

건강기능식품에서 HPLC를 이용한 4-Hydroxy-L-isoleucine 분석법 연구

이세윤 · 정희선 · 허수정 · 이해영 · 오재명*

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 영양기능연구팀

Development of Method for Determining 4-Hydroxy-L-isoleucine in Health Functional Foods by HPLC

Se-Yun Lee, Hee-Sun Jeong, Soo-Jung Hu, Hye-Young Lee, Jae-Myoung Oh*

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

(Received March 13, 2020/Revised March 28, 2020/Accepted May 7, 2020)

ABSTRACT - This study was conducted to develop a method of analysis for 4-hydroxy-L-isoleucine in the seed extract of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*), a health functional food that contains dietary fiber. The analytical method for 4-hydroxy-L-isoleucine was derived with *O*-phthaldialdehyde reagent (OPA) and determined by HPLC-PDA. The method was performed on a Capcell Pak C₁₈ UG 120 column (4.6×250 mm, 5 μm) in isocratic elution mode using disodium phosphate and acetonitrile. The validation of the developed analytical method was conducted by evaluating several parameters; selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy and repeatability. Excellent linearity ($R^2=0.999$) was observed for 4-hydroxy-L-isoleucine in the concentration range (5-100 μg/mL). Observed recoveries of these compounds were found to be between 91.7 and 96.4%. Precision was between 0.2 and 2.4% relative standard deviation (%RSD).

Key words : Health functional food, Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed, 4-Hydroxy-L-isoleucine

최근 소비자 요구에 따라 다양한 기능성이 포함될 수 있도록 여러 가지 건강기능식품 기능성 원료가 혼합되어 제조되는 경우가 많아지고 있으며, 동일한 지표성분을 가지고 있는 기능성 원료 혹은 동일한 성분을 가지고 있는 기타원료가 혼합되어 제조될 수 있는 가능성도 높아졌다. 이에 효율적이고 신뢰성 있는 사후관리 등 기준·규격 관리를 위해 고시형 건강기능식품(68종)의 지표성분에 대한 적합성 검토를 실시하였고, 2018년 연구사업을 통해 호로파종자식이섭유가 그 중 하나로 설정되었다.

호로파(*Trigonella foenum graecum*)는 인도, 아프리카 지중해에서 광범위하게 재배되는 한해살이 콩과 식물로서, 호로파의 종자는 인도와 중국에서 약초 그리고 향신료로 오랫동안 사용되어 왔다¹⁾. 호로파종자는 단백질 및 식이 섬유 함량이 높아 식이보충제의 원료로 전 세계적으로 사

용되고 있으며^{2,3)}, 주요 구성성분으로 4-hydroxy-L-isoleucine, trigonelline, diosgenin 등이 있다⁴⁾.

특히, 4-hydroxy-L-isoleucine은 *Trigonella* 종에서만 발견되는 성분으로 개별인정형 원료의 지표성분으로 설정된 바 있다. 4-hydroxy-L-isoleucine은 호로파종자 특유의 냄새와 쓴맛을 나타내게 한다⁵⁾. 이러한 4-hydroxy-L-isoleucine은 isoleucine으로부터 합성된 아미노산 유도체로 항당뇨⁶⁾, 항박테리아⁶⁾, 항염증⁷⁾ 그리고 항산화⁸⁾ 효과가 있다고 보고되었다.

호로파종자식이섭유는 ‘식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 인정받았다. 미국약전에서도 호로파종자를 식이보충제의 원재료로 관리하고 있으며 지표성분으로 4-hydroxy-L-isoleucine 0.2% 이상을 기준규격으로 정하고 있다⁹⁾. 미국약전 시험법 및 Catherine 등¹⁰⁾의 연구에서 phenylisothiocyanate(PITC), *O*-phthaldialdehyde(OPA) 등의 유도체시약을 이용하여 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기 및 형광검출기로 4-hydroxy-L-isoleucine을 분석한다.

이에 본 연구에서는 4-hydroxy-L-isoleucine 분석법을 검

*Correspondence to: Jae-Myoung Oh, Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Cheongbuk 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4404, Fax: +82-43-719-2500
E-mail: osm5810@korea.kr

토하고 시험법 검증 가이드라인¹¹⁾을 참고하여 밸리데이션을 수행한 후 국내에서 유통 중인 건강기능식품에 대한 적용성을 확인하여 최적의 분석법을 확립하고자 한다.

Materials and Methods

시약 및 재료

4-Hydroxy-*L*-isoleucine의 표준품은 Boc scientific사 (Shirley, NY, USA)로부터 구입하였고 인산수소이나트륨과 인산이수소나트륨은 Sigma사(St. Louis, MO, USA), 아세트니트릴은 Merck사(Whitehouse Station, NJ, USA)로부터 HPLC급으로 구입하여 사용하였다. 유도체화에 사용되는 borate buffer (Cas. 5061-3339)와 OPA reagent (Cas. 5061-3335)는 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 시료 전처리와 이동상에 사용되는 물은 3차 증류수(Distilled water)로 18.0 MΩ 이상인 것을 사용하였다. 시료는 호로파종자추출물을 기능성 원료로 하는 건강기능식품 3건을 인터넷을 통해 구입하였다.

표준용액 조제

4-Hydroxy-*L*-isoleucine 10 mg을 정밀히 취하여 증류수에 녹여 표준원액(100 µg/mL)으로 하고, 표준원액을 증류수로 희석하여 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL의 농도로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 하였다.

시험용액 조제

4-Hydroxy-*L*-isoleucine으로서 1.5-3 mg을 50 mL 부피 플라스크에 정밀히 취하고 증류수를 가하여 시료를 녹인다. 30분 동안 초음파 추출 후 실온에서 냉각하여 증류수로 50 mL 정용한다. 증류수로 적절히 희석하여 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한다. 위의 용액 40 µL와 borate buffer 200 µL를 혼합 후 30초간 방치하고, OPA 용액 40 µL를 혼합 후 이를 시험용액으로 한다.

최적분석조건 확립

건강기능식품공전시험법의 액체크로마토그래피/자외부흡광도를 이용한 아미노산분석법인 폴리감마글루탐산 제2법¹²⁾을 참고하여 전처리 및 기기분석 조건을 변화시켜 최적의 표준화된 시험법을 확립하고자 하였다. 우선 이동상 용매로 사용되는 20 mM 인산수소이나트륨과 90% 아세트니트릴 비율 82:18을 비율 85:15, 90:10 으로 달리하여 비교 실험하였으며 전처리용매를 0.02 N 염산과 증류수로 비교 실험하였다. 시료량 비교를 위해 시료 채취량을 100, 150, 200 mg으로 비교 실험하였다.

밸리데이션 방법

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 분리도

Table 1. Analytical parameters of LC-PDA for 4-hydroxy-*L*-isoleucine in sample

Parameter	Condition
Column	Capcell Pak UG120 C ₁₈ (Shiseido 4.6×250 mm, 5 µm)
Wavelength	338 nm
Column oven temp.	40°C
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	10 µL
Mobile phase	A: 20 mM Na ₂ HPO ₄ (20 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.8) B: 90% Acetonitrile A : B = 85 : 15

및 머무름 시간을 확인하였다. 직선성은 시료에서 성분이 검출되는 농도범위를 중간값으로 설정하여 총 7개의 농도 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL를 검토하였으며, 표준용액만을 이용하여 산출하였고, 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3반복 실험을 수행하였다. 정확도는 표준물질 첨가법을 이용하여 비타민 C(10 ng/mL)를 공시험용액으로 회수율을 확인하였고, 표준용액을 첨가하였을 때 최종농도가 20, 40, 60 µg/mL이 되도록 설정하여 진행하였다. 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였다. 검출한계와 정량한계의 경우 표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y절편 값을 이용하여, 검량선 y절편 값의 표준편차에 3.3배를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 평균값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. 정밀도는 시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본시료를 선정하였으며, 시료 100 mg, 150 mg, 200 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. 마지막으로 실험실간 정밀도(reproducibility)를 확인하기 위하여 3개 실험실에서 표본시료를 5회 반복 측정하였다.

기기조건

4-Hydroxy-*L*-isoleucine을 분석하기 위해 Photo diode array detector (PDA) (Accela PDA 80, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA)가 장착된 High-performance liquid chromatography (HPLC) (Nanospace SI-2, Shiseido Co., Osaka, Japan)를 사용하였으며 컬럼은 Capcell Pack C₁₈ UG120 (4.6 × 250 mm, 5 µm) (Shiseido Co., Osaka, Japan)이었고, 이동상으로는 Table 1과 같이 20 mM 인산수소이나트륨(pH 7.8, 20 mM 인산이수소나트륨으로 조정)과 90% 아세트니트릴을 85:15 비율로 혼합하여 0.7 mL/min 유속으로 측정파장은 338 nm로 하여 분석하였다.

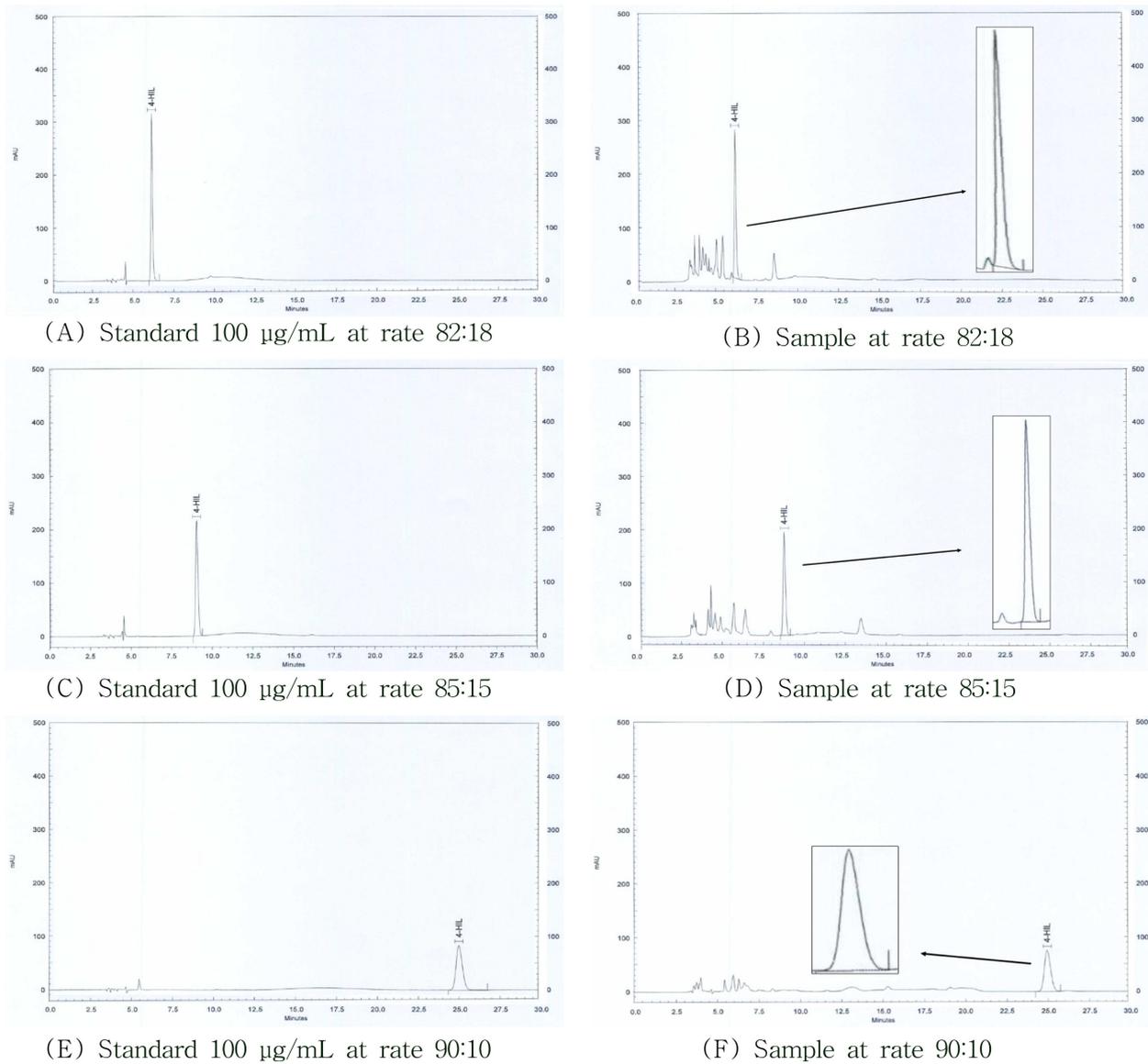


Fig. 1. HPLC chromatogram of (A) standard 100 µg/mL at rate 82:18, (B) sample at rate 82:18, (C) standard 100 µg/mL at rate 85:15, (D) sample at rate 85:15, (E) standard 100 µg/mL at rate 90:10 and (F) sample at rate 90:10.

Results and Discussion

최적분석조건 확립

건강기능식품공전시험법의 폴리감마글루탐산 제2법에서 이동상 용매를 20 mM 인산수소이나트륨과 90% 아세트니트릴 비율 82:18로 사용하였으나 피크 분리도를 높이기 위해 이동상 비율을 85:15, 90:10 으로 달리하여 표준용액과 시험용액의 피크 분리도를 비교하였다. 그 결과 이동상 비율 85:15로 분석하였을 때 상대적으로 가장 분리도가 높았으며 머무름시간 8.9분으로 상대적으로 적절하여 이동상 비율 85:15로 기기조건을 선택하였다(Fig. 1).

건강기능식품공전시험법의 폴리감마글루탐산 제2법 시

험법과 개별인정형 기능성 원료 시험법을 참고하여 0.02 N 염산과 증류수로 전처리조건을 달리하여 분석함량을 비교하였다. 그 결과 표준품 및 시료의 피크면적값과 머무름 시간에 큰 차이가 없어 추출용매를 보다 간편한 시험법인 증류수로 선택하였다(Table 2).

건강기능식품공전시험법의 폴리감마글루탐산 제2법과 개별인정형 기능성 원료 시험법에서 시료량은 각 1-2 g과 1g으로 희석과정이 많은 단점을 보완하기 위해 희석과정이 필요하지 않은 300 mg 미만으로 시료량을 설정하였다. 단, 건강기능식품의 경우 기능성 원료뿐만 아니라 다양한 원료가 복합된 제품으로도 제조되기 때문에 시료량의 설정 시 지표성분을 기준으로 설정하는 것이 적절하다. 이에 시

Table 2. Comparison of analysis results by extraction solvent

		0.02 N HCl	Distilled water
Standard 100 µg/mL	Peak area	2335753	2245500
	Retention time (min)	9.0	8.9
Sample	Peak area	2090790	2016275
	Retention time (min)	9.0	8.9

Table 3. Comparison of analysis results by sample amounts (Based on total 4-hydroxy-*L*-isoleucine contents)

	As 4-hydroxy- <i>L</i> -isoleucine amounts (mg)		
	1.5	2.3	3
Sample amounts (mg)	100	150	200
4-Hydroxy- <i>L</i> -isoleucine contents (mg/g)	13.2±1.9	13.6±1.1	13.4±1.9
Recovery (%)	90	93	92

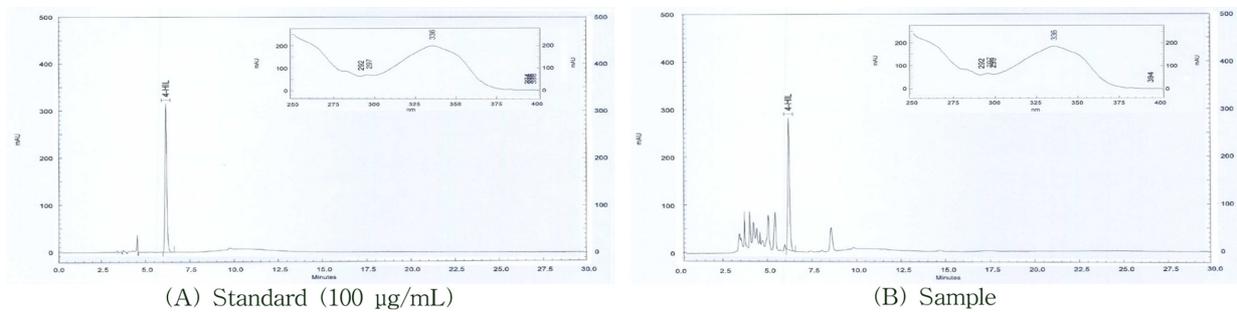


Fig. 2. HPLC chromatogram and spectrum of 4-hydroxy-*L*-isoleucine in (A) standard and (B) sample.

료량 최소 100 mg에서 최대 200 mg 칭량함을 기준으로 하여 4-hydroxy-*L*-isoleucine으로서 최소 1.5 mg 최대 3 mg 인 100, 150, 200 mg으로 시료량 설정을 검토하였다. 분석 결과 표시량 대비 회수율이 90% 이상으로 시료 채취량을 4-hydroxy-*L*-isoleucine으로서 1.5-3 mg으로 선정하였다(Table 3).

밸리데이션 및 적용성

특이성

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 분리도 및 머무름 시간을 확인하였다. Fig. 2는 표준용액과 시험용액을 분석한 크로마토그램이며 동일한 위치에서 단일 피크가 형성되는지 확인하였다. 그 결과 표준용액과 시험용액에서 4-hydroxy-*L*-isoleucine의 머무름 시간 8.9분으로 일치함을 확인할 수 있었고 분리된 피크의 정점에서 PDA 스펙트럼 패턴이 표준용액과 시험용액에서 일치함을 확인할 수 있었다.

직선성

시료에서 4-hydroxy-*L*-isoleucine 성분이 검출되는 농도 범위를 중간값으로 설정하여 총 7개의 농도 5, 10, 20, 40,

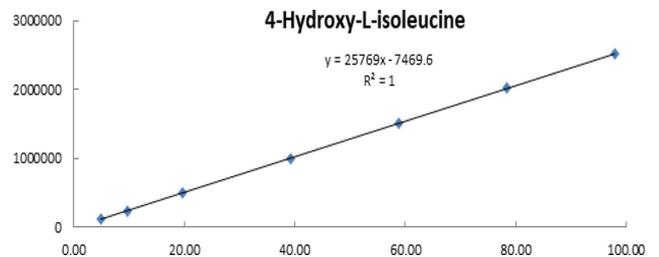


Fig. 3. Calibration curves of 4-hydroxy-*L*-isoleucine.

60, 80, 100 µg/mL를 검토하였다. 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3반복 실험을 수행하였다. 실험 결과 검량선의 상관계수(R^2)는 0.999 이상이었다(Fig. 3).

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y절편 값을 이용하여, 검량선 y절편 값의 표준편차에 3.3배를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 평균값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. 4-hydroxy-*L*-isoleucine의 검출한계는 1.2 µg/mL이며, 정량한계는 3.6 µg/mL로 나타났다.

Table 4. Accuracy of analytical method for 4-hydroxy-L-isoleucine (n=5)

Treatment	Spiked concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
	20	40	60
1	20.14	39.09	58.43
2	19.35	39.09	55.76
3	19.69	39.19	54.76
4	19.85	39.08	56.00
5	19.38	39.01	55.73
Measured mean ($\mu\text{g/mL}$)	19.68	39.09	56.14
%RSD	1.69	0.17	2.44
Recovery mean (%)	96.43	95.78	91.69

Table 5. Repeatability of analytical method for 4-hydroxy-L-isoleucine in sample (n=5)

Treatment	Sample contents (mg)		
	100	150	200
1	13.61	13.35	13.38
2	13.59	13.34	13.23
3	13.29	13.27	13.27
4	13.94	13.48	13.33
5	13.75	13.30	13.40
Measured mean (mg/g)	13.70	13.35	13.32
Standard deviation	0.15	0.08	0.07
%RSD	1.12	0.60	0.53

정확도

표준물질 첨가법을 이용하여 비타민 C(10 ng/mL)를 공시험용액으로 하여 회수율을 확인하였고, 표준용액을 첨가하였을 때 최종농도가 20, 40, 60 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 설정하여 진행하였다. 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였다. 그 결과 4-hydroxy-L-isoleucine에 대한 회수율은 91.7-96.4%로 나타났으며 상대표준편차는 0.2-2.4%로 나타났다(Table 4).

정밀도

시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본시료를 선정하였으며, 시료 100 mg, 150 mg, 200 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. 각 농도의 상대표준편차(%RSD)를 확인한 결과 1.1, 0.6, 0.5%로 나타났다(Table 5).

실험실간 정밀도(reproducibility)를 확인하기 위하여 1개의 표본시료를 선정하여 세 실험실에서 각각 5회 반복 측정했다. 4-hydroxy-L-isoleucine에 대한 재현성의 상대표준

Table 6. Inter-laboratory reproducibility for the determination of 4-hydroxy-L-isoleucine in sample (n=5)

Treatment	Laboratory		
	A	B	C
1	13.35	12.82	13.33
2	13.34	13.19	13.34
3	13.27	13.56	13.27
4	13.48	13.22	13.47
5	13.30	13.32	13.23
Measured mean (mg/g)		13.33	
Standard deviation		0.07	
%RSD		0.52	

Table 7. Results of application of health functional foods in circulation about analytical method

Sample No.	Form	Labeled range 4-Hydroxy-L-isoleucine contents (mg/g)	(Recovery%)
1	Capsule	11.7-17.5	13.35(91%)
2	Capsule	13.6-20.4	17.43(103%)
3	Capsule	20.4-30.6	25.46(99%)

편차를 확인한 결과 0.5%로 나타났다(Table 6).

적용성

수거한 건강기능식품에 대하여 확립된 4-hydroxy-L-isoleucine 시험법을 이용하여 지표성분의 함유량에 대해 적용성 검토를 수행하였다. 그 결과 총 3건의 유통제품에서 각각 13.4, 17.4, 25.5 mg/g으로 분석되었고 표시 함량 대비 91-103%로 기준규격에 적합함을 확인하였다(Table 7).

Acknowledgement

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(19161미래안054)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 건강기능식품 호로파종자식이섬유 중 4-hydroxy-L-isoleucine에 대한 분석법을 개발하는 연구이다. 최적분석 조건을 확립하기 위해 시료 채취량, 전처리 용매 및 이동상 용매 조건을 비교 검토하였으며, HPLC-PDA를 이용하여 시료 중의 4-hydroxy-L-isoleucine를 분석하였다. 분석시 사용한 컬럼은 Capcell Pack UG120 C₁₈ (Shiseido, 4.6×250 mm, 5 μm)이며, 유도체 시약으로 OPA를 선정하

였다. 확립된 시험법에 대해 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성 등의 밸리데이션을 수행하였다. 5-100 µg/mL 농도에서 결정계수(R^2) 0.999 이상으로 높은 직선성을 확인하였다. 또한, 회수율은 91.7-96.4%이었고, 정밀성은 0.5-1.1%의 상대표준편차(%RSD)를 확인하였다. 개발된 시험법은 호로파종자추출물 중 4-hydroxy-L-isoleucine 분석을 위한 시험법으로 활용되기에 적합한 것으로 판단된다.

References

1. Fernandez, A.J., Gross, R., Roye, M., Leconte, A., Gomis, R., Ribes, G., 4-Hydroxyisoleucine: A novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes*, **47(2)**, 206-210 (1998).
2. Anaguiven, A.S., Ricardo, D.C., Jorge, L.R., Teresa, G.G., 4-Hydroxyisoleucine from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): Effects on insulin resistance associated with obesity. *Molecules*, **21(11)**, 1596 (2016).
3. Sumantran, V., Experimental approaches for studying uptake and action of herbal medicines. *Phytother. Res.*, **21(3)**, 210-214 (2007).
4. Abdelgania, M.E., Elsheikha, E.A., Mukhtar, N.O., The effect of rhizobium inoculation and chemical fertilization on seed quality of fenugreek. *Food Chem.*, **64(3)**, 289-293 (1999).
5. Sridevi, P., Lakshmi, G.A., Vunutha, K., Akshitha, K., Mahesh, K., Bhagavan, R.M., Dipeptide synthesis and evaluation of antidiabetic activity of 4-hydroxyisoleucine from fenugreek seeds. *Pharm. Bioprocess.*, **5(4)**, 44-53 (2017).
6. Verma, N., Usman, K., Patel, N., A multicenter clinical study to determine the efficacy of a novel fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) extract (Fenfuro™) in patients with type 2 diabetes. *Food. Nutr. Res.*, **60**, 32382 (2016).
7. Muraki, E., Yukie, H., Chiba, H., Dose-dependent effects, safety and tolerability of fenugreek in diet-induced metabolic disorders in rats. *Lipid. Health. Dis.*, **10(1)**, 240 (2011).
8. Neelakantan, N., Narayanan, M., Souza, R. J., Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) intake on glycemia: a metaanalysis of clinical trials. *Nutr. J.*, **13**, 7 (2014).
9. United states Pharmacopeial Convention, 2016, USP39-NF34, Rockville, MD, USA, pp. 6619-6625.
10. Catherine, H., Claude, B., Yves, S., Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis. *Phytochem.*, **44(4)**, 563-566 (1997).
11. George, W.L. Jr., 2016. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Ed., Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Rockville, MD, USA, pp. 1-32.
12. Ministry of Food and Drug safety, (2020, April 22), Health functional food code, retrieved from: www.mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=14416