

건강기능식품에서 HPLC-UVD를 이용한 자일로올리고당 시험법의 표준화 연구

이세윤 · 정희선 · 김규현* · 이미영 · 최정호 · 안정선 · 권광일 · 이해영
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 영양기능연구과

Studies on Xylooligosaccharide Analysis Method Standardization using HPLC-UVD in Health Functional Food

Se-Yun Lee, Hee-Sun Jeong, Kyu-Heon Kim*, Mi-Young Lee, Jung-Ho Choi, Jeong-Sun Ahn,
Kwang-Il Kwon, Hye-Young Lee

Nutrition and Functional Food Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received August 9, 2023/Revised October 24, 2023/Accepted October 30, 2023)

ABSTRACT - This study aimed to develop a scientifically and systematically standardized xylooligosaccharide analytical method that can be applied to products with various formulations. The analysis method was conducted using HPLC with Cadenza C₁₈ column, involving pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline (PMP) and UV detection at 254 nm. The xylooligosaccharide content was analyzed by converting xylooligosaccharide into xylose through acid hydrolysis. The pre-treated methods were compared and evaluated by varying sonication time, acid hydrolysis time, and concentration. Optimal equipment conditions were achieved with a mobile phase consisting of 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6)-acetonitrile (78:22, v/v) through isocratic elution at a flow rate of 0.5 mL/min (254 nm). Furthermore, we validated the advanced standardized analysis method to support the suitability of the proposed analytical procedure such as specificity, linearity, detection limits (LOD), quantitative limits (LOQ), accuracy, and precision. The standardized analysis method is now in use for monitoring relevant health-functional food products available in the market. Our results have demonstrated that the standardized analysis method is expected to enhance the reliability of quality control for healthy functional foods containing xylooligosaccharide.

Keywords: Health functional food, Xylooligosaccharide, Xylose, Standardization

「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 기능성 원료는 고시된 원료(고시형 원료, 누구나 사용할 수 있는 원료) 및 고시되지 아니한 원료(개별인정형 원료, 인정받은 영업자만이 사용할 수 있는 원료)로 구분되며, 고시되지 아니한 원료는 식품의약품안전처장이 개별적으로 인정한 원료로 영업자가 원료의 기준·규격, 안전성 및 기능성 등의 자료를 제출하여 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인

정에 관한 규정」에 따른 심사를 통해 기능성 원료로 인정받고 있다¹⁾. 개별인정형 원료는 인정받은 영업자에 한하여 제조·수입하도록 규정하고 있어 제한된 영업자만 제조할 수 있어 다양한 종류의 제품 생산에 한계가 있을 수 있다. 이에 산업체의 건강기능식품 개발 의욕을 고취하고, 다양한 제품을 개발할 수 있는 환경을 조성하여 건강기능식품 유통시장을 확대하고, 소비자에게 다양한 건강기능식품을 제공할 수 있어야 한다. 따라서 개별인정형 원료는 인정받은 일로부터 6년이 경과하고, 품목제조신고 50건(생산실적이 있는 경우에 한함) 이상인 경우 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 추가로 등재할 수 있도록 규정하고 있다.

자일로올리고당은 식물의 헤미셀룰로오스의 주요 구성 성분인 자일란(xylan)을 가수분해하여 생성되는 자일로기를 갖는 올리고당이다. 일반적으로 2-10개의 자일로스가 β-1,4 결합으로 연결된 구조이다²⁾. 주로 옥수수 심, 죽순,

*Correspondence to: Kyu-Heon Kim, Nutrition and Functional Food Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4425, Fax: +82-43-719-4420
E-mail: khkim95@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

면화 깍지 등에서 추출하며 체내에서 소화, 흡수되지 않고, 대장에서 여러 유익균의 성장과 활성을 선택적으로 자극하여 건강을 개선시키는 프로바이오틱스의 효과를 갖는 것으로 보고되었다^{3,4)}. 이처럼 장내 유익균의 증식 및 활성을 촉진하여 건강기능식품 개별인정형 원료로 2009년 2건 인정되었고, 기능성은 ‘장내 유익균 증식, 유해균 억제, 배변활동에 도움을 줄 수 있음’이다⁵⁻⁷⁾. 향후, 「건강기능식품의 기준 및 규격」으로 추가 등재될 가능성이 있어, 일부 개정고시 전에 기능성 원료 및 다양한 제형·제품의 품질관리 등을 위한 표준화된 시험법 마련이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 개별인정형 원료로 인정받은 자일로올리고당 관련 시험법을 재검토(개별인정형 원료 시험법, 식품공전·AOAC·USP 등 공인 시험법, 최근 문헌 등)하고, 시험법 밸리데이션⁸⁾ 및 실험실 간 교차검증 과정을 통해 국내에서 유통 중인 건강기능식품에 대한 적용성을 확인하여 표준화된 시험법을 마련하고자 한다.

Materials and Methods

시약 및 재료

본 연구에서 사용된 자일로로스 표준품과 제1인산칼륨, 제2인산칼륨, 황산, 수산화나트륨, 염산 및 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline (PMP) 시약은 Sigma-Adrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였으며, 아세트니트릴과 클로로포름은 Merck (Burlington, MA, USA)사로부터 HPLC급으로 구입하여 사용하였다. 시료는 인터넷 판매 사이트를 이용하여 27건을 구매하여 시험에 사용하였다. 또한, 당질, 지방질, 단백질을 부원료로 시제품을 제조하여 지표성분 함유량에 대하여 적용성 검토를 수행하였다.

표준용액 조제

표준물질 자일로로스 100 mg을 100 mL 부피플라스크에 넣고 증류수를 표선까지 채운 것을 표준원액으로 사용하며, 표준원액을 증류수로 적당량 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

시험용액 조제

자일로올리고당으로서 70 mg 이상이 함유되도록 적당량의 시료를 100 mL 갈색부피플라스크에 달아 증류수를 가한 후 15분간 초음파 추출하고, 실온까지 식힌 후 증류수로 표선까지 채운 다음, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하며, 상등액을 취하여 시험용액 A로 사용하였다. 시험용액 A를 10 mL 취하여 5 M 황산 1.2 mL를 가한다. 100°C에서 90분간 가수분해한 후 냉각하고 5 N 수산화나트륨 2.4 mL를 가하여 중화시킨다. 중화시킨 용액을 100 mL 부피플라스크에 담아 증류수로 정용한 용액을 시험용액 B로 사용하였다.

표준용액과 시험용액 유도체화

표준용액과 시험용액 A, B를 각각 2 mL씩 빛을 차단할 수 있는 15 mL 갈색 튜브에 담는다. 메탄올성 0.5 M 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline (PMP) 시약 1 mL과 0.3 M 수산화나트륨 1 mL를 가하여 70°C에서 30분간 유도체화시킨다. 냉각시킨 후 0.3 M 염산을 1 mL 첨가하여 중화시키고 클로로포름 4 mL를 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 원심분리한 시험용액 중 상등액을 취하여 0.45 nylon 필터로 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용하였다.

국내·외 시험법 검토

현재 개별인정형 원료로 인정받은 자일로올리고당 시험법^{9,10)}은 각각 분말과 액상으로 제형은 다르지만, 시험법은 동일하며 제1법은 증류수로 추출한 후 액체크로마토그래프/시차굴절계검출기를 통해 분석한 자일로로스, 자이로비스-자일로헵토오스를 합하여 자일로올리고당 함량을 분석하는 방법이고, 제2법은 증류수로 추출 후 PMP 시약으로 유도체화하여 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기를 통해 분석한 자일로로스의 가수분해 전과 후의 함량 차이로 자일로올리고당 함량을 분석하는 방법이었다(Table 1). 「식품의 기준 및 규격」 시험법은 증류수로 용해하여 HPLC-RI로 분석하는 시험법이고, AOAC 시험법은 차아황산나트륨으로 적정하는 시험법이고¹¹⁾, USP-FCC 시험법은 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기로 192 nm에서 분석하는 방법이다¹²⁾(Table 1).

최근 문헌에 따르면, 자일로올리고당의 시험법은 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기를 통해 분석한 논문들이 다수 보고되고 있다. 특히, Yohei 등¹³⁾에 따르면 자일로올리고당을 TFA로 가수분해 후 PMP 시약으로 유도체화하여 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기를 통해 235 nm에서 분석하였으며, Chuannan 등¹⁴⁾에 따르면 자일로올리고당을 수산화나트륨으로 가수분해 후 PMP 시약으로 유도체화하여 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기를 통해 245 nm에서 분석하였다. Natalie 등¹⁵⁾에 따르면 자일로올리고당을 증류수로 용해 후 PMP 시약으로 유도체화하여 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기를 통해 245 nm에서 분석하였고, Jianghua 등¹⁶⁾에 따르면 자일로올리고당을 PMP 시약으로 유도체화하여 액체크로마토그래프/자외선흡광광도검출기를 통해 245 nm에서 다양한 이동상 조건(buffer 농도, pH, 이동상 비율 등)으로 분석하였다(Table 1).

밸리데이션 방법

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 분리도 및 머무름시간을 확인하였다. 직선성은 시료에서 성분이 검출되는 농도 범위를 중간값으로 설정하여 총 7개의 농

Table 1. Comparison of analysis methods (official, recent literature, and certificate of functional ingredient)

	Methods	Target	Pre-treatment	Anaylsis conditions
Official	Food code (Xylooligosaccharide)	Food	Dissolving in distilled water	Device: LC-RI Mobile phase: 67% Acetonitrile
	AOAC ⁽¹¹⁾ (950.57 xylose in sugars and syrups)	Sugars, syrup	Dissolving in distilled water	Adequate
	USP ⁽¹²⁾ (Xylose)	-	Dissolving in 75% ACN	Device: LC-UVD Wavelength: 192 nm
Certificate of functional ingredient	No. 2009-80 ⁽⁹⁾ (Act 1) / No. 2009-81 ⁽¹⁰⁾	Health functional food	Dissolving in distilled water	Device: LC-RID Mobile phase: 0.005 M Sulfuric acid solution
	No. 2009-80 ⁽⁹⁾ (Act 2)		Acid hydrolysis (sulfuric acid) followed by PMP derivatization	Device: LC-UVD Wavelength: 254 nm Mobile phase: 10 mM Phosphate buffer solution:Acetonitrile(78:22)
Recent literature	Yohei, Y. et al. ⁽¹³⁾ (2019)	Xylooligosa- ccharide	Acid hydrolysis (2 M TFA) followed by PMP derivatization	Device: LC-UVD Wavelength: 235 nm Mobile phase: 0.1 M Phosphate buffer solution:Acetonitrile(83:17)
	Chuannan, L. et al. ⁽¹⁴⁾ (2018)		0.3M sodium hydroxide followed by PMP derivatization	Device: LC-UVD Wavelength: 245 nm Mobile phase: 40 mM Phosphate buffer solution:Acetonitrile(70:30)
	Natalie, K. et al. ⁽¹⁵⁾ (2017)		Dissolving in distilled water followed by PMP derivat- ization	Device: LC-UVD Wavelength: 245 nm Mobile phase: 40 mM Phosphate buffer solution:Acetonitrile(79:21)
	Jianghua, P. et al. ⁽¹⁶⁾ (2016)		Dissolving in distilled water followed by PMP derivatization	Device: LC-UVD Wavelength: 245 nm Mobile phase: 10 mM Ammonium acetate buffer:Acetonitrile(80:20)

도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL를 검토하였으며, 표준 용액만을 이용하여 산출하였고, 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3 반복 시험을 수행하였다. 정확도는 자일로올리고당을 함유하지 않은 공시료에 대하여 각각 다른 농도를 spiking/recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다. 표준물질 첨가법에 따라 공시료에 대하여 일정량의 시료를 채취하고, 표준용액을 각각 첨가하였을 때 자일로 스 최종 농도의 합이 10, 20, 30 µg/mL이 되도록 설정하여 진행하였다. 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였다. 검출한계와 정량한계의 경우 표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y 절편값을 이용하여, 검량선 y 절편값의 표준편차에 3.3배

를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 것을 검출한계, 10 배를 곱한 값에 기울기 평균값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. 정밀도는 시료량의 변화에 대한 반복 정밀도 (반복성, repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본 시료를 선정 후 시료 200, 400, 600 mg을 각각 취하여 5회 반복 측정하였다. 마지막으로 실험실 간 재현성 (reproducibility)을 확인하기 위하여 3개 실험실에서 표본 시료를 5회 반복 측정하였다.

기기 조건

자일로올리고당을 분석하기 위해 photo diode array (PDA, Accela PDA 80, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA)가 장착된 high performance liquid

Table 2. Analysis parameters of HPLC for xylooligosaccharide in sample

Parameters	Conditions
Column	Cadenza C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 3 μm)
Column oven temp.	30°C
Injection volume	10 μL
Mobile phase	20 mM Potassium phosphate buffer (pH 6) : Acetonitrile (78:22)
Flow rate	0.5 mL/min
Wavelength	254 nm

chromatography (HPLC, Nanospace SI-2, Shiseido Co., Japan)를 사용하였으며, 칼럼은 Cadenza C₁₈ (4.6 × 250 mm, 3 μm, Imtakt Co., Japan) 이었으며, 이동상은 Table 2와 같이 pH를 6.0으로 맞춘 20 mM 인산완충용액과 아세토니트릴을 78:22 비율로 혼합하여 사용하였으며, 0.5 mL/min 유속으로 254 nm로 하여 분석하였다.

계산 방법

확립한 자일로올리고당 시험법은 자일로올리고당을 자

일로스로 분해하여 분석한 자일로로스 함량에 자일로올리고당 평균 전환계수(1.1)를 계산하여 총 자일로올리고당 함량을 산출해내는 방법이다. 자일로올리고당에서 분해된 총 자일로로스 함량(가수분해 후 자일로로스 함량, B)에서 기존 시료에 존재하는 자일로로스 함량(가수분해 전 자일로로스 함량, A)을 제외한 분석함량에 자일로올리고당 전환계수(1.1)를 계산하여 아래와 같은 식에 따라 자일로올리고당 함량이 산출되었다.

$$\text{자일로올리고당 함량(mg/g)} = (B - A) \times 1.1$$

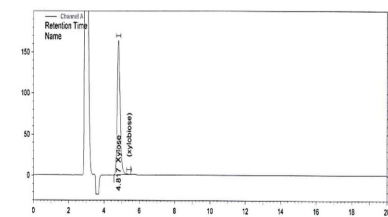
A: 가수분해 전 자일로로스 함량(mg/g)

B: 가수분해 후 자일로로스 함량(mg/g)

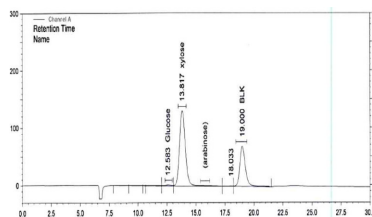
1.1: 자일로로스 와 자일로올리고당의 평균 전환계수

통계 처리

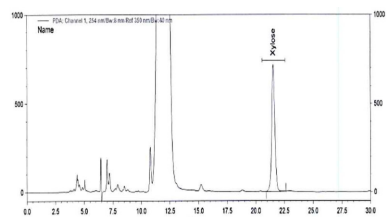
통계적 분석은 IBM SPSS Statistic (Version 26.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 수행하였다. 각 시료에 대한 유의성 검정은 Duncan test를 이용하였다. P<0.05 수준에서 유의성을 검증하였으며 데이터는 평균±표준편차로 표기하였다.



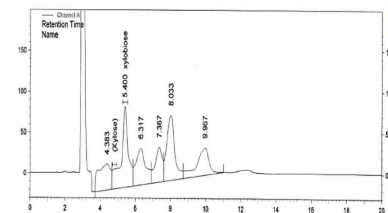
Food code
(A) Standard solution



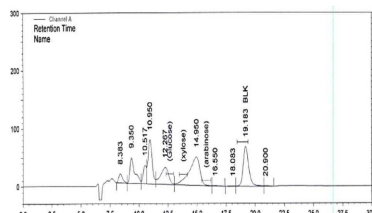
No. 2009-80 (Act 1), -81



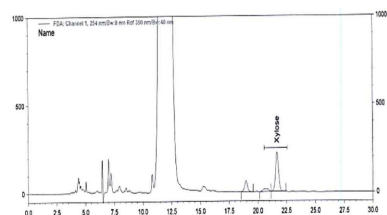
No. 2009-80 (Act 2)



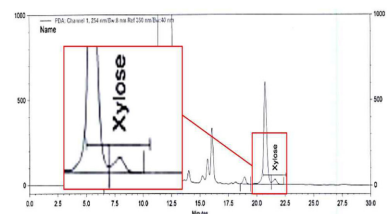
Food code



No. 2009-80 (Act 1), -81



<Hydrolysis (before)>



<Hydrolysis (after)>

No. 2009-80 (Act 2)

(B) Sample solution

Fig. 1. Chromatogram comparison of food code and certificate of functional ingredient (No. 2009-80, -81) by analysis methods in (A) standard solution and (B) sample solution.

Results and Discussion

최적 분석조건 확립

시험법 검토 결과

「식품의 기준 및 규격」의 시험법은 표준용액의 피크 분리도가 우수하지만, 건강기능식품 제품을 이용한 시험용액에서는 피크 모양이 늘어서고 피크 분리가 어려운 문제점이 있었다. 개별인정형 원료로 인정받은 자일로올리고당 시험법 중 1법은 건강기능식품 제품 시험용액에서 표준용액의 머무름시간과 구분이 어렵고, 피크의 분리도가 낮으며, 2법은 표준용액과 가수분해 후 시험용액의 피크의 분리도가 높지만, 가수분해 전 시험용액의 피크 분리가 필요하였다(Fig. 1). 자일로올리고당은 자외선 흡수를 하지 못해 자외선흡광광도검출기(HPLC-UV)로는 분석이 어려워 주로 시차굴절계검출기(HPLC-RID)를 이용하고 있으나, 낮은 민감도와 분리도로 인해 정확한 함량 분석이

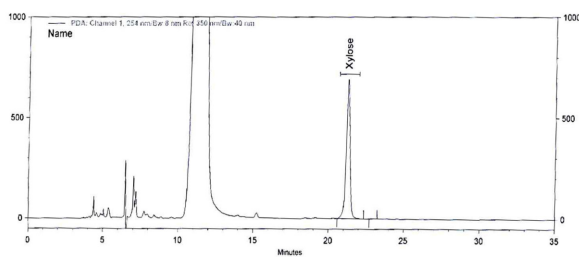
어려울 것으로 판단되어 자외선흡광광도검출기(HPLC-UV)를 이용하는 2법을 개선하여 표준화된 시험법을 마련하였다.

기기분석 조건 개선

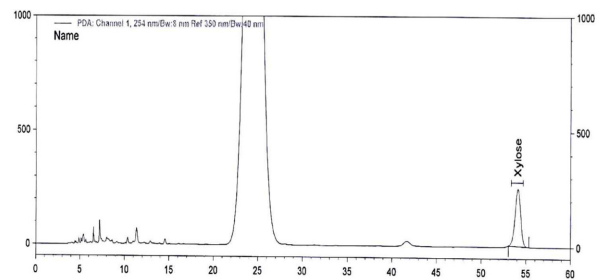
‘가수분해 전’ 시험용액의 피크를 분리하기 위해 기기조건을 비교·검토한 결과, 산 첨가를 통해 칼럼 머무름시간을 늘려 피크를 분리하고자 하였다. 기존 10 mM 인산완충용액(pH 7.5) 제조 시 제1인산칼륨용액과 제2인산칼륨용액의 비율로 pH 농도를 조정하였고, 최종적으로 pH 6.0과 20 mM 인산완충용액에서 피크가 분리됨을 확인하였다(Fig. 2,3).

전처리 조건 개선 : 초음파 추출 시간, 가수분해 조건, 시료 채취량

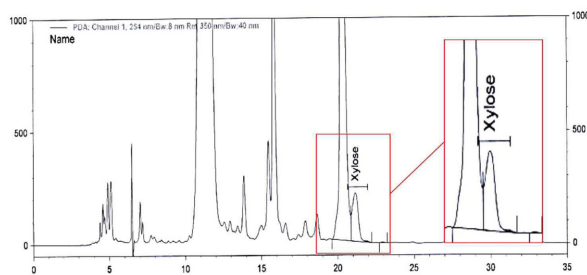
전처리 방법은 물을 용매로 초음파 추출하고, 산 가수분해를 통해 가수분해 전과 후 시험용액을 마련하여 PMP



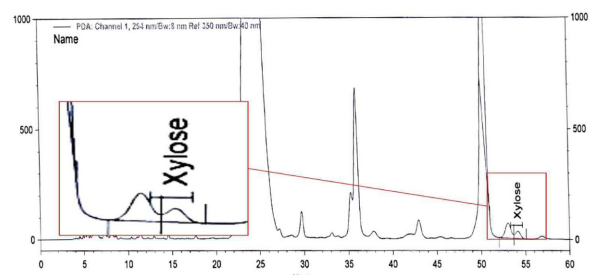
(A) Standard (pH 7.5)



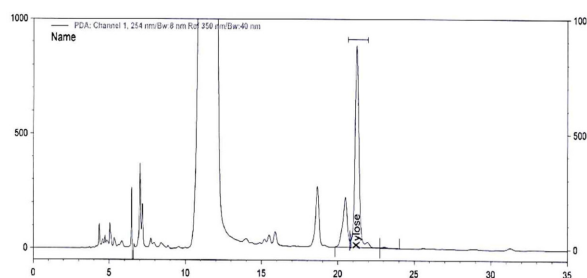
(B) Standard (pH 6.0)



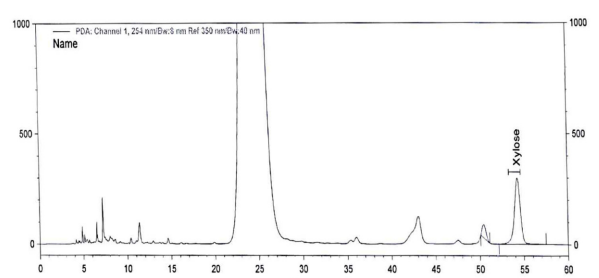
(C) Sample before hydrolysis (pH 7.5)



(D) Sample before hydrolysis (pH 6.0)



(E) Sample after hydrolysis (pH 7.5)



(F) Sample after hydrolysis (pH 6.0)

Fig. 2. Comparison of chromatogram by pH conditions (mobile phase) in (A) standard (pH 7.5), (B) standard (pH 6.0), (C) sample before hydrolysis (pH 7.5), (D) sample before hydrolysis (pH 6.0), (E) sample after hydrolysis (pH 7.5), and sample after hydrolysis (pH 6.0).

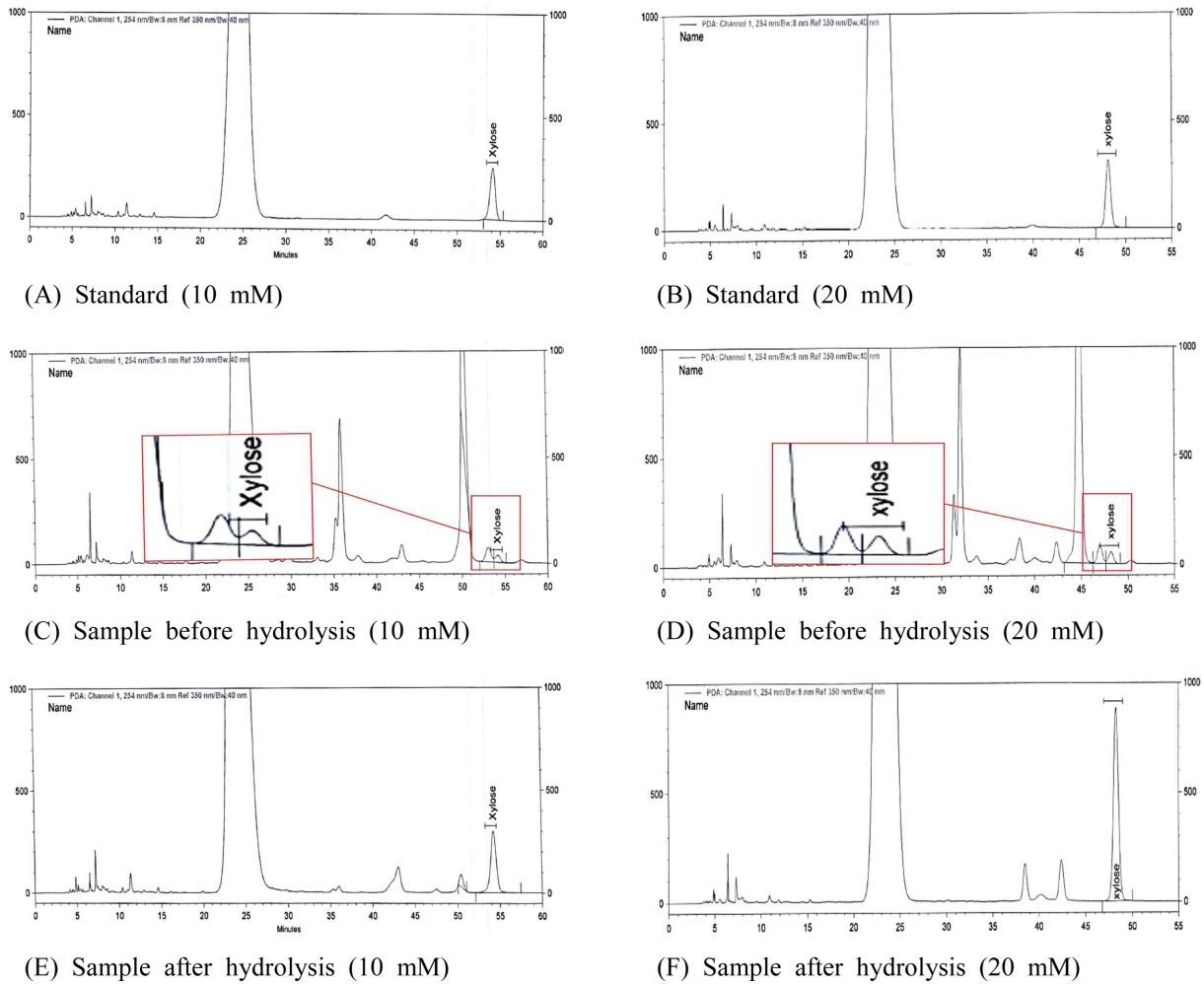


Fig. 3. Comparison of chromatogram by buffer concentration conditions (mobile phase) in (A) standard (10 mM), (B) standard (20 mM), (C) sample before hydrolysis (10 mM), (D) sample before hydrolysis (20 mM), (E) sample after hydrolysis (10 mM), and sample after hydrolysis (20 mM).

시약을 이용해 유도체화하는 과정을 따르며, 최적의 조건을 마련하기 위해 초음파 추출이 함량에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 검체 중 자일로올리고당을 중간값으로 갖는 검체를 선정하여 초음파시간을 15, 30, 45, 60분으로 설정하여 자일로올리고당 함량을 측정하였다. 그 결과, 시간에 따른 자일로올리고당 함량 변화가 통계적으로 유의차가 없으므로 효율적인 시험법을 위해 초음파시간을 15분으로 설정하였다(Table 3).

기존 시험법의 가수분해 온도와 시간은 100°C에서 100분이었으며, 온도 조건을 90, 100, 110, 120°C로 설정하여 비교-분석한 결과, 온도에 따른 자일로올리고당 함량 변화는 크지 않았으나 시험 과정 중 110°C부터 시험용액이 끓어오르는 현상이 발생해 시험용액이 끓지 않는 100°C로 온도 조건을 설정하였다(Table 5). 자일로올리고당을 자일로스로 가수분해하기 위한 산 농도를 기존 황산 농도 4 M을 기준으로 1, 2, 3, 5 M 농도로 조절하여 비교한 결과,

5 M일 때 자일로올리고당 분석함량이 가장 높게 분석되었으며, 상대표준편차값(RSD)은 가장 낮게 분석되어 최종 황산농도를 5 M로 설정하였다(Table 6). 가수분해 시간은 30, 60, 90, 100, 120분으로 설정하여 비교-분석한 결과, 90분으로 시간을 설정하였을 때 자일로올리고당 함량이 가장 높게 분석되어 가수분해 시간을 90분으로 최종 설정하였다(Table 4).

시료 채취량은 자일로올리고당으로서 50 mg으로 제시하고 있으며, 다양한 시료에 대해 적용성을 확인하기 위해 자일로올리고당 표기 함량이 가장 낮은 검체와 가장 높은 검체를 선정하여 시료 채취량 설정 시험을 진행하였다(다만, 액상 제형의 경우 분말이나 정 제형과 표기 함량이 최대 130배 이상 차이 나기 때문에 액상 제형을 분말 및 정 제형과 구분하여 시험). 기존 시험법의 시료 채취량인 자일로올리고당으로서 50 mg을 중간값으로 하여 총 5개의 시료 채취량으로 나눠 시험을 진행하였다. 50, 100, 200,

Table 3. Comparison of analysis results by pre-treatment conditions (ultrasonic extraction time and hydrolysis temperature)¹⁾

Ultrasonic extraction time (min)	Sample amount (350 mg/g)		
	Xylooligosaccharide contents (mg/g)	%RSD	Content ratio to labeled amount (%) [80-120%]
15	397.9±7.6 ^a	1.9	114
30	399.8±8.1 ^a	2.0	114
45	400.0±7.5 ^a	1.9	114
60	392.7±3.5 ^a	0.9	112
Hydrolysis temperature (°C)	Sample amount (350 mg/g)		
	Xylooligosaccharide contents (mg/g)	%RSD	
90	380.5±3.8 ^a	1.0	
100	390.5±5.5 ^a	1.4	
110	385.6±15.2 ^a	3.9	
120	385.3±5.8 ^a	1.5	

¹⁾Means in the same column for each species followed by different letters are significantly different according to Duncan's test ($P<0.05$); mean±standard deviation.

Table 4. Comparison of analysis results by pre-treatment conditions (sulfuric acid concentration and temperature of sulfuric acid hydrolyzate)

Sulfuric acid concentration	Xylooligosaccharide contents (mg/g)	%RSD	Hydrolysis time (min)	Xylooligosaccharide contents (mg/g)	%RSD
1 M	362.9±8.7	2.4	30	140.9±13.7	9.7
2 M	390.0±8.8	2.3	60	374.5±19.0	5.1
3 M	399.8±8.1	2.0	90	420.8±6.3	1.5
4 M	390.5±10.2	2.6	100	404.9±13.0	3.2
5 M	400.3±6.4	1.6	120	409.9±13.0	3.2

Table 5. Comparison of analysis results (xylooligosaccharide in tablets and powder formulations) by pre-treatment conditions (sample amount)

Sample amount (mg)	Xylooligosaccharide (mg)	Xylooligosaccharide contents (mg/g)	Content ratio to labeled amount (%) [80-120%]	
Sample 1 (175 mg/g)	50	8.8	165.9±1.0	95
	100	17.5	184.7±6.4	106
	200	35.0	187.3±1.9	107
	400	70.0	193.6±2.3	111
	800	140.0	194.2±5.2	111
Sample 2 (583 mg/g)	50	29.2	587.7±0.6	101
	100	58.3	632.2±0.2	108
	200	116.6	623.3±1.6	107
	400	233.2	613.6±0.1	105
	800	466.4	612.0±0.8	105

400, 800 mg으로 시험을 진행한 결과, 최소함량을 갖는 검체는 400 mg 이상, 최대함량을 갖는 검체는 200 mg 이상 시료를 채취하여야 '가수분해 전' 시험용액의 시험농도가 표준용액의 직선성을 확인하였다. 액상 제형도 동일한 방법으로 진행하여 시료 채취량을 2.5, 5, 10, 20, 40 g으로

설정하여 비교·분석한 결과, 20 g으로 하였을 때 함량이 가장 높게 분석됨을 확인하였다. 이에 따라 제형 구분 없이 자일로올리고당으로서 70 mg 이상 시료를 채취할 경우 분석에 적합하다고 판단되어 시료 채취량으로 설정하였다(Table 5,6).

Table 6. Comparison of analysis results (xylooligosaccharide in liquid formulations) by pre-treatment conditions (sample amount)

Sample amount (g)	Xylooligosaccharide (mg)	Xylooligosaccharide contents (mg/g)	Content ratio to labeled amount (%) [80-120%]
Sample 1 (4.9 mg/g)	2.5	12.3	4.2±0.8
	5	24.5	4.5±1.0
	10	49.0	4.4±3.3
	20	98.0	4.7±0.2
	40	196.0	4.7±0.6
Sample 2 (6.3 mg/g)	2.5	15.8	6.7±1.4
	5	31.5	6.5±1.2
	10	63.0	6.5±0.4
	20	126.0	6.4±0.7
	40	252.0	6.3±0.1

표준화 시험법 마련

자일로올리고당 시험법 마련을 위해 식품공전, 개별인정형 원료 및 최근 문헌의 시험법을 검토하고, 정확한 자일로올리고당 함량 분석을 위해 HPLC-UVD를 이용한 시험법을 검토하였다. 검토 결과 자일로올리고당의 ‘가수분해

전’ 자일로스 피크가 분리되지 않는 것을 확인하였다. 피크 분리를 위해 이동상에 산을 첨가하여 기존 pH 7.5에서 pH 6.0으로 조절하여 칼럼의 머무름시간을 길게 하였고 이동상 농도를 10 mM에서 20 mM로 조절하여 피크가 완전히 분리되는 것을 확인하였다. 최적의 시험법을 마련하

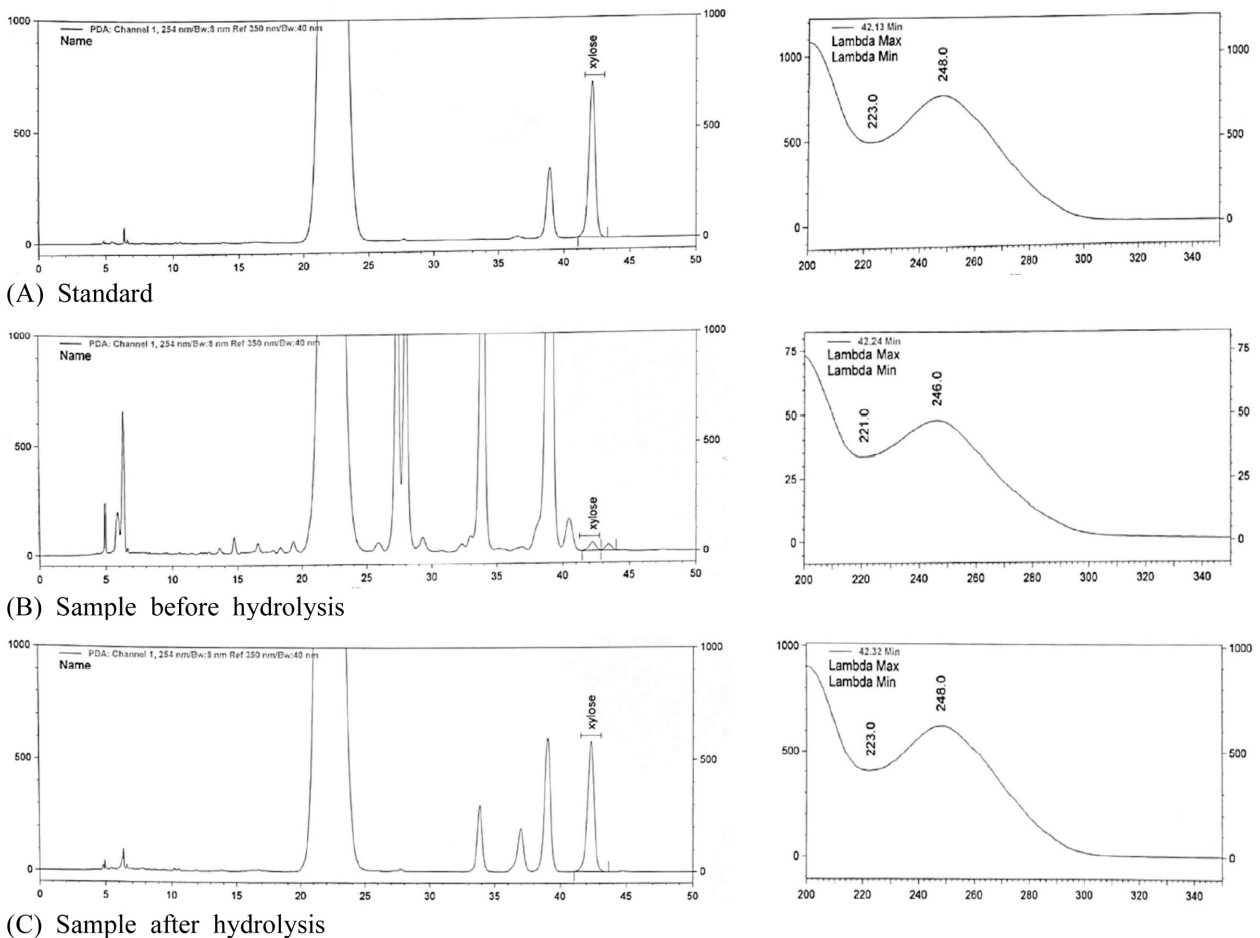


Fig. 4. HPLC chromatograms and spectrums of Xylose in (A) standard, (B) sample before hydrolysis, and (C) sample after hydrolysis.

기 위해 시료 채취량, 초음파 추출 시간, 가수분해 조건(온도, 시간, 산 농도)을 비교 검토하여 최적의 전처리법을 개선했으므로 표준화된 시험법을 마련하였다.

시험법 검증

특이성

특이성을 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액에서 분리도 및 머무름시간을 확인하였다. Fig. 4는 표준품과 시료를 분석한 크로마토그램이며 동일한 위치에서 단일 피크가 형성되는지 확인하였다. 그 결과, 표준용액과 가수분해 전, 후 시험용액에서 자일로스의 머무름시간 42.5분에서 일치함을 확인할 수 있었다. 또한, 분리된 피크 정점에서 PDA 스펙트럼은 표준물질과 시료의 패턴이 일치함을 확인할 수 있었다.

직선성

시료에서 자일로스가 검출되는 농도 범위를 중간값으로 설정하여 총 7개의 농도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL에 대한 직선성을 검토하였다. 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위해 각 농도에 대해 3 반복 시험을 수행한 결과, 검

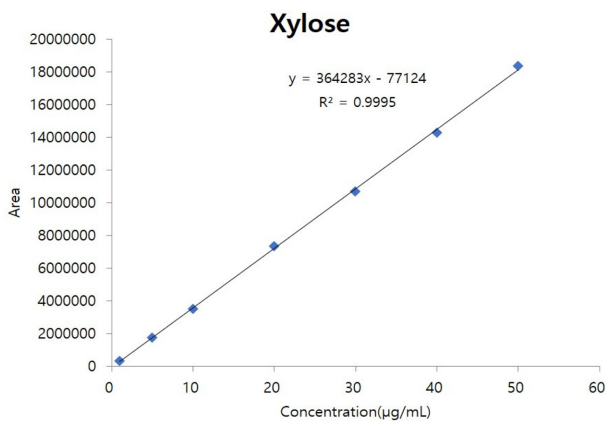


Fig. 5. Calibration curve of xylose.

량선 상관계수(R²) 0.999 이상의 높은 직선성을 보였다(Fig. 5). 또한, 표준용액을 3회 분석한 검량선을 이용하여 자일로스의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 분석한 결과, 검출한계는 0.77 µg/mL이며, 정량한계는 2.35 µg/mL로 나타났다.

정확도

자일로올리고당을 함유하지 않은 공시료에 대하여 각각 다른 농도를 spiking/recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다. 표준물질 첨가법에 따라 공시료에 대하여 일정량의 시료를 채취하고 표준용액을 첨가하였을 때 자일로스 최종 농도 10, 20, 30 µg/mL이 되도록 하였다. 그 결과, 자일로스의 회수율은 97.8-100.0%로 나타났으며, 상대표준편차는 0.9-1.1%임을 확인하였다(Table 7).

정밀도

시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본 시료를 선정하였으며, 각각 시료량으로서 200, 400, 600 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. 그 결과, 자일로올리고당 함량은 339.3, 319.6, 323.7 mg/g으로 나타났으며, 상대표준편차는 각각 0.9, 1.0, 1.2%임을 확인하였다(Table 8).

실험실 간 정밀도(재현성, reproducibility)를 확인하기 위

Table 7. Accuracy of analysis method for xylose (n=3)

Treatment	Spiked concentration (µg/mL)		
	10	20	30
1	9.9	19.8	29.6
2	9.7	20.1	29.3
3	9.8	20.1	29.1
Measured mean (µg/mL)	9.8	20.0	29.3
%RSD	1.1	0.9	0.9
Recovery mean (%)	98.0	100	97.8

Table 8. Repeatability and reproducibility of analysis method for xylooligosaccharide (n=5)

Treatments	Sample contents (mg)			Laboratory		
	200	400	600	A	B	C
1	334.5	318.9	317.3	318.9	300.1	309.2
2	338.9	324.4	325.0	324.4	290.5	308.3
3	342.5	315.7	326.7	315.7	293.8	311.1
4	339.0	321.0	323.3	321.0	298.1	308.4
5	341.8	317.8	326.4	317.8	289.9	307.1
Measured mean (mg/g)	339.3	319.6	323.7	-	307.6	-
SD	3.1	3.3	3.8	-	11.1	-
%RSD	0.9	1.0	1.2	-	3.6	-

하여 1개의 표본 시료를 선정하여 세 실험실에서 각각 5회 반복 측정했다. 재현성의 상대표준편차를 확인한 결과, 3.6%로 나타났다(Table 8).

유통제품 및 시제품 적용성 검토

수거한 건강기능식품에 대하여 마련된 자일로올리고당 시험법을 이용하여 지표성분의 함량에 대해 적용성 검토를 수행하였다. 총 27건의 유통제품에서 표시 함량 대비 88-118%로 적합함을 확인하였다(data not showed). 또한, 마련된 시험법을 이용하여 당질, 지방질, 단백질을 부원료로 시제품을 제조하여 지표성분 함량에 대하여 적용성 검토를 수행하였다. 원료 특성상 시제품 제조가 가능한 제형은 단백질과 당질 각각 정 제형 1종류였다. 각각의 자일로올리고당 함량은 250.0 mg/mL로 제조하였으며, 총 2개의 시료에 대한 자일로올리고당 함량을 분석한 결과, 표시 함량 대비 95-99%로 적합하였다(data not showed).

Acknowledgement

본 연구는 2021년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(21161미래식044)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문 요약

본 연구는 자일로올리고당의 과학적이고 체계적인 표준화된 시험법을 마련하여 다양한 제형의 제품에 적용하고자 하였다. 최적화된 시험법을 마련하기 위해 초음파 처리 시간, 산 가수분해 시간 및 농도를 검토하여 전처리 방법을 비교 평가하였으며, HPLC-UVD를 이용하여 시료 중의 자일로올리고당을 분석하였다. 분석 시 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline (PMP)으로 유도체화하고, photo diode array (PDA)가 장착된 high performance liquid chromatography (HPLC) (Nanospace SI-2)를 사용하였으며, 컬럼은 Cadenza C₁₈ (4.6 × 250 mm, 3 μm)이었으며, 이동상은 pH를 6.0으로 맞추는 20 mM 인산완충용액과 아세트니트릴을 78:22 비율로 혼합하여 사용하였고, 0.5 mL/min 유속으로 254 nm로 하여 분석하였다. 건강기능식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인에 따라 밸리데이션을 수행하고, 표준화된 시험법을 이용하여 유통 중인 건강기능식품 대상 품목에 대해 시험법 적용 여부를 확인하였다. 표준화된 시험법은 자일로올리고당을 함유한 건강기능식품 품질 관리에 대한 신뢰성을 더 높일 것으로 본다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Se-Yun Lee	https://orcid.org/0009-0000-9303-889X
Hee-Sun Jeong	https://orcid.org/0000-0001-7590-6649
Kyu-Heon Kim	https://orcid.org/0009-0002-8687-2442
Mi-Young Lee	https://orcid.org/0009-0005-4222-8366
Jung-Ho Choi	https://orcid.org/0009-0003-6168-926X
Jeong-Sun Ahn	https://orcid.org/0000-0003-0129-0567
Kwang-Il Kwon	https://orcid.org/0000-0002-5958-3752
Hye-Young Lee	https://orcid.org/0009-0005-6831-6743

References

1. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2023. Health functional food code (2023-50), Cheongju, Korea.
2. Gupta, P., Agarwal, P., Hegde, P.A., A review on xylooligosaccharides. *Int. Res. J. Pharm.*, **3**, 71-74 (2012).
3. Kyung, M.O., Choe, H.S., Jung, S.W., Lee, K.S., Jo, S.E., Seo, S.W., Choe, K.B., Yang, C.K., Yoo, S.H., Kim, Y.R., Effect of xylooligosaccharide-sugar mixture on glycemic index (GI) and blood glucose response in healthy adults. *J. Nutr. Health*, **47**, 229-235 (2014).
4. Nam, H.K., Kyung, M.O., Seo, S.W., Jung, S.W., Chang, M.J., Effect of different levels of xylooligosaccharide in sugar on glycemic index and blood glucose response in healthy adults. *J. Nutr. Health*, **48**, 398-406 (2015).
5. Carvalho, A., Neto, P., Silva, D., Pastore, G., Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.*, **51**, 75-85 (2013).
6. Singh, R., Banerjee, J., Arora, A., Prebiotic potential of oligosaccharides: a focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.*, **5**, 19-30 (2015).
7. Mandelli, F., Brenelli, L.B., Almeida, R.F., Goldbeck, R., Wolf, L.D., Hoffmam, Z.B., Ruller, R., Rocha, G.J.M., Mercadante, A.Z., Squina, F.M., Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. *Ind. Crops Prod.*, **52**, 770-775 (2014).
8. George, W.L. Jr., 2016. Appendix K: guidelines for dietary supplements and botanicals. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 20th ed, Rockville, MD, USA, pp. 1-32.
9. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2009. Certificate of functional ingredient: xylooligosaccharide powder (No. 2009-80), Cheongju, Korea.
10. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2009. Certificate of functional ingredient: xylooligosaccharide liquid (No. 2009-81), Cheongju, Korea.
11. George, W.L. Jr., 2016. Arabinose, galactose, and xylose and other sugar in sugars and syrups. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 20th ed, Rockville, MD, USA, pp. 44.1.28.
12. United States Pharmacopeial Convention, (2023, August 3).

- Xylose. Retrieved from https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-68BDA798-EB8A-400C-97CD-A1F359F9D805_5_en-US.
13. Yohei, Y., Hideki, K., Yasunori, K., Wataru, S., Yuya, K., Hajime, Y., Takao, O., Enzymatic production of xylooligosaccharides from red alga dulse (*Palmaria* sp.) wasted in Japan. *Process Biochem.*, **82**, 117-122 (2019).
 14. Chuannan, L., Jingjing, C., Hailong, L., Jian, L., Lihui, G., Bin Z., Minnan, L., Improvement in xylooligosaccharides production by knockout of the β -*xyl1* gene in *Trichoderma orientalis* EU7-22. *Biotech*, **3**, 8-26 (2018).
 15. Morgan, N.K., Wallace, A., Bedford, M.R., Choct, M., Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydr. Polym.*, **167**, 290-296 (2017).
 16. Pu, J., Zhao, X., Wang, Q., Wang, Y., Zhou, H., Development and validation of a HPLC method for determination of degree of polymerization of xylo-oligosaccharides. *Food Chem.*, **213**, 654-659 (2016).