K	162	82	78	14,40	Neg
Cyclamate	178	80	96	27,23	Neg
Saccharin	182	106	42	18,35	Neg
Stevioside	803	479	641	35,36	Neg
Aspartame	292	120	235	29,11	Pos

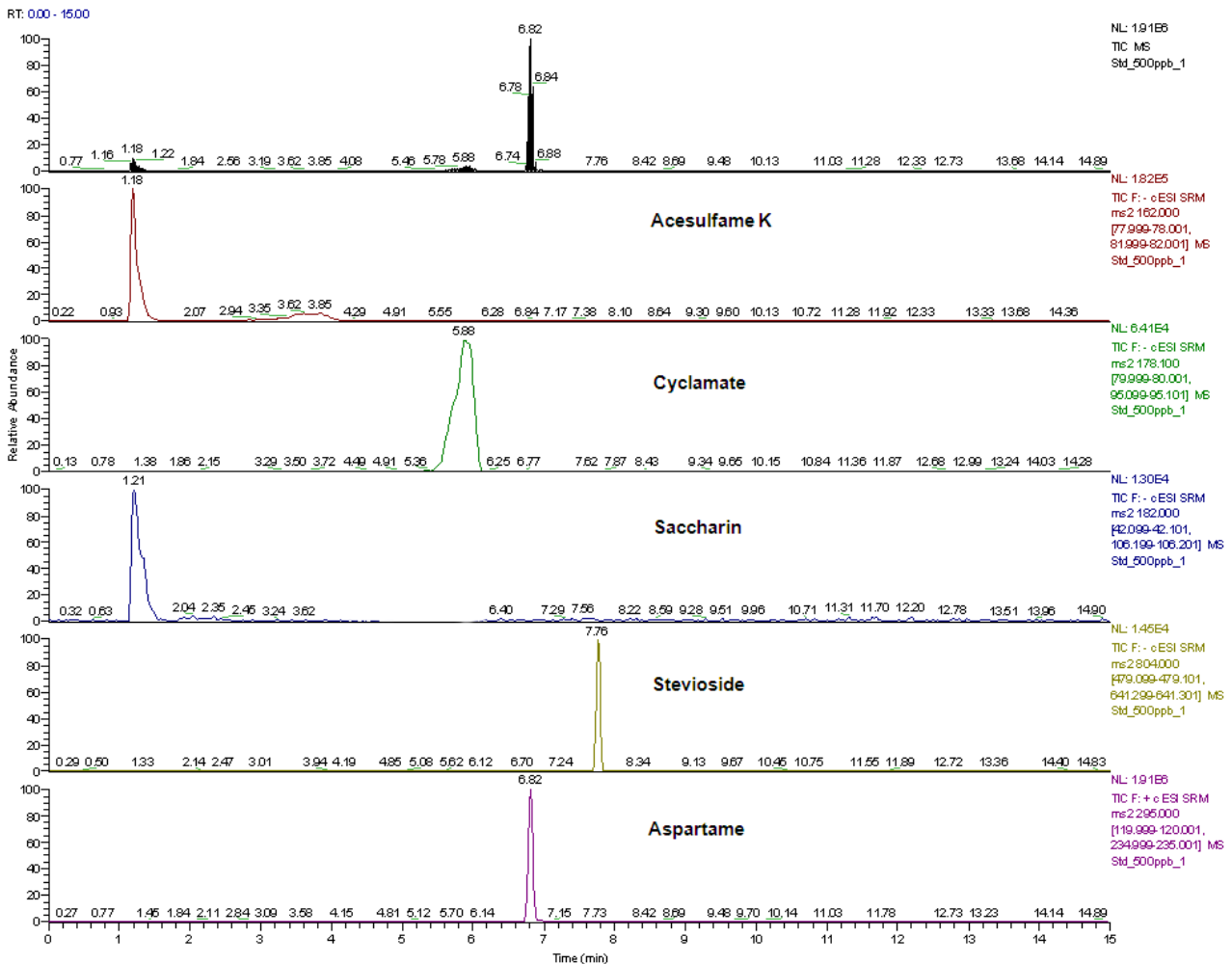


Fig. 3. SRM(Selective Reaction Monitoring) chromatogram of five sweeteners.

탐의 고유한 confirm ion 과 quantization ion 으로 확인 및 정량하였고 머무름 시간은 1.18 ~ 7.76로 10분 이

내로 분석이 가능하였다. 김등<sup>8,9)</sup>이 HPLC를 이용한 감미료 분석시 두 개의 검출기를 사용하여 동시 분석이 어려

Table 4. Recovery rates(%) of five sweeteners

Compounds	Correlation Coefficient(R <sup>2</sup> )	Recovery rates(%)	
		Candy	Cookie
Acesulfame K	0.9996	95.8	90.2
Cyclamate	1.0000	96.1	95.3
Saccharin	0.9952	95.3	97.6
Stevioside	0.9977	92.3	88.4
Aspartame	0.9985	96.4	92.6

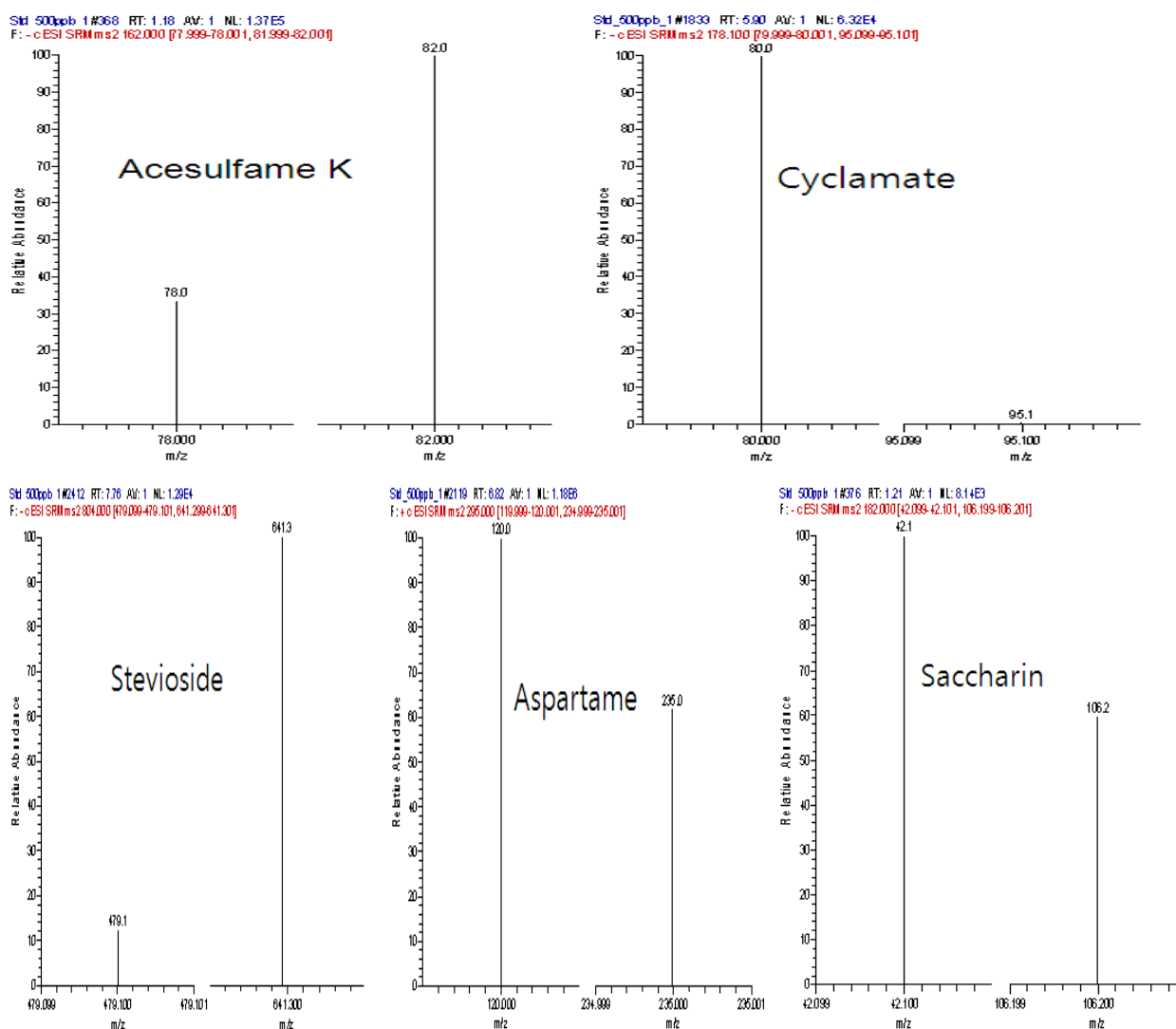


Fig. 4. Mass spectra of product ion scanning of standard solution.

Table 5. The Content of 5 sweeteners in children's favorite foods

Food type	Concentration of sweeteners (mg/Kg)				
	Acesulfame K	Cyclamate	Saccharin	Stevioside	Aspartame
Candy(49)	N.D	N.D	N.D	N.D	<sup>2</sup> (9.06, 89.04)
Cookie(32)	N.D	N.D	N.D	<sup>2</sup> (4.41, 16.52)	<sup>1</sup> (17.21)
Other processed Cocoa products(1)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Milk chocolate(1)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Other processed meat fish products(1)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Chewin gum(9)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

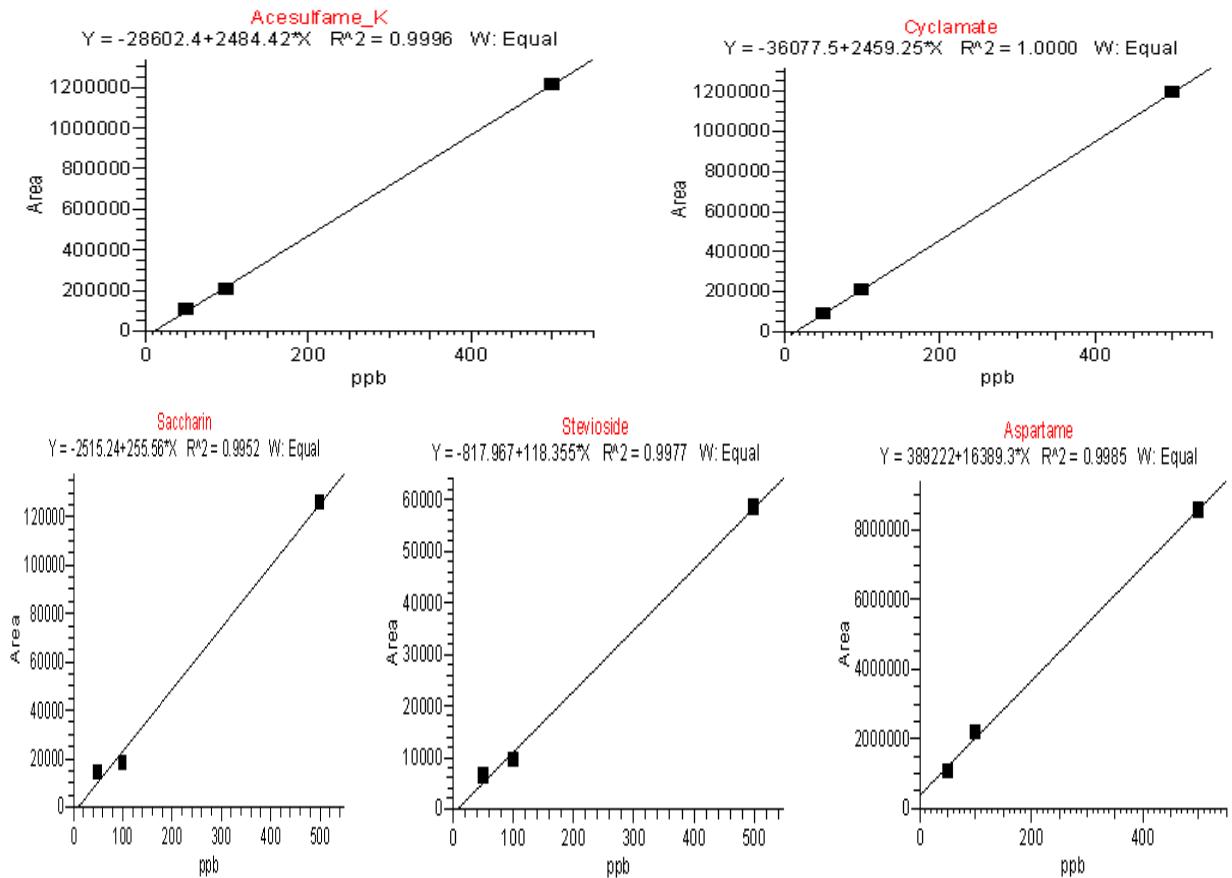


Fig. 5. Correlation Coefficient( $R^2$ ) of five sweeteners.

웠으나, 본 실험의 경우 동시 분석이 가능하였다. 정성에 그치지 않고 정량함으로써 기존 분석방법과 차별되는 결과를 얻었다.

### 검량선 및 회수율

5종의 감미료 표준액을 0.05~0.5 mg/kg의 농도로 조제한 후 분석 검량선을 작성한 결과 각각 감미료의 상관계수( $R^2$ )은 0.9952~1.0000로 양호한 직선상의 그래프를 얻을 수 있었다(Fig. 5)

시료에 대한 감미료의 분석법 회수율은 과자 및 캔디를 잘게 분쇄하여 10g를 취한 후에 혼합 표준용액(각각 0.5mg/L)를 첨가 한 후 회수율 시험을 3회 반복한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 과자의 회수율은 88.40~97.6%이고 캔디는 92.3~96.1%로 전반적으로 좋은 회수율을 보였다. 김 등<sup>9)</sup>의 식품에서 아세설팜칼륨, 삭카린나트륨 등을 HPLC로 분석한 회수율 92.5%~97.3%의 결과와 유사하였다.

### 어린이 기호식품 감미료 분석

부산시내에서 유통 중인 어린이 기호식품 93건에서 5종류의 감미료를 측정된 결과는 과자류에서 스테비오사이드 2건, 아스파탐이 1건이 검출되었으며 농도는 각각 스테비오사이드는 4.41, 16.52mg/kg 이었고 아스파탐은 17.21 mg/kg 이었으며, 캔디류에서는 아스파탐이 2건 검출 되었다. 농도는 아스파탐 2건에 9.06, 89.04mg/kg 이 검출 되었다(Table 5).

과자에서의 아스파탐에 대한 사용량은 5,000mg/kg 이하이고 스테비오사이드에 대해서는 규제치가 없으며, 캔디에 대해서는 아스파탐과 스테비오사이드에 대한 규제치는 없다. 따라서 검출된 감미료는 사용 가능한 감미료이며 사용금지된 감미료는 검출 되지 않았다. 김 등<sup>17)</sup>의 식품에서 6종의 감미료를 HPLC-MS/MS를 이용한 결과와 분석할 때 분석 시간은 10분 이내로 본 실험방법에서의 분석시간과 회수율등의 유사한 결과가 나타났다.

### 요약

총 93의 시료를 원산지별로 분류하면 중국이 34건, 한국이 27건으로 각각 29%로 36.5%를 차지하고 있으며 식품종별로는 사탕이 49건, 과자 32건으로 각각 34.4%, 52.7%로 나타났으며, 아세설팜칼륨, 사이클라메이트, 삭

카린나트륨, 스테비오사이드, 아스파탐을 HPLC-MS/MS이용하여 동시 분석한 결과 각 감미료 별로 고유한 스펙트럼을 얻어 정량하여 머무름 시간은 1.18 ~ 7.76로 10분 이내로 분석이 가능하였다. 각각 감미료의 상관계수  $R^2$ 은 0.9952~1.0000로 양호한 직선상의 그래프를 얻을 수 있었다. 시료에 대한 5종의 감미료에 대한 분석법의 회수율은 과자의 회수율은 88.40~97.6%이고 캔디는 92.3~96.1%로 전반적으로 좋은 회수율을 보였다. 부산 시내에서 유통 중인 어린이 기호식품 93건에서 5종류의 감미료를 측정된 결과는 과자류에서 스테비오사이드 2건, 아스파탐이 1건이 검출되었으며, 캔디류에서는 아스파탐이 2건 검출되었다. 그 농도는 과자에서는 스테비오사이드는 4.41, 16.52mg/kg 이었고 아스파탐은 17.21 mg/kg 이었으며, 캔디의 경우 아스파탐만 검출되었으며 2건에 9.06, 89.04mg/kg이 검출 되었다.

### 참고문헌

1. Lee, C.H., Park, S.K., Yoon, H.J., Park, J.S., Lee, J.O. and Lee, C.W. : Estimation of daily intake of artificial sweeteners and antioxidants in food. *Korea J. Food Sci. Technol.*, 32, pp.519~524(2000).
2. Jung, K.H. : Research directions for food additives safety. *J. Fd. Hyg. Safety*, 4, pp.398~407(2009).
3. Choi, C.W., Jeong J.Y., Park, H.S., Moon, J.H., Lee, K.H. and Lee, H.M. : Evaluation of toxicological data food additives and guideline for ADI establishment - Polydimethyl siloxane as emulsifier. *J. Fd. Hyg. Safety*, 24, pp.352~356(2009).
4. Kim, H.Y., Yoon, H.J., Hong, N.H., Lee, C.H., Park, S.K., Choi, J.D., Choi, W.J., Park, S.Y., Kim, J.H. and Lee, C.W. : A study on the analytical method of artificial sweeteners in foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, pp.14~18(2004).
5. Lee, Y.M., Na B.J., Lee, Y.S., Kim, S.C., Lee, D.H., Seo I.W., Choi, S.H. and Ha, S.D. : Monitoring of tar color content in children's snack and its exposure assessment. *J. Fd. Hyg. safety*, 26, pp.57~63(2011).
6. Choi, Y.S., Chang N.S., Joung, H.J., Cho, S.H. and Park, H.K. : A study on the guideline



- amounts of sugar, sodium and fats in processed foods met to children's taste. *Korean J. nutr.*, 41, pp.561~562(2008).
7. Kim, H.Y., Nam, H.S., Jung, J.H., Lee, J.H., and Ha, S.C. : Tar color in foods distributed throughout the Gyeong-In region—monitoring favorite good items of children near elementary schools. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 40, pp.243~250(2008).
  8. 김명길, 윤미혜, 전일형, 김양희, 정진아 : 식품 중 합성 첨가물 사용실태 조사연구, 한국식품위생학회지 14(3), pp.244~248(1999).
  9. 김희연, 윤혜정, 홍기형, 이창희, 박성관, 최장덕, 최우정, 박선영, 김지혜, 이철원 : 식품 중 인공감미료 분석법에 관한 연구, 한국식품과학회지 36(1), pp.14~18 (2004).
  10. 식품의약품 안전청 : 식품첨가물공전 (2011)
  11. Wu, P., Cheng, C., Chou, S. : Determination of acesulfame-K, saccharin, aspartam, dulcin and cyclamate in beverages. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.*, 33, pp.37~50(1995).
  12. Kim, H.Y., Yoon, H.J., Hong, N.H., Lee, C.H., Park, S.K., Choi, J.D., Choi, W.J., Park, S.Y., Kim, J.H. and Lee, C.W. : A study on the analytical method of artificial sweeteners in foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, pp.14~18(2004).
  13. Furio, T.E : CRC Handbook of food additives. 2nd ed. Volume 2. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.(1980).
  14. Wasik, A., McCourt, J., Buchgraber, M: Simultaneous determination of nine intense sweeteners in food stuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection; Development and single-laboratory validation. *J. Chromator.*, A, 1157, pp.187~196(2007).
  15. Koyama M., Yoshida K., Uchibori N., Wada I., Akiyama K., Sasaki T.: Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS, 46(3), pp.72~78(2005).
  16. Yang, D.J., Chen, B.O. : Simultaneous of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 57, pp.3022~3027(2009).
  17. Kim, I.Y., DU, O.J., Lee, S.D., Park, Y.H., Kim, M.S., Beo C.H. and Chae, Y.Z. : Determination of Six Sweeteners in Children's Favorite Foods by HPLC-MS/MS *J. Fd. Hyg. safety*, 25(2), pp.118~121(2010).