

UHPLC를 이용한 로얄제리의 10-HDA 분석법 개발

김세건 · 정현주¹ · 여주홍 · 홍인표 · 우순옥 · 장혜리 · 한상미*

농촌진흥청 국립농업과학원, ¹원광대학교 한약학과

New Analytical method for 10-HDA in Royal Jelly using UHPLC

Se-Gun Kim, Hyun-Ju Jung¹, Joo-Hong Yeo, In-Pyo Hong, Soon-Ok Woo, Hye-Ri Jang and Sang-Mi Han*

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea

¹Department of Oriental Pharmacy Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Received 2 October 2014; Revised 24 October 2014; Accepted 2 November 2014)

Abstract

The objective of this study was to develop a new quantitative analytical method for 10-HDA in raw royal jelly by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). Analytical method was optimized using ACN/0.1% H₃PO₄ solvent system for 5 min in C18 column (2.1 × 50mm, 1.8μm). Method validation for 10-HDA was evaluated by linearity, precision (intra- and inter-day), accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The marker compound, 10-HDA showed good linearity (R²=1.000) in the range of 5.0-300.0μg/mL. The LOD and LOQ were 0.24 and 0.74μg/mL, respectively. The relative standard deviation (RSD) of precision variability and accuracy were less than 4%. The results showed that the developed UHPLC method was simple, rapid, accurate and reliable for quality assessment of raw royal jelly

Key words: Royal jelly, 10-HDA, UHPLC, Method validation

서 론

천연물은 예로부터 질병치료와 건강증진을 목적으로 사용해 왔으며, 최근에는 체지방감소, 혈당조절, 혈행개선, 혈중중성지방감소, 피부개선 등에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Sung *et al.*, 2014). 부작용이 적으면서도 높은 효능을 나타내는 동시에 장기간 복용도 가능하기 때문에 천연물을 원료로 한 기능성 식

품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 로얄제리는 꿀벌의 인두선으로부터 분비되는 물질로서 왕유라고도 하며 여왕벌은 평생동안 로얄제리만 섭취하여 일벌의 40배가 넘는 수명을 가지는 것으로 알려져 있다(Viuda-Martos *et al.*, 2008). 우리나라에는 1900년경에 양봉이 도입된 이래 1960년대 후반부터 로얄제리를 생산하기 시작하였고 항염, 항암, 항산화, 항당뇨, 미백 효과 등 다양한 약리활성을 갖는 것으로 보고

*Corresponding author. E-mail: sangmih@korea.kr

되었다(Kim *et al.*, 2014; Nakaya *et al.*, 2007; Azab *et al.*, 2011; Pourmoradian *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014). 로얄제리의 구성성분으로는 수분, 단백질, 당, 지방산, 아미노산, 비타민, 미네랄 등이 있으며 특히 지방산인 10-hydroxy-2-decenoic acid(10-HDA)는 생로얄제리 및 로얄제리 건조물의 주 생리활성 물질로서 로얄제리 분석의 지표물질로 이용되고 있다(식품의약품안전처, 2014). 로얄제리 내 10-HDA의 분석은 일반적으로 HPLC에 의한 분석이 대부분이며 GC를 사용하여 분석한 연구도 보고되었다(Zhou *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2014). 최근에는 분석기기의 발달로 HPLC의 단점을 보완하여 Ultra high performance liquid chromatography(UHPLC)가 개발되었다. UHPLC는 2 μ m 정도의 작은 입자가 충전된 컬럼을 사용하여 5 μ m 컬럼을 주로 사용하는 HPLC보다 3배 높은 효율성과 70% 이상 높은 분리능을 가지고 있을 뿐만 아니라 2배 넘는 고압조건에서 분석이 가능하여 분석소요시간의 감소, 고감도, 높은 분리능, 시료소비량의 감소의 장점을 가지고 있다(Kumar *et al.*, 2012). 이에 본 연구에서는 UHPLC를 이용하여 로얄제리 내 10-HDA의 기존 HPLC 분석방법보다 신속하고 정확한 분석법을 개발하고자 하였으며, 분석방법의 타당성을 입증하는 동시에 지역별로 채집된 로얄제리에 확립된 분석법을 적용하여 함량평가를 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 로얄제리는 경기도 안성, 강원도 철원, 경상남도 진주에서 꿀벌(*Apis mellifera*)로부터 2013년 6월에서 7월 사이에 채집한 것을 구입하여 사용하였으며, acetonitrile, methanol, water는 Burdik & Jackson(Muskegon, MI, USA)사의 HPLC등급으로 사용하였다. 지표성분으로 사용된 10-HDA는 Nacalaitesque(Kyoto, Japan)사에서 구입하였으며, 내부 표준품 hesperidin은 식품의약품안전처(Cheongju, Korea)에서 구입하였다.

로얄제리 및 표준품의 전처리

로얄제리를 용량플라스크에 넣은 후 메탄올을 사용하여 5mg/mL의 농도가 되도록 만들고 40°C에서 30분간 초음파 추출기를 사용하여 추출한 후 0.2 μ m 필터를 사용하여 여과하였다. 표준품 10-HDA(1mg/mL)는 메탄올을 이용하여 로얄제리 전처리법과 동일하게 실시하였으며, 이때 내부표준품 heperidin의 농도는 30 μ g/mL이 되도록 하였다. 시료 및 표준용액은 실험 전까지 4°C 냉장고에 보관하였다.

분석기기 및 조건

정량분석에 사용된 기기는 Agilent(Santa clara, CA, USA)사의 auto sampler, column oven, binary pump, diode array detector가 장착된 1290 infinity모델을 이용하였으며 Agilent사의 Zorbax Eclipse Plus C18(2.1 \times 50mm, 1.8 μ m) 컬럼을 장착하여 유속 1.0mL/min, 주입량 1 μ L, 컬럼온도 40°C, 검출과장 210nm로 설정하였고, 이동상은 (A) acetonitrile과 (B) 0.1% H₃PO₄ 사용하여 (A) 13~20% 기울기 조건에서 5분동안 분석하였다.

분석법의 검증

로얄제리 내 10-HDA에 대한 UHPLC 분석법의 타당성을 검증하기 위하여 International Conference on Harmonization (ICH) 가이드라인에 따라 밸리데이션 파라미터인 직선성, 정밀성, 정확성(회수율), 검출한계, 정량한계 등을 평가하였다(International conference of harmonization, 1995; 1997).

직선성평가

지표성분의 각 농도에 대한 유의성 확인과 검량선을 작성하기 위하여 지표성분을 methanol를 사용하여 5가지 농도로 단계 희석하였다. 작성된 검량선으로부터 산출된 회귀방정식은 $y=ax+b$ (a : 직선식의 기울기, x : 시료의 농도, y : 피크의 면적)의 일차방정식으로 나타냈으며 상관계수(R^2)를 확인하여 직선성(linearity)을 평가하였다.

검출한계 및 정량한계의 측정

분석물질의 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 검량선에 근거하여 검출한계=3.3×σ/S, 정량한계=10×σ/S (σ: 회귀직선의 y절편 표준편차, S: 검량선의 기울기)의 식에 의해 산출하였다.

정밀성평가

분석시간 변동에 따른 분석물질의 함량변화를 알아보기 위하여 직선성이 확인된 3가지 농도에 대해서 intra-day variability를 3회씩 반복하여 측정하였고, inter-day variability는 실험시작일로부터 48시간, 96시간 후에 각 농도에 대하여 3회 반복하여 측정하였다. 분석 결과는 상대표준편차(RSD) 값으로 나타내어 분석물질의 정밀성(precision)을 평가하였다.

정확성평가

직선성의 범위 내에 이미 알고 있는 3가지 농도를 로얄제리 시료에 첨가하여 3회 반복 측정한 후 평가하였으며, 측정된 결과는 표준용액의 양과 비교하여 정확성(accuracy)의 지표인 회수율(recovery)로 나타내었다.

결과 및 고찰

분석조건 최적화

경기도 안성에서 생산된 로얄제리를 표준으로 하여 UHPLC를 이용한 로얄제리 내 10-HDA의 새로운 분석법을 개발하고자 2.7μm RP-amide 및 1.8 μm C18 컬럼 등과 이동상의 용매 조성비 변화, 컬럼의 온도 변화를 주어 분석조건을 검토하였다. 그 결과, acetonitrile과 0.1%H₃PO₄를 이용한 기울기 조건, 컬럼 온도 40°C, 1.8 μm C18 컬럼을 사용하였을 때, 10-HDA의 머무름 시간은 2.11분이었으며, 1.83분과 2.44분에 검출되는 피크와의 분리도는 4.0정도로 높은 분리능을 가지는 것으로 확인되었다. 또한 로얄제리 내 검출된 지표성분의 피크와 표준용액의 피크 UV 흡수파장

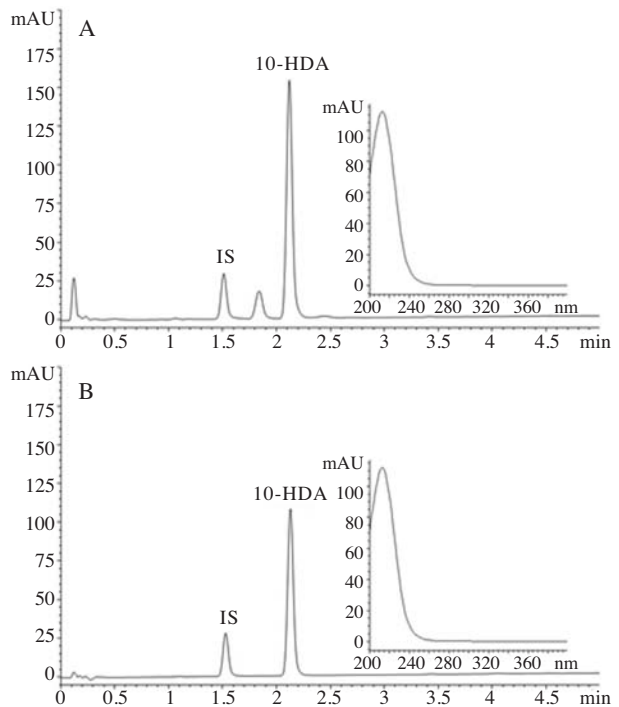


Fig. 1. UHPLC chromatograms of raw royal jelly (A, 5mg/mL) and 10-HDA (B, 100μg/mL) at 210nm. IS: internal standard (hesperidin 30μg/mL).

이 일치하여 피크의 순도 역시 양호하였다(Fig. 1).

현재 식품공전에 고시된 생로얄제리 및 로얄제리가공품에 대한 품질평가는 10-HDA를 지표성분으로 하여 HPLC 분석이 사용되는데, 이 분석법의 경우 10-HDA의 머무름 시간은 7-10분 사이이며, Kim 등(Kim and Lee, 2010)의 연구에서도 10-HDA의 검출시간은 7분 정도이다. 하지만 본 분석방법은 5분 정도 단축시켜 기존의 방법보다 신속하게 분석할 수 있는 것으로 확인되었다.

직선성, 검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOD)

10-HDA의 농도를 300, 100, 50, 10, 5μg/mL로 설정하여 UPHLC로 분석한 후 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선으로부터 산출된 회귀방정식(y=ax+b)은 Y=4.065x+5.152이었으며, correlation coefficient (R²)는 1.000으로 매우 양호한 양의 상관성을 보였다. 직선식의 기울기와 y절편의 표준편차를 이용하여 검출한계와 정량한계를 계산한 결과 각각 0.24μg/mL, 0.74μg/mL이었다(Table 1).

정밀성

분석환경 및 시간 변동에 따른 변화를 확인하기 위하여 10-HDA의 100, 50, 10 μ g/mL 농도에서 intra-day와 inter-day 정밀성은 RSD 5% 이내에서 평가되었다. 그 결과, intra-day 시험에서 0.27~0.91%의 RSD값을 나타내었고, inter-day 시험에서는 0.43~2.56%의 RSD값을 보였다(Table 2). 또한 로얄제리 시료를 6회 반복 측정하여 반복성(repeatability) 시험을 한 결과 0.26%의 RSD값으로 우수한 정밀성을 나타내었다(Table 3).

회수율

로얄제리 시료에 10-HDA 50, 25, 12.5 μ g/mL를 첨가하여 회수율 시험을 실시하였고 회수율 $\pm 10\%$ 이내에서 분석법의 정확성을 평가하였다. 그 결과 각 농도에 대한 회수율은 각각 98.1, 96.3, 94.2%로 $\pm 10\%$ 범위내로 나타났으며, 분석방법은 정확성을 가지는 것으로 확인되었다(Table 4).

함량평가

UHPLC를 사용하여 개발 및 검증된 분석법을 적용하여 경기도 안성, 강원도 철원, 경상남도 진주로부터 채집된 생로얄제리 내 10-HDA의 함량을 평가하였으며, 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 강원도 철원에서 채취된 로얄제리 내 10-HDA함량은 29.7 ± 0.3 mg/g으

로 경기도 안성과 경상남도 진주에서 채취된 로얄제리보다 각각 29%, 34% 높은 것으로 확인되었다. 현재 우리나라 식품공전에 고시된 생로얄제리 내 10-HDA 함량 기준은 1.6% 이상으로 분석한 모든 로얄제리는 기준보다 월등히 높았으며, EU규정인 1.8% 이상보다 더 높은 것으로 확인되었다. 개발된 분석법은 표준시료로 사용한 안성지역의 로얄제리 뿐만 아니라 타지역에서 채취된 로얄제리의 품질평가에 적용이 가능하였으며, 5분 내에 10-HDA를 신속하고 정확하게 분석할 수 있었다.

결론

로얄제리는 다양한 활성을 지닌 기능성 식품소재로서 활용되고 있으며 로얄제리의 품질은 10-HDA의 함량을 기준으로 평가된다. 본 연구에서는 HPLC를 이용한 기존의 분석법보다 신속하고 정확한 분석방법을 개발하기 위하여 UHPLC를 이용하였으며, 1.8 μ m C18 컬럼과 (A) acetonitrile과 (B) 0.1% H_3PO_4 의 기울기 조건(A: 13~20%, 0~5min)을 사용하여 10-HDA의 검출시간을 5분정도 단축하였다. 확립된 분석법은 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성, 정확성을 통하여 검증되었으며, 개발된 분석법을 안성, 철원, 진주로부터 생산된 로얄제리의 함량평가에 적용하여 10-HDA의 함량을 분석한 결과, 철원에서 생산된 로

Table 1 . Linearity regression, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for 10-HDA in raw royal jelly

Standard	Regression equation	R ²	LOD (μ g/mL)	LOQ (μ g/mL)
10-HDA	Y=4.065x+5.152	1.000	0.24	0.74

Table 2 . Precision result of Intra- and Inter-day variability of 10-HDA

Standard	Conc. (μ g/mL)	Intra day		Inter day	
		Mean \pm SD	RSD (%)	Mean \pm SD	RSD (%)
10-HDA	100	100.5 \pm 0.9	0.91	99.8 \pm 0.4	0.43
	50	49.9 \pm 0.1	0.27	50.3 \pm 0.6	1.10
	10	10.1 \pm 0.1	0.71	10.1 \pm 0.3	2.56

Conc.: concentration, SD: standard deviation, RSD: relative standard deviation.

Table 3 . Repeatability result for 10-HDA in raw royal jelly

Sample	Conc. (mg/mL)	Content of 10-HDA (mg/g)	RSD (%)
Royal jelly	5	23.0 \pm 0.1	0.26

This data was analyzed through sextuple experiments.

Table 4 . Recovery result of analytical method

Standard	Spiked amount (µg/mL)	Measured amount (µg/mL)	RSD (%)	Recovery ^a (%)
10-HDA	50.0	49.1 ± 0.3	0.5	98.1
	25.0	24.1 ± 0.9	3.9	96.3
	12.5	11.8 ± 0.1	0.7	94.2

^aRecovery(%)=[(amount found-original amount)/amount spiked] × 100.

Table 5. Content of 10-HDA in raw royal jelly collected from various countries

Sample	Conc. (mg/mL)	Content of 10-HDA (mg/g)	RSD (%)
Anseong	5	23.0 ± 0.1	0.26
Chulwon		29.7 ± 0.3	0.89
Jinju		22.1 ± 0.3	0.91

알제리에서 가장 높게 측정되었다. 본 연구결과를 통하여 개발된 다성분 동시분석법은 신속하고 정확하며 신뢰할 수 있는 방법으로 국내산 로얄제리의 품질 관리 및 품질평가에 사용되어질 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ00906602)에 의하여 수행되었으므로 감사드립니다.

인용문헌

식품의약품안전처. 2014. 29-24 로얄젤리가공식품. 식품공전.
 Azab, K.S., M. Bashandy, M. Salem, O. Ahmed, Z. Tawfik, H. Helal. 2011. Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats. *N. Am. J. Med. Sci.* 3: 268-276.
 Han, S.M., J.M. Kim, S.G. Kim, H.R. Jang, J.H. Yeo, I.P. Hong, S.O. Woo. 2014. Whitening Efficacy of Water Soluble Royal Jelly Removed Allergenic Protein. *Kor. J. Pharmacogn.* 45: 262-267.
 International conference of harmonization. 1995. Q2A: Text on validation of analytical procedures. US FDA Federal Register. 60: 11260-11266.
 International conference of harmonization. 1997. Q2B: Validation of analytical procedures methodology. US FDA federal register. 62: 27463-27467.
 Kim, J., J. Lee. 2010. Quantitative analysis of trans-10-hydroxy-

2-decenoic acid in royal jelly products purchased in USA by high performance liquid chromatography. *J. Apic. Sci.* 54: 77-84.
 Kim, K.P., H.O. Kwon, S.M. Han, J.M. Lee, Y.H. Cho. 2014. Inhibitory Effect of Korean Royal Jelly on Inflammatory Response in Lipopolysaccharide-Stimulated Peritoneal Macrophages. *J. Apic.* 29: 153-159.
 Kumar, A., G. Saini, A. Nair, R. Sharma. 2012. UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta. Pol. Pharm.* 69: 371-380.
 Nakaya, M., H. Onda, K. Sasaki, A. Yukiyooshi, H. Tachibana, K. Yamada. 2007. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 253-255.
 Pourmoradian, S., R. Mahdavi, M. Mobasseri, E. Faramarzi, M. Mobasseri. 2014. Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chin. J. Integr. Med.* 20: 347-352.
 Sung, M.S., H.Y. Jung, J.H. Choi, S.C. Lee, B.H. Choi, S.S. Park. 2014. Preparation of Functional Healthy Drinks by *Acanthopanax senticosus* Extracts. *J. Life. Sci.* 24: 959-966.
 Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez, J.A. Perez-Alvarez. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food. Sci.* 73: 117-124.
 Zhou, J., X. Xue, Y. Li, J. Zhang, J. Zhao. 2007. Optimized determination method for trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in royal jelly by high-performance liquid chromatography with an internal standard. *J. AOAC Int.* 90: 244-249.
 Zhou, J., Y. Qi, H. Wu, Q. Diao, F. Tian, Y. Li. 2014. Simultaneous determination of trace migration of phthalate esters in honey and royal jelly by GC-MS. *J. Sep. Sci.* 37: 650-657.