

# 동결건조 로열젤리 내 putrescine 함량 분석을 위한 분석법 밸리데이션

최홍민 · 김세건 · 김효영 · 우순옥 · 한상미\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

## Validation of UPLC Analysis Method for Putrescine in Lyophilized Royal Jelly

Hong-Min Choi, Se-Gun Kim, Hyo-Young Kim, Soon-Ok Woo, and Sang-Mi Han\*

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

**ABSTRACT:** Putrescine generated by the action of microorganisms in the decay generally used as a measure of freshness in food. However, the analytical method of putrescine in freeze-dried royal jelly has not yet been established. In the present study, the UPLC method for putrescine in lyophilized royal jelly was established using C18 column. The newly established method was able to analyze putrescine accurately within 7 minutes and was validated by analytical parameters such as specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, and limit of quantification. These results provide for the analytical method to evaluate the level of freshness in freeze-dried royal jelly, which will be useful in further studies of safety verification.

**Key words:** Biogenic amine, Putrescine, Validation, Freeze-dried royal jelly

**초 록:** Putrescine은 일반적으로 미생물의 활동에 의해 발생되며, 신선함의 척도로서 사용된다. 그러나 동결건조된 로열젤리에 대한 putrescine의 분석법은 아직 확립되지 않은 실정이다. 본 연구에서는 C18 컬럼을 이용하여 동결건조 로열젤리 내 putrescine을 분석하기 위한 UPLC 분석법을 확립하고자 하였다. 새롭게 확립된 분석법은 7분 이내에 putrescine을 분석 가능하였으며, 이러한 분석법을 검증하기 위해 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 정량한계, 정성한계 등을 평가하였다. 본 연구를 통해 동결건조 로열젤리의 신선한 정도를 평가하기 위한 분석법을 제공하였으며, 추후 안전성의 척도에 대한 자료로서 활용 가능할 것으로 기대되어진다.

**검색어:** 생체아민, 푸트레신, 밸리데이션, 로열젤리

일반적으로 생체아민은 살아있는 세포 내에서 중추신경의 신경전달물질이나 혈관계 조절 등 다양한 생리활성을 수행하는 저분자 유기질소 화합물을 말하며(Cho et al., 2008), 아미노산의 탈탄산 작용이나 아미노기 전이작용 등에 의해 생성되는 대사산물이다(Clark and Camargo, 2007; Harro and Oreland, 2001). 이러한 생체아민은 자연적으로 동식물·미생물에 의해 생성되며, 아민 산화효소(amine oxidase)의 활동에 의해 체내에서 적정 수치를 유지하지만 일정 수준 이상의 고함량의 생체아민은 독성을 나타내기도 한다(Shalaby et al., 1996). 특히 putrescine이나 cadaverine 같은 생체아민은 발효나 부패 시 미

생물에 의해 생성되는 생체 아민으로 식품에 있어서 미생물의 활동에 대한 지표로서 활용되어왔다(Linares et al., 2011).

로열젤리는 봉군 내 어린 유충을 비롯한 여왕벌의 먹이로 활용되는 유백색의 점액성 물질로 특유의 비릿한 향을 갖는 물질이다. 로열젤리는 5~15일령 일벌의 인두선에서 분비되는 물질로 여왕벌의 경우 유충기간부터 성장 후에도 지속적으로 섭취하지만 일벌과 수벌의 유충은 부화 후 3일간만 섭취한다(Lercker et al., 1981). 로열젤리는 60% 이상이 수분이며 단백질, 탄수화물, 지방, 비타민 등 다양한 물질로 구성되어 있다(Krell, 1996). 단백질이나 지방은 온도에 높은 변성되거나 산화되기 쉽기 때문에 로열젤리는 생산 즉시 냉동보관을 통해 저장하며, 운반이나 보관 시 신선도 유지를 위해 저온상태를 유지해야 했다. 이전 연구를 통해 신선도 문제와 보관이나 운반상의 어려움을 해결하기 위해 동결건조를 이용한 로열젤리의 제조

\*Corresponding author: sangmih@korea.kr

Received October 7 2022; Revised November 21 2022

Accepted November 25 2022

과정을 최적화하였으며(Choi et al., 2021), 동결건조 로열젤리는 장기간 보관하더라도 유해 미생물 등에 안전했다. 본 연구를 통해 동결건조 로열젤리의 신선도를 확인하는 하나의 척도인 putrescine을 분석하기 위한 조건을 확립하고 이에 대한 분석법을 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 시료 및 추출

본 실험에 사용된 시료는 2020년, 2021년에 생산된 로열젤리를 한국양봉농협으로부터 구매하여 동결건조한 후 공시시료로 사용하였다. Putrescine을 추출하기 위해 동결건조 로열젤리 3 g을 5% TCA (trichloroacetic acid) 20 ml에 녹인 후 이를 교반기(Daihan scientific, Wonju, Korea)를 이용하여 1시간 동안 교반하였다. 추출된 용액은 원심분리기(Hanil science, Daejeon, Korea)를 이용하여 4°C에서 13000 rpm으로 21 분간 원심분리한 후 상등액을 취해 -20°C에서 소분하여 실험에 사용하였다. 정량분석 및 분석법 검증을 위한 표준품으로 putrescine dihydrochloride (Sigma Aldrich, USA)을 사용하였으며, 이러한 표준품은 1 mg/ml 농도로 0.1 N 염산에 녹인 후 이를 희석하여 사용하여 검량곡선을 그렸다.

### Dansyl Chloride 유도체화

Dansyl chloride 유도체화는 생체아민을 유도체화하기 위해 주로 사용하는 방법으로 75 mg dansyl chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 Acetone (Merck, Darmstadt, Germany) 10 ml에 녹여 유도체화 용액을 만들었다. Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 g을 25 ml 3차 증류수에 녹여 포화된 탄산수소나트륨 용액을 제조하였으며, L-proline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 3차 증류수에 녹여 10% L-proline 용액을 만들어 실험에 사용하였다. 냉동보관된 로열젤리 추출액과 putrescine 표준용액 100 µl를 dansyl chloride 용액 400 µl와 탄산수소나트륨 용액 200 µl와 혼합하여 60°C에서 호일로 감싸 빛을 차단하여 10 분간 반응시켜 유도체화를 실시하였으며, 유도체화된 용액에 L-proline 용액 100 µl를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 해당 용액에 diethyl ether (Merck, Darmstadt, Germany) 500 µl를 첨가한 후 4°C, 13000 rpm 속도로 10분간 원심분리하였으며, 상등액을 취하여 질소농축기(Caliper life science Inc, MA, USA)를 이용하여 농축하였다. 농축이 끝난 시료에 1 ml acetonitrile을

첨가한 후 분석에 이용하였다.

## 분석기기 및 분석조건

Putrescine 분석을 위한 UPLC 기기는 PDA (Photo diode array) 검출기가 장착된 Waters (Minneapolis, MN, USA)사의 ACQUITY UPLC I-class 모델을 사용하였으며, 분석조건은 Table 1과 같았다.

### 분석법 검증

UPLC를 이용하여 동결건조 로열젤리 내 putrescine을 분석하기 위한 분석법 검증을 위해 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 등을 평가하여 검증하였다(MFDS, Food Code, 2015). 동결건조 로열젤리와 putrescine 표준품을 유도체화하여 각각의 UV 스펙트럼 흡수 패턴과 머무른 시간을 비교하여 특이성을 검증하였으며, 직선성은 로열젤리 내 putrescine 함량을 포함하는 5개 구간의 농도를 설정하여 상관계수인  $R^2$  값을 산출하여 확인하였다. 정확성은 동결건조 로열젤리 시료에 3가지 농도의 표준용액을 첨가하였을 때,  $\pm 10$  범위의 회수율로 평가하였으며, 정밀성은 정확성 검증과 마찬가지로 3가지 농도를 설정한 후 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 분석을 통해 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 평가하였다. 검출한계와 정량한계는 표준품의 검량선을 이용하여 Y절편의 표준편차와 기울기에 근거하여 산출하였다.

$$LOD=3.3 \times (\text{standard deviation/slope of calibration curve})$$

$$LOQ=10 \times (\text{standard deviation/slope of calibration curve})$$

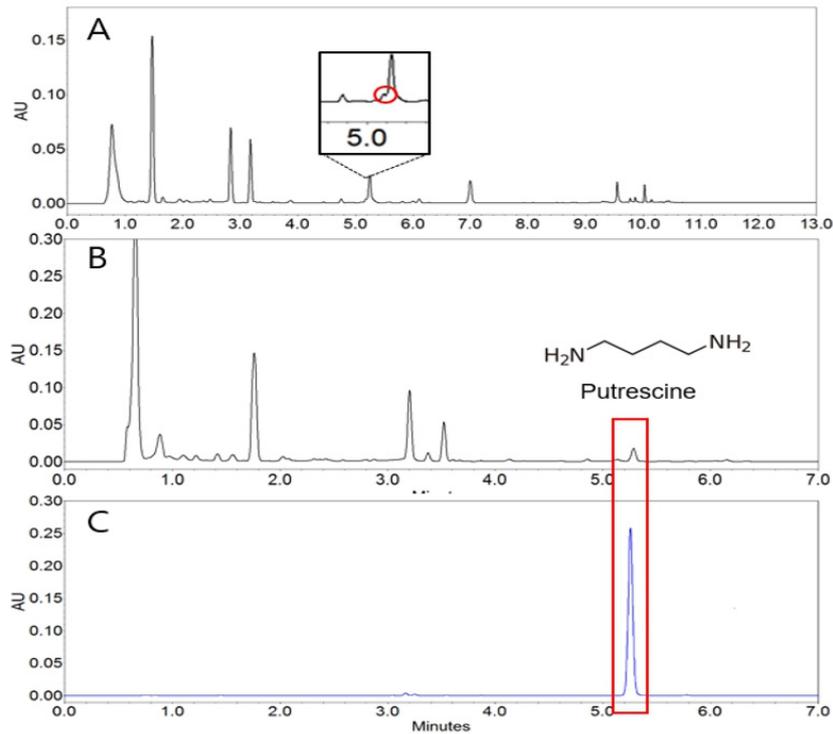
### Putrescine 함량분석

Putrescine의 함량은 putrescine 표준품을 이용하여 검량곡선을 작성한 후 회귀식을 산출하여 정량 분석하였다.

## 결과

### 분석조건 최적화

동결건조 로열젤리 내 putrescine을 분석하기 위해 이전의



**Fig. 1.** UPLC chromatogram of (A) freeze-dried royal jelly through previous method, (B) freeze-dried royal jelly through new method and (C) putrescine standard.

**Table 1.** UPLC conditions for analysis of putrescine in freeze-dried royal jelly

Item	Chromatographic Condition
Column	Halo C18(2.1×100 mm, 2.0 μm)
Flow rate	0.25 mL/min
Column temperature	20°C
Injection volume	2 μl
Wavelength	254 nm

	Time (min)	MeCN (%)	H <sub>2</sub> O (%)
Mobile phase	0	45	55
	2.5	62	38
	3.0	65	35
	6	75	25
	7	100	0

연구에서 진행한 바 있는 정제봉독 내에 존재하는 putrescine 분석법(Choi et al., 2021)을 이용하여 분석을 실시하였다. 그러나 Fig. 1에서 보듯이 기존 분석법을 이용하여 분석한 결과 putrescine이 머무른 시간 5.263 분에서 검출되었으나 분리능

이 좋지 않아 피크가 다소 겹쳐보이며, 피크가 끌리는 테일링이 약간 발생하였다. 그래서 용매조성 등의 조건을 달리 하여 새롭게 분석조건을 설정하였다(Table 1). 총 분석시간은 7 분이었으며, 이동상으로는 acetonitrile과 증류수를 사용하였으며, C18 (2.1×100 mm, 2.0 μm) 컬럼에서 오븐 온도를 20°C로 설정하였을 때 피크 분리도가 개선됨을 확인할 수 있었다. 새로운 분석조건에서의 동결건조 로열젤리 내 putrescine의 머무른 시간은 5.289 분이었으며, 짧은 시간 동안 높은 분리도를 나타내었다(Fig. 1).

### 분석법 검증

동결건조 로열젤리 내 putrescine을 분석하기 위해 확립된 UPLC 분석법에 대한 타당성을 검증하기 위해 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계, 정량한계 등을 평가하였다.

특이성은 유도체화된 putrescine 표준품과 동결건조 내에 동일한 머무른 시간을 갖는 피크의 UV 흡수 스펙트럼 패턴 일치 여부를 통해 평가하였으며, Fig. 2에서 보는 바와 같이 두 피크의 흡수 영역이 일치함을 알 수 있었다.

직선성은 동결건조 로열젤리 내 putrescine이 포함되는 농도

에 해당되는 표준품의 농도인 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 설정하여 검량선을 그려 확인하였다. 검량선을 통해  $y=4263.7x+5605.3$ 이라는 회귀식을 산출하였으며, 상관계수( $R^2$ ) 값이 0.9999로 높은 직선성을 나타내었다(Table 2).

정밀성은 직선성을 평가한 농도 범위 내에 있는 표준품 농도 3가지(62.5, 125, 250  $\mu\text{g/ml}$ )를 설정하여 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀도를 측정된 결과, 2% 미만의 상대표준편차

(RSD)값을 나타내어 우수한 정밀성을 갖는 것으로 확인되었다(Table 3).

정확성은 분석시료에 직선성을 평가한 농도 범위 안의 3가지 농도를 첨가한 후 회수율을 확인하여 평가하였다. 그 결과, 회수율의 범위는 99.4~104.1%였으며, 10% 미만의 우수한 정확성을 나타내었다(Table 4).

검출한계 및 정량한계는 계산식에 의거하여 검량선을 그려

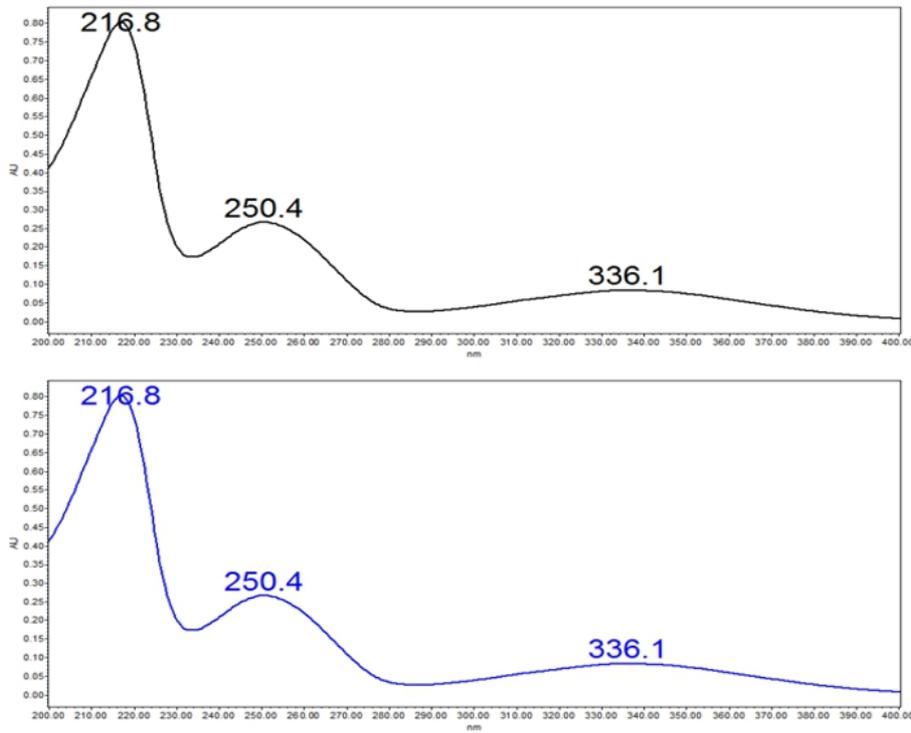


Fig. 2. Comparison of UV spectrum pattern of (A) freeze-dried royal jelly and (B) putrescine standard for specificity.

Table 2. Measurement of LOD, LOQ and linearity for putrescine

Standard	Regression equation	Coefficient of determination ( $R^2$ )	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Putrescine	$y=4263.7x+5605.3$	0.9999	0.7	2.14

<sup>a</sup>y: peak area, x: amount ( $\mu\text{g/mL}$ )

Table 3. Precision data of intra- and inter-day variabilities for putrescine

Standard	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day		Inter-day	
		Mean $\pm$ SD	RSD (%)	Mean $\pm$ SD	RSD (%)
Putrescine	250	248.05 $\pm$ 2.16	0.87	250.03 $\pm$ 4.23	1.69
	125	124.05 $\pm$ 1.65	1.33	133.61 $\pm$ 0.25	0.19
	62.5	62.24 $\pm$ 0.63	1.02	64.93 $\pm$ 0.16	0.25

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

**Table 4.** Recovery results of the analytical method

Standard	Spiked amount (µg/mL)	Measured amount (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Putrescine	62.5	65±2.1	104.1	3.17
	31.25	32.2±0.7	103.0	2.14
	15.625	15.5±0.4	99.4	2.61

**Table 5.** Contents of putrescine in freeze-dried royal jelly

Sample	Year	Content (mg/kg)	RSD (%)
Putrescine	2020	118.5±1.34	0.69
	2021	115.3±2.02	1.30

Conc.; concentration

산출한 회귀방정식으로부터 구하였다. 계산하는데 사용된 Signal/Noise는 baseline에 대한 잡음(noise)와 피크(peak)의 상대비로 그 값이 낮을수록 분석물질이 주어진 조건에서 잘 검출된다는 것을 나타낸다(He et al., 2015). Putrescine에 대한 검출한계 값과 정량한계 값은 각각 0.7 µg/ml와 2.14 µg/ml이었다(Table 2).

### Putrescine 함량 분석

확립된 UPLC 분석법을 이용하여 국내에서 생산된 2020년, 2021년 동결건조 로열젤리의 putrescine 함량을 분석하였다. 2020년 생산된 동결건조 로열젤리 내 putrescine 함량은 118.5±1.34 mg/kg이었으며, 상대표준편차(RSD)값은 0.69%로 확인되었고, 2021년 생산된 동결건조 로열젤리의 putrescine 함량은 115.3±2.02 mg/kg이었으며, 상대표준편차(RSD)값은 1.30%였다(Table 5).

## 고찰

일반적으로 생체 아민은 살아있는 세포 내에서 다양한 생리활성을 수행하며 세포의 성장과 분화를 촉진하거나, 세포사멸을 유도하는 등 체내에서 중요한 역할을 담당하고 있다(Takao et al., 2006). 특히 putrescine과 cadaverine은 세포의 사멸과 연관되어 있으며, 동물조직이 부패될 때 단백질 가수분해에 의해 생성되는 물질로 알려져 있다. 이때 산성 스트레스로부터 미생물이 세포를 보호하기 위한 대사 경로 중에 lysine 탈카르복실화 효소의 촉매 작용에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 특히 putrescine은 세포조직이 부패될 때 발생하는 불쾌한 악취를 유발하는 생체아민으로 부패의 정도를 가늠하는 척도가 되는 물질이다(Russell, 1973). 그래서 putrescine은 식품내에 존재하는

미생물 활동에 대한 지표로 사용되었으며, 식품 내 급격한 putrescine의 수치 변화는 식품 품질의 저하나 생산과정의 결함이 발생했음을 의미한다(Linares et al., 2011). 일반적으로 putrescine을 비롯한 생체아민 분석은 주로 HPLC를 이용한 액체크로마토그래피 분석을 통해 실시되어져 왔으며(Mantoanelli et al., 2020; Ibarra et al., 2015), 검출기에 따라 형광을 이용하여 분석하거나(Liu et al., 2020; Ishimaru et al., 2019) dansyl chloride 용액을 이용하여 유도체화를 통해 UV를 이용하여 분석하기도 한다(de Figueiredo et al., 2015). 기존에 HPLC를 이용한 방법을 개선하여 본 실험에서는 UPLC를 이용하여 분석시간을 단축시키고 분석효율을 높이는 방법을 채택하였다. 분석을 위한 기본 추출방법도 단 시간에 추출을 하는 것이 아닌 교반을 통해서 시간을 두고 추출하는 방법을 선정하였다(Mantoanelli et al., 2020).

Putrescine과 같은 생체아민의 정량적 분석에 관한 연구는 생선, 수산물, 유제품, 채소, 고기 등 신선함을 요구하는 음식에서 주로 보고되고 있으며(Bardócz et al., 1993; Muñoz-Esparza et al., 2019), 와인과 같은 발효주에서도 응용되고 있지만(Konakovsky et al., 2011) 실제 로열젤리에 존재하는 putrescine 분석과 관련된 내용은 찾을 수 없었다. 본 연구에서는 봉독에서의 putrescine 분석법을 이용하여 동결건조 로열젤리 내 분석하였지만 분리도가 좋지 않아 새로운 분석조건을 확립하였으며, 새롭게 확립된 분석법은 C18(2.1×100 mm, 2.0 µm) 컬럼을 이용하여 7분 이내에 신속하고 정확하게 putrescine 분석이 가능하도록 분석법을 확립하였다. 분석법의 타당성을 평가하기 위해 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계, 검량한계 등의 요인을 검증하였으며 해당 분석법을 이용하여 동결건조 로열젤리 내에 존재하는 putrescine의 정량분석을 통하여 국내에서 생산되는 로열젤리의 신선도를 평가할 수 있는 척도로서 활용할 수 있을 것이라 판단된다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업기초기반연구(과제번호: PJ015 13502)에 의하여 수행되었습니다.

## 저자 직책 & 역할

최홍민: 국립농업과학원 농업연구사; 실험설계 및 수행, 논문 작성

김세건: 국립농업과학원 농업연구사; 자료분석검토 및 실험 수행

김효영: 국립농업과학원 농업연구사; 자료 수집 및 논문 검토

우순옥: 국립농업과학원 농업연구관; 자료 수집 및 논문 검토

한상미: 국립농업과학원 농업연구관; 실험설계 및 논문 구성

모든 저자는 원고를 읽고 투고에 동의하였음.

## Literature Cited

- Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., Pusztai, A., 1993. Polyamines in food-implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.* 4, 66-71.
- Choi, H.M., Kim, H.Y., Kim, S.G., Han, S.M., 2021. Optimization of manufacturing process and storage condition of freeze-dried royal jelly for health functional ingredients. *Korean J. Apic.* 36, 17-21.
- Choi, H.M., Kim, H.Y., Kim, S.G., Han, S.M., 2021. Validation and content analysis of putrescine in the venom of honeybee (*Apis mellifera* L.). *Korean J. Appl. Entomo.* 60, 263-268.
- Clark, S., Camargo, C.A. 2007. Epidemiology of anaphylaxis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 27, 145-163.
- de Figueiredo, T.C., de Assis, D.C.S., Menezes, L.D.M., da Silva, G.R., Lanza, I.P., Heneine, L.G.D., de Vasconcelos Cançado, S. 2015. HPLC-UV method validation for the identification and quantification of bioactive amines in commercial eggs. *Talanta* 142, 240-245.
- Harro, J., Orelund, L., 2001. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Research Reviews.* 38, 79-128.
- He, X., Li, J., Zhao, W., Liu, R., Zhang, L., Kong, X., 2015. Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. *Food Chem.* 171, 405-411.
- Ibarra, A.A.G., Wrobel, K., Escobosa, A.R.C., Elguera, J.C.T., Garay-Sevilla, M.E., Wrobel, K., 2015. Determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in different chemical matrices by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS/MS). *J. Chromatography B.* 1002, 176-184.
- Ishimaru, M., Muto, Y., Nakayama, A., Hatate, H., Tanaka, R., 2019. Determination of biogenic amines in fish meat and fermented foods using column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Anal. Methods* 12, 166-175.
- Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., Jarisch, R., Hemmer, W., 2011. Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28, 408-416.
- Krell, R., 1996. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin No. 124*, Roma.
- Lercker, G., Capella, P., Conte, L. S., Ruini, F., Giordani, G., 1981. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. *Lipids.* 16, 912-919.
- Linares, D.M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M.A., Fernández, M., 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 691-703.
- Liu, Y., Han, F., Liu, Y., Wang, W., 2020. Determination of biogenic amines in wine using modified liquid-liquid extraction with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. *Food Anal. Methods.* 13, 911-922.
- Mantoanelli, J.O.F., Gonçalves, L.M., Pereira, E.A. 2020. Dansyl chloride as a derivatizing agent for the analysis of biogenic amines by CZE-UV. *Chromatographia* 83, 767-778.
- MFDS, Food Code, 2015. Test method validation guidelines. Osong.
- Muñoz-Esparza, N.C., Latorre-Moratalla, M.L., Comas-Basté, O., Toro-Funes, N., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C.. 2019. Polyamines in food. *Front. Nutr.* 6, 108.
- Russell, D.H. 1973. The roles of the polyamines, putrescine, spermidine, and spermine in normal and malignant tissues. *Life Sci.* 13, 1635-1647.
- Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675-690.
- Takao, K., Rickhag, M., Hegardt, C., Oredsson, S., persson, L. 2006. Induction of apoptotic cell death by putrescine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 621-628.