

## 국산 아카시아꿀 내 Abscisic acid의 UPLC 정량분석법 개발

김세건 · 우순옥 · 장혜리 · 최홍민 · 문효정 · 한상미\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

## Development of Quantitative Analysis for Abscisic Acid in Korean Acacia Honey by UPLC

Se Gun Kim, Soon Ok Woo, Hye Ri Jang, Hong Min Choi, Hyo Jung Moon and  
Sang Mi Han\*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences,  
Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

(Received 30 August 2018; Revised 27 September 2018; Accepted 27 September 2018)

### Abstract

Acacia honey, which was collected from nectar of *Robinia pseudoacacia* by honeybee, is produced more than any other honey in Korea. It is known to have antibacterial activity against *Helicobacter pylori* that induced gastric disease. In present study, quantitative analysis for abscisic acid which was reported as anti-*H. pylori* compound in acacia honey was developed and validated by UPLC-DAD. The UPLC method was established using Halo C18 column (2.1 × 100mm, 2μm) that eluted gradient system by acetonitrile and 0.1% phosphoric acid at 263nm of detection wavelength. The method was completely validated by specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. Also, the established UPLC method was possible to quantitative analysis for abscisic acid in Korean acacia honeys collected from 8 different areas. These results suggest that the developed UPLC method could be sufficiently applied for quality evaluation of Korean acacia honeys.

Key words: Acacia honey, *Robinia pseudoacacia*, Abscisic acid, UPLC method

### 서 론

꿀벌이 생산하는 벌꿀, 프로폴리스, 로얄젤리, 화분, 봉독 등의 양봉산물은 식품, 의약품, 화장품 등 다양한 소재로 활용되고 있다(Bogdanov *et al.*, 2008). 특히

벌꿀은 인류가 오래전부터 사용한 천연 감미료이자 국내 양봉산업에서 약 80%정도 차지하는 국내 양봉 농가의 주요 소득원으로 알려져 있다. 벌꿀의 구성성분으로는 당류(포도당, 과당 등) 및 수분이 80%이상 차지하고 이외에 플라보노이드를 포함한 페놀성 화

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

합물 등 밀원식물 유래 2차 대사산물, 단백질, 비타민, 미네랄 등이 미량으로 함유되어 있다(Chang *et al.*, 1988; Can *et al.*, 2015). 벌꿀의 생리활성으로는 항산화 효과(Shen *et al.*, 2015) 및 항균 효과(Deng *et al.*, 2018)가 대표적으로 알려져 있으며, 최근에는 설치류를 이용한 *in vivo*에서 간보호 효과(Zhao *et al.*, 2018)가 보고되었다. 벌꿀은 밀원식물에 따라 아카시아꿀, 밤꿀, 피나무꿀, 잡화꿀 등으로 분류되며, 벌꿀의 품질은 Codex 및 식품공전에 고시된 수분, 전화당, 자당, 산도, 이성화당 등의 항목을 분석하여 평가되고 있다(Codex, 2001; KFSA, 2016). 하지만 *Leptospermum scoparium* 유래 마누카꿀과 같이 항균효과를 가지는 생리활성물질(methylglyoxal)을 규명(Alvarez-Suarez *et al.*, 2014)하는 등 해외에서는 순수 밀원 벌꿀에 대한 성분 연구 및 생리활성 검증을 통하여 품질평가 기준을 마련하고 있으나, 국내에서는 순수 밀원 벌꿀에 대한 성분연구는 미진한 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내 벌꿀 생산량의 70% 이상을 차지하고 맛과 향기가 우수하여 국내 소비자가 가장 선호하며, 위궤양 등 위장질환 유발균 *Helicobacter pylori*에 대하여 항균활성(Kim *et al.*, 2017)을 가지는 국산 아카시아꿀을 이용하여 국산 아카시아꿀 내 항헬리코박터균 활성 물질로 알려진 abscisic acid를 지표로 UPLC(ultra performance liquid chromatography) 품질평가법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

분석에 사용한 methanol 및 acetonitrile(Honeywell, Morris plains, NJ, USA)은 HPLC grade를 사용하였으며, 표준품은 이전의 연구(Kim *et al.*, 2015)에서 분리된 abscisic acid( $\geq 95.0\%$ )을 사용하였다.

### 실험재료

2015~2017년도에 우리나라의 8개 지역(강원도, 경기도, 충청북도, 충청남도, 경상북도, 경상남도, 전라남도, 전라북도)에서 서양종꿀벌(*Apis mellifera*)로부

터 생산된 국산 아카시아꿀을 양봉농가로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### 시료 전처리 및 UPLC 분석조건

우리나라 8개 지역에서 수집한 아카시아꿀에 methanol을 넣어 0.5g/mL로 만들고 초음파 추출기를 이용하여 30분 동안 추출한 후 0.2 $\mu$ m 멤브레인 필터로 여과한 다음 분석에 사용하였다. 표준품 abscisic acid는 1mg/mL로 만들어 시료 전처리법과 동일하게 실시하였으며 4°C 냉장고에 보관하여 분석 직전에 희석하여 사용하였다. 국산 아카시아꿀 내 abscisic acid의 분석은 photodiode array detector, binary pump, auto sampler가 장착된 Waters(Minneapolis, MN, USA) ACQUITY UPLC I-Class를 사용하였으며 UPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

### 분석법 밸리데이션

국산 아카시아꿀 내 abscisic acid UPLC 정량분석법은 식품의약품안전처의 “의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인”에 따라 특이성(specificity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision) 및 정확성(accuracy)을 평가하여 검증하였다. 특이성은 시료 내 표준품과 동일한 시간에 검출되는 피크의 UV 스펙트럼을 추출하여 일치여부로 확인하였으며, 직선성은 표준품의 1-100 $\mu$ g/mL에서 5개 구간을 분석하여 검량선을 작성한 다음 상관계수( $R^2 \geq 0.99$ )로 평가하였다. 검출한계와 정량한계는 신호(signal)대 잡음(noise)비가 각각 3.3:1과 10:1일 때의 농도로 계산하였다. 정밀성은 시료의 3가지 농도에 대하여 6회 연속적으로 분석하였을 때의 반복성(repeatability)과 표준품의 3가지 농도에서 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 변화를 측정하여 상대표준편차(relative standard deviation, RSD) 10% 이내에서 평가하였다. 정확성은 시료에 3가지 농도의 표준용액을 첨가하여  $\pm 15\%$  범위의 회수율(recovery)로 평가하였다.

**Table 1.** UPLC conditions for abscisic acid in Korean acacia honey

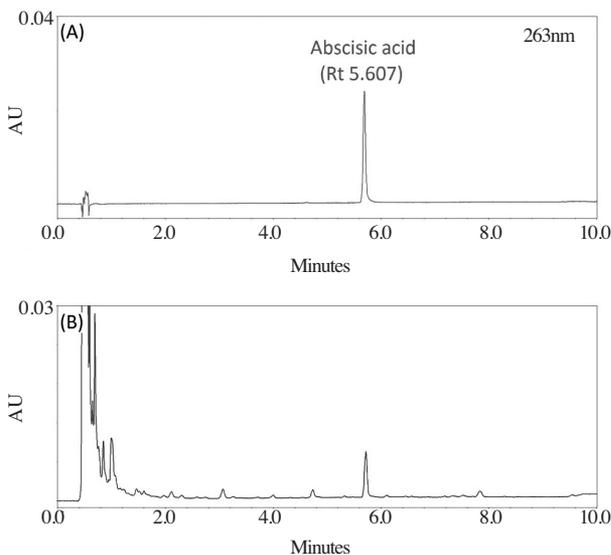
Item	Chromatographic condition		
Column	Halo C18 (2.1 × 100mm, 2µm, Advanced Materials Technology, Wilmington, DE, USA)		
Temperature	40°C		
Flow rate	0.4mL/min		
Injection volume	2µl		
Wavelength	263nm		
Mobile phase	Time (min)	MeCN	0.1% $H_3PO_4/H_2O$
	0	15	85
	2	15	85
	10	35	65

## 결과 및 고찰

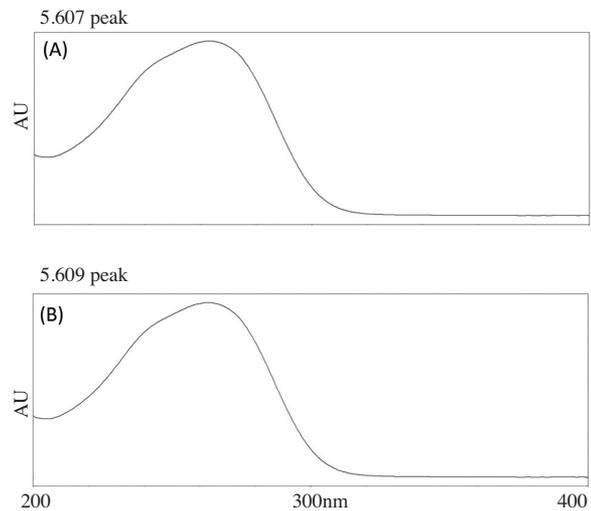
### 분석법 최적화

국산 아카시아꿀의 밀원유래 성분이자 *H. pylori*에 대한 항균활성을 가지는 abscisic acid을 생리활성 지표물질로 설정하여 신속하고 정확한 UPLC 분석법을 최적화하고자 하였다. Abscisic acid와 인접한 피크의 분리도를 증가시키기 위하여 고정상이 서로 다른 RP-amide, C18, Phenyl-Hexyl 컬럼, 이동상의 pH 및 컬럼 온도 변화를 주어 이상적인 분석조건을 탐색하였다. 그 결과, C18(2.1 × 100mm, 2µm) 컬럼에 이동상을 MeCN과 0.1% $H_3PO_4$ 를 사용하고 컬럼온도를 40°C를

설정하였을 때, 국산 아카시아꿀 내 abscisic acid의 피크는 인접한 피크와 2.0이상의 분리도를 보였으며 머무름 시간(retention time, Rt)은 5.607분으로 6분이내 분석이 가능하였다(Fig. 1). 검출파장은 abscisic acid의 UV 스펙트럼(200~400nm)을 추출하여 강한 흡수를 보이는 263nm로 설정하였다. 본 UPLC 분석법은 고압력의 펌프와 HPLC에 사용하는 컬럼보다 상대적으로 충전제 입자가 작은 컬럼을 사용하여 Yao 등(2003)이 보고한 마누카꿀에서 abscisic acid의 HPLC분석보다 5분정도 빠르게 검출이 가능하였으며, abscisic acid의 peak tailing 및 peak resolution을 증가시켜 기존의 HPLC 분석법보다 신속하고 효율적이었다.



**Fig. 1.** UPLC chromatograms of (A) abscisic acid and (B) Korean acacia honey at 263nm.



**Fig. 2.** Comparison of UV spectrum of (A) standard and (B) acacia honey for specificity of the UPLC method.

**Table 2.** Linearity regression, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for abscisic acid in Korean acacia honey

Standard	Regression equation	R <sup>2</sup>	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Abscisic acid	Y=18512x-12323	0.9999	0.01	0.04

R<sup>2</sup>: correlation coefficient.**Table 3.** Precision result of intra- and inter-day variability for abscisic acid

Standard	Conc. (µg/mL)	Intra day		Inter day	
		Mean ± SD	RSD (%)	Mean ± SD	RSD (%)
Abscisic acid	5	5.22 ± 0.20	3.38	5.08 ± 0.02	0.40
	10	9.90 ± 0.19	1.92	9.58 ± 0.10	1.00
	50	50.30 ± 1.10	2.18	49.64 ± 0.06	0.13

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

**Table 4.** Repeatability result of abscisic acid in Korean acacia honey

Sample	Conc. (g/mL)	Content of abscisic acid (mg/kg)	RSD (%)
Acacia honey	0.25	25.1 ± 0.13	0.52
	0.50	25.1 ± 0.08	0.32
	1.00	25.1 ± 0.15	0.60

This data was analyzed through sextuple experiments. Conc.: concentration, RSD: relative standard deviation.

**Table 5.** Recovery result of the analytical method

Standard	Spiked (µg/mL)	Found (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Abscisic acid	5	4.88 ± 0.22	98.1	4.48
	10	9.94 ± 0.05	96.3	0.53
	20	19.65 ± 0.21	94.2	1.06

RSD: relative standard deviation.

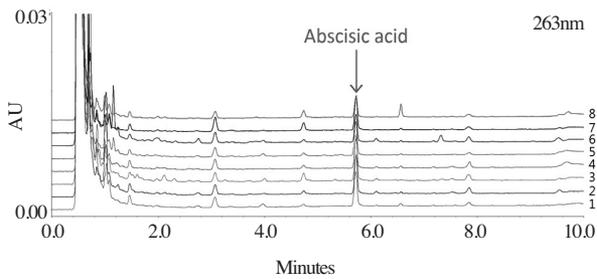
**Table 6.** Content of abscisic acid in acacia honeys collected from different regions in Korea

Sample	Collecting area	Content (mg/kg)
Acacia honey	Gangwon, Cheorwon	21.2 ± 0.12
	Gyeonggi, Siheung	15.9 ± 0.06
	Chngbuk, Goesan	45.7 ± 0.21
	Chungnam, Cheongyang	17.9 ± 0.23
	Jeonbuk, Iksan	12.5 ± 0.01
	Jeonnam, Haenam	25.1 ± 0.08
	Gyeongbuk, Yeongju	23.1 ± 0.09
	Gyungnam, Changnyeong	28.3 ± 0.30

### 분석법 밸리데이션

국산 아카시아꿀의 품질평가를 위한 UPLC 분석법의 타당성을 검증하기 위하여 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성, 정확성을 평가하였다. 국산 아카시아꿀의 생리활성 지표물질 abscisic acid의 분리

특이성은 표준품과 아카시아꿀의 UPLC 크로마토그램에서 동일한 머무름 시간에 검출되는 피크의 UV 스펙트럼 일치여부로 평가한다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 표준품과 시료 내 동일한 머무름 시간을 가지는 피크와 200~400nm에서 동일한 패턴을 나타내었으며 피크의 순도는 양호하여 분석방법의 분리 특이성을



**Fig. 3.** UPLC chromatograms of Korean acacia honeys collected from different areas. 1: Gangwon, Cheorwon; 2: Gyeonggi, Siheung; 3: Chngbuk, Goesan; 4: Chungnam, Cheongyang; 5: Jeonbuk, Iksan; 6: Jeonnam, Haenam; 7: Gyeongbuk, Yeongju; 8: Gyeongnam, Changnyeong.

확인하였다. 직선성은 1, 5, 10, 50, 100 $\mu$ g/mL의 5가지 농도를 사용하여 UPLC 분석조건으로 측정된 결과, 검량선의 상관계수는 0.9999이상으로 양호한 직선성과 정량할 수 있는 회귀방정식( $Y=18512x-12323$ )을 작성할 수 있었다(Table 2). Abscisic acid의 검출한계 및 정량한계는 0.01 $\mu$ g/mL과 0.04 $\mu$ g/mL로 미량의 성분도 검출 및 정량이 가능하였다(Table 2). 분석 시간 변동에 따른 분석시료의 함량변화를 확인하기 위하여 5, 10, 50 $\mu$ g/mL 3가지 농도에 대한 일내 정밀도 및 일간 정밀도를 측정된 결과, 일내 정밀성은 상대표준편차(RSD) 1.92~3.83%이었으며, 일간 정밀성은 상대표준편차 0.13~0.40%로 상대표준편차 5%이내의 우수한 정밀성 가지는 것으로 확인되었다(Table 3). 또한 분석 조건의 정밀성 평가 항목인 반복성에서는 국산 아카시아꿀을 0.25, 0.5, 1.0g/mL 3가지 농도에서 6회 반복 측정하였을 때, 상대표준편차 1% 미만이었다(Table 4). 분석조건의 정확성은 지표성분의 회수율을 측정하여 평가하였다. 전남지역에서 수집한 국산 아카시아꿀 0.5g/mL에 abscisic acid 5, 10, 20 $\mu$ g/mL의 3가지 농도를 spiking하여 분석한 결과, 각 농도에 대한 회수율은 94.2~98.1%로 10%범위내로 나타났으며 개발된 분석방법은 양호한 정확성을 가지는 것으로 확인되었다(Table 5).

#### 분석법 적용 함량 평가

현재 꿀벌에 의하여 생산된 천연벌꿀 및 사양벌꿀

에 대한 품질평가 및 규격은 식품공전 고시되어 있지만 순수 밀원 벌꿀에 대한 품질평가법이 존재하지 않는다. 본 연구에서는 국산 아카시아꿀의 생리활성 물질 abscisic acid(Kim *et al.*, 2017)를 지표로 순수 밀원 벌꿀에 대한 품질평가법을 제시하고자 UPLC를 이용하여 품질평가법의 개발 및 검증하였다. 확립된 UPLC 품질평가법을 8개 지역에서 생산된 국산 아카시아꿀에 적용하였다(Fig. 3). 그 결과, 국산 아카시아꿀에 존재하는 abscisic acid의 함량은 12.5~45.7mg/kg로 나타났다. 충북 지역에서 생산한 아카시아꿀에 abscisic acid가 45.7mg/kg로 가장 높은 함량을 보였다(Table 6). Ediriweera and Premarathna 등(2012)은 벌꿀에 포함된 밀원식물 유래 화학적 성분들은 밀원식물이 서식하는 지역적 기후, 토양에 따라 차이를 보이며, 이는 벌꿀의 생리활성에도 영향을 끼는 것으로 보고되었다. 국산 아카시아꿀의 지역별 abscisic acid의 함량차이 역시 밀원식물인 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*) 분포도, 지역적 환경차이에 의한 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구에서는 국산 아카시아꿀의 품질관리 및 품질평가를 위하여 *H. pylori*에 대한 생리활성 물질 abscisic acid를 지표로 UPLC를 이용하여 품질평가법을 개발하였다. UPLC 분석법은 Halo C18(2.1 $\times$ 100mm, 2 $\mu$ m) 컬럼, MeCN과 0.1% phosphoric acid의 기울기조건 및 검출과장 263nm에서 국산 아카시아꿀 내 abscisic acid는 6분 이내에 정량분석이 가능한 2.0 이상의 완벽한 분리도를 나타냈으며, 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성(일내 및 일간 정밀도, 반복성), 정확성(회수율) 평가를 통하여 완벽하게 검증되었다. 확립된 분석방법은 국산 아카시아꿀 내 abscisic acid의 정량분석에 충분히 적용할 수 있었으며, 국산 아카시아꿀을 포함한 순수 밀원 국산 벌꿀에 대한 품질관리 및 품질평가를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것이라 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 연구사업(과제번호: PJ01408001)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

## 인용문헌

- Alvarez-Suarez, J. M., M. Gasparrini, T. Y. Forbes-Hernandez, L. Mazzoni and F. Giampieri. 2014. The Composition and biological activity of honey: A focus on manuka honey. *Foods* 3: 420-432.
- Bogdanov, S., T. Jurendica, R. Sieber and P. Gallmann. 2008. Honey for nutrition and health: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 27: 677-689.
- Can, Z., O. Yildiz, H. Sahin, E. Akyuz Turumtay, S. Silici and S. Kolayli. 2015. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem.* 180: 133-141.
- Chang, H. G., M. K. Han and J. G. Kim. 1988. The chemical composition of Korean honey. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 631-636.
- Codex Alimentarius Commission. 2001. *Codex Stan.* 12-1981, pp. 1-8. Rome, Italy.
- Deng, J., R. Liu, Q. Lu, P. Hao, A. Xu, J. Zhang and J. Tan. 2018. Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey. *Food Chem.* 252: 243-249.
- Ediriweera, E. R. and N. Y. Premarathna. 2012. Medicinal and cosmetic uses of bee's honey-A review. *Ayu.* 33: 178-182.
- Kim, S. G., I. P. Hong, S. O. Woo, H. J. Jung, H. R. Jang and S. M. Han. 2015. Isolation of abscisic acid from honey of black locust (*Robinia pseudoacacia*) in Korea. *J. Apic.* 30: 287-292.
- Kim, S. G., I. P. Hong, S. O. Woo, H. R. Jang, S. C. Pak and S. M. Han. 2017. Isolation of abscisic acid from Korean acacia honey with anti-*Helicobacter pylori* activity. *Pharmacogn. Mag.* 13: S170-S173.
- Korea Food & Drug Administration (KFDA). 2016. *Food Code 2016.* 185p. Cheongju, Korea.
- Yao, L. N. Datta, F. A. Toma's-Barbera'n, F. Ferreres, I. Martos and R. Singanusong. 2003. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chem.* 81: 159-168.
- Zhao, H., N. Cheng, L. He, G. Peng, Q. Liu, T. Ma and W. Cao. 2018. Hepatoprotective effects of the honey of *Apis cerana* Fabricius on bromobenzene-induced liver damage in mice. *J. Food Sci.* 83: 509-516.