KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 49, No. 4, pp. 355~359 (2017)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2017.49.4.355

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

설탕 사양꿀의 특이 성분 분석

김세건 · 홍인표 · 우순옥 · 장혜리 · 한상미*
국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

Characteristic components of sugar-fed honey compared to natural honey

Se-Gun Kim, In-Phyo Hong, Soon-Ok Woo, Hye-Ri Jang, and Sang-Mi Han*
Department of Agricultural Biology, National Academy Institute of Agricultural Sciences

Abstract We investigated and compared certain chemical properties of Korean natural honey and sugar-fed honey for assessing quality characteristics. The specification component was extracted using an organic solvent, and a single substance was isolated and identified as (E)-2-decenedioic acid. The content of (E)-2-decenedioic acid was 121±5.9 mg/100 g in sugar cane-fed honey and 127±4.5 mg/100 g in sugar beet-fed honey. Natural acacia, chestnut, and multi-floral honey contain 13±0.9, 17±0.6, and 13±1.3 mg/100 g of honey, respectively. Therefore, (E)-2-decenedioic acid was a major component of sugar-fed honey, however, it occurred in trace amounts in natural honey. We conclude that natural and sugar-fed honey can be distinguished by determining the (E)-2-decenedioic acid content.

Keywords: natural nectar honey, sugar-fed honey, column chromatography, ultra performance liquid chromatography (UPLC), (E)-2-decenedioic acid

서 론

벌꿀은 인류가 발견한 가장 오래된 감미료로서 우리 식사생활에 중요한 역할을 해왔을 뿐만 아니라 의약품이나 화장품의 원료로도 널리 사용되어 왔다(1,2). 벌꿀은 꿀벌이 꽃으로부터 꽃꿀을 벌집에 옮겨 수분을 증발 농축시키고, 효소와 산을 첨가한 후, 밀납으로 밀개하여 저장한 것을 말한다(3). 벌꿀은 포도당과 과당을 주성분으로 당류와 수분이 80% 이상을 차지하고 있으나 밀원에서 유래된 유기화합물은 밀원식물이 서식하는 지역의 토양과 기후에 따라 동일한 밀원이라도 차이를 나타나는 것으로 알려져 있으며, 이러한 성분의 차이는 벌꿀의 생리활성에도 차이를 나타낸다(4,5). 각 국가에서는 자국 내에서 생산되는 벌꿀의 성분과 효능에 대한 연구가 매우 활발히 이루어지고 있으며, 마누카꿀과 같은 그 지역 고유의 특성을 나타내는 벌꿀을 개발하여 상품화하고 있는 추세이다(1,6,7).

우리나라에서는 수년간 벌꿀의 가격과 소비는 정체상태인 반면 기후변화와 산업화 등으로 인한 밀원감소로 양봉농가의 경제적 어려움이 가중되고 있다. 또한 FTA 등 농업개방으로 베트남과 같은 국가의 저가 벌꿀을 비롯하여 마누카꿀과 같은 고가의 벌꿀까지 수입됨으로써 국내 양봉산업이 위기에 직면해 있다. 우리나라는 벌꿀 생산비가 높은 국가 중의 하나로 고품질 벌꿀을 생산하여 소비자로부터 신뢰 확보와 해외수출을 위한 기반을 마련하는 게 시급하다.

벌꿀에 대한 국제 규격인 Codex를 비롯하여 EU 규정 등 세계 각국의 벌꿀에 대한 기준과 규격을 설정하고 있으며, 벌꿀의 정의는 '꿀벌들이 꽃꿀, 수액 등 자연물을 채집하여 벌집에 저장한 벌집꿀과 이것에서 채밀한 벌꿀'을 주요 골자로 한다(8,9). 그러나 우리나라 식품공전에서는 꽃이나 자연물에서 수집하여 저장한 천연꿀 뿐만 아니라 설탕물을 주어 꿀벌이 수집한 사양꿀까지 벌꿀류에 포함하고 기준을 설정하였다(10). 이러한 규정은 벌꿀 구성 성분의 이화학적 특성에 근거한 평가만을 수행하고 있어 벌꿀의 순수 여부 확인에는 어려움이 존재한다. 봄부터 가을까지의 천연꿀 채취 후 꿀벌이 겨울을 지내기 위해 꿀벌의 먹이 공급용으로 생성되는 설탕꿀 등의 대체 당류나 이러한 당류나 설탕 등을 먹여 꿀벌이 생성하는 꿀을 사양꿀이라고 한다. 사양꿀은 영양적인 면에서나 가격적인 면에서나 천연꿀과의 차이가 크지만 외관상으로는 천연꿀과 구분이 잘 되지 않기 때문에 천연꿀을 분별할 수 있는 용이한 방법들이 필요한 실정이다. 통상적으로 천연꿀의 진위 여부에 사용되고 있는 검사방법은 식품공전과 AOAC (Association of Official Analytical Chemists)에 등재된 Elemental Analysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA-IRMS)를 활용한 탄소동위원소 비율 측정법이다(8,10). 식물은 탄수화물을 만드는 광합성 경로에 따라 Calvin 회로를 이용하는 C_3 식물군과 Hatch-Slack 회로를 이용하는 C_4 식물군으로 분류하고, 광합성에서 이산화탄소를 고정하는 방식에 따라 C_3, C_4 식물로 나뉘는데 C_3 식물군은 꿀을 생산하는 꽃과 사탕무 등을 말하고, C_4 식물군은 사탕수수, 옥수수, 수수 등이 있다(11). 우리나라 식품공전에서는 천연꿀의 밀원인 C_3 식물군의 탄소동위원소비($^{13}C/^{12}C$ 비율)는 –22.5‰ 이하로, 사양꿀은 –22.5‰ 초과 –15.0‰ 이하의 규격을 설정하였다(10). 그러나 동위원소분석법을 이용했을 때의 문

*Corresponding author: Sang-Mi Han, Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 54863, Korea
Tel: +82-63-238-2896
Tel: +82-63-238-3832,
E-mail: sangmih@korea.kr
Received February 14, 2017; revised March 28, 2017;
accepted March 28, 2017

제점으로 고가의 장비 구입비, 장시간의 검출시간 그리고 무엇보다도 사탕무와 같은 C_4 식물군의 당류 검출은 불가능하다는 점이다.

따라서 이러한 문제점을 보완하기 위하여 UPLC (ultra performance liquid chromatography)를 사용하여 천연꿀과 사양꿀을 구분할 수 있는 사양꿀 특이 성분을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 천연꿀은 2014년과 2015년에 거쳐 국내에서 채취한 밤꿀과 아카시아꿀 그리고 잡화꿀을 한국양봉농협을 통해 구입하여 사용하였고, 사양꿀은 로열젤리를 생산하는 양봉농가로부터 사탕수수 설탕을 사양한 사양꿀과 사탕무 설탕으로 사양한 사양꿀을 각각 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기

꿀벌로부터 특이성분의 분리를 위한 유기용매는 SK chemicals (Seongnam, Korea)사의 제품을, ODS 겔컬럼과 SiO_2 컬럼(40-63 μm, Art. No. 9385), TLC plate (layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Art. No. 5715)는 Merck (Kenilworth, NJ, USA)사의 제품을 사용하였다.

추출 및 분리

사탕수수와 사탕무 사양꿀 10 kg을 에틸아세테이트로 교반기를 사용하여 30분간 3회 반복 추출한 후, 상층액을 감압농축하여 에틸아세테이트 추출물을 각각 20, 24 g을 얻었다. 얻어진 추출물은 메탄올(20→100%)로 ODS gel 컬럼(10×60 cm) 크로마토그래피를 실시하였고 용출액을 TLC를 사용하여 극성이 유사한 8개의 소분획(AHEF1-8)으로 나누었다. 최종적으로 AHEF6 분획을 SiO_2 컬럼(3×60 cm, CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O=90:15:10)으로 정제하여 화합물 1을 10 mg 수득하였다.

물질 동정

사양꿀로부터 분리한 화합물 1의 분자량은 Shimadzu (Kyto, Japan)사의 IT-TOF 질량 분광계를 이용하였으며, 구조분석을 위한 NMR 분광계는 Jeol (Tokyo, Japan)사의 JNM-ECA600 (600 MHz)를 사용하여 화합물을 DMSO-d_6에 녹인 후, 1D-NMR과 2D-NMR을 측정하였다.

Table 1. The analytical conditions of UPLC for (E)-2-decenedioic acid in honeys

Parameter	Condition
Instrument	UPLC (Waters ACQUITY I class)
Column	BEH C18 (1.7 μm, 2.1×50 mm)
Oven Temp.	35°C
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	2 μL
Detection wavelength	210 nm
Mobile phase	(A) MeCN, (B) 0.1%H_3PO_4 (A) 5%; 0-3 min, 5-50%; 2-25 min

함량분석

트랜스-2-데센다이산((E)-2-decenedioic acid)의 표준품(Struchem Co., Ltd., Suzhou, China)을 구입하여 분리한 트랜스-2-데센다이산과 확인 시험하였으며, 천연꿀과 사양꿀에 함유된 트랜스-2-데센다이산의 정량과 정성 분석을 위하여 UPLC를 사용하여 분석하였다. 각각의 벌꿀을 에틸아세테이트로 추출한 다음 여과한 후, 다이오드어레이검출기(diode array detector), 바이너리펌프(binary pump)와 자동시료채취기(autosampler)가 장착된 Waters (Minneapolis, MN, USA)사의 ACQUITY UPLC I-Class에 BEH C18 (Waters, 1.7 μm, 2.1×50 mm) 컬럼을 사용하여 Table 1의 UPLC 분석조건으로 함량 평가를 실시하였다.

결과 및 고찰

트랜스-2-데센다이산 분리 및 동정

사양꿀과 천연꿀의 구분은 탄소동위원소 판별법을 통해 이루어져 왔으나, 사탕무우와 같은 C_4 식물의 당이 혼입되었을 경우엔 구분이 어렵기 때문에 사양꿀을 판별하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다(12,13). 그러나 사양꿀과 천연꿀 간의 성분 비교는 당류 조성과 같은 일반성분 분석 위주였으며, 유기화합물에 관한 연구는 거의 이루어지지 않아, 본 연구를 통해 천연꿀과 사양꿀을 구분 할 수 있는 특이 성분을 밝히고자 하였다. 사탕수수 사양꿀과 사탕무우 사양꿀의 에틸아세테이트 추출물을 대상으로 ODS 및 SiO_2 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 주요성분으로 확인된 화합물 1을 분리하였다. 분리한 화합물 1은 하얀색 가루로

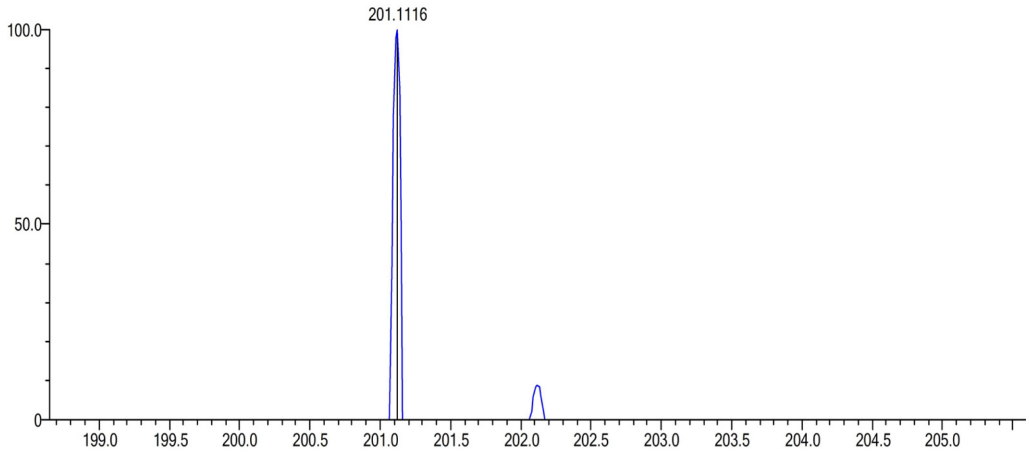

Fig. 1. Mass spectrum (positive ion mode) of compound 1.

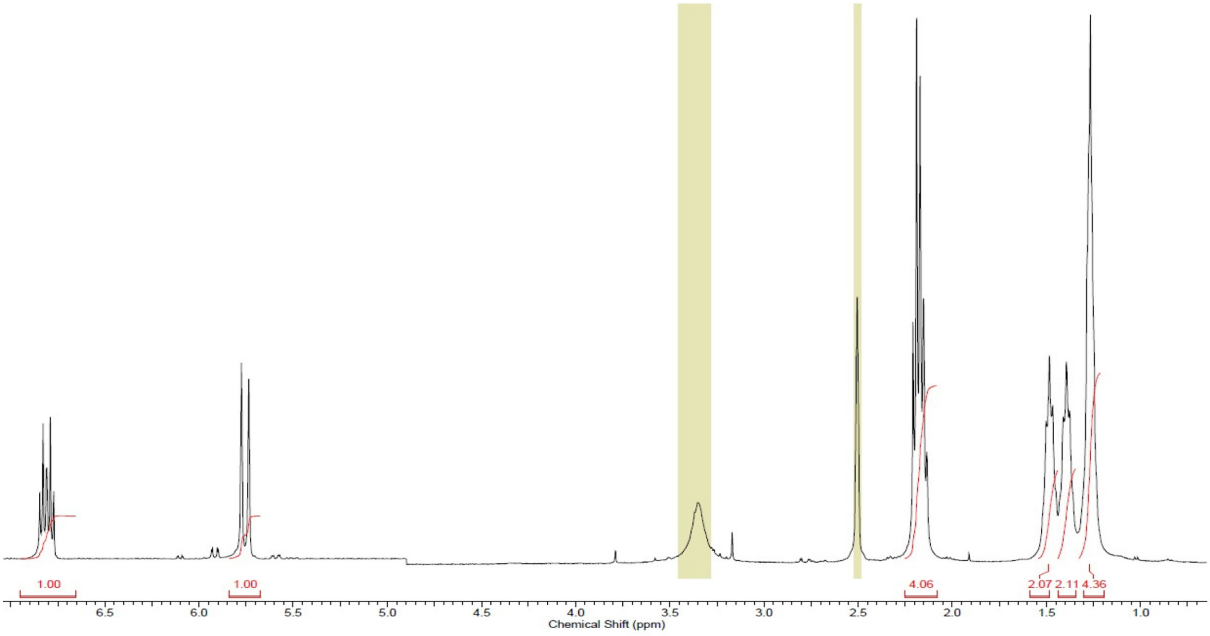

Fig. 2. ^{1}H-NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d_6.

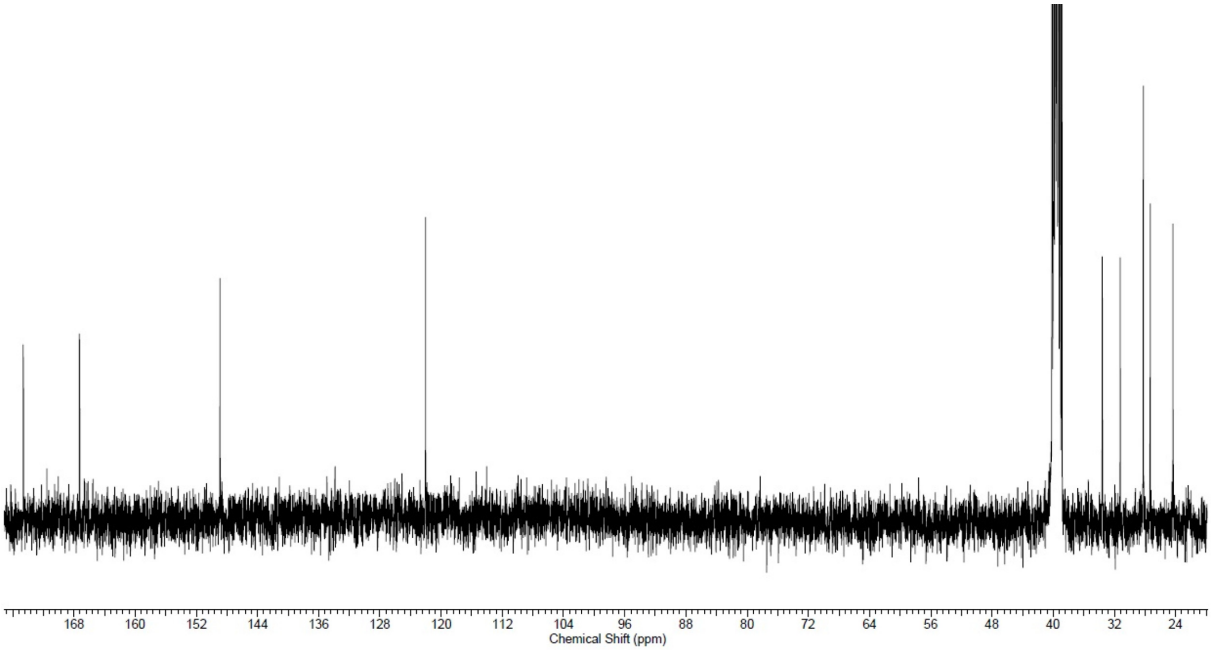

Fig. 3. ^{13}C-NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d_6.

서 분자량은 ESI/MS 분석에서 *m/z* 200 $[M+H]^+$로 확인하였고, 분자식은 $C_{10}H_{16}O_4$이었다(Fig. 1). ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 스펙트럼(Fig. 2)에서 δ 5.76 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-3)과 δ 6.81 (1H, dt, *J*=15.6 Hz, H-2)의 시그널로부터 올레핀 메틴 양성자(olefine methine proton) 2개가 관찰되었으며, 짝짐상수(coupling constant)값이 15.6 Hz로 트랜스형임을 알 수 있었다(Table 2). 또한 δ 1.27-2.21 영역에서 다수의 메틸렌 양성자(methylene proton) 시그널이 관찰되어 한 쌍의 이중결합을 가지고 있는 지방족 사슬 형태의 화합물로 추측할 수 있었다. ^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 스펙트럼(Fig. 3)에서 10개의 탄소 signal이 관측되었고 δ 174.6과 167.3에서 두 개의 카보닐 시그널이 확인되었고, 고자장 영역(24.3-33.6)에서 6개의 탄소 시그널이 관찰되어 탄소 10개의 사슬형 구조를 가지는 불포화 지방산임을 확인하였으며(Table 2), HMBC 스펙트럼을 통하여 양성자와 탄소의 결합 위치를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과를 종합하고 문헌치(14)와 비교하여 화합물 1은 트랜스-2-데센다이산로 규명하였다.

천연꿀과 사양꿀의 성분 비교

사탕무우 사양꿀과 사탕수수 사양꿀에서 확인 된 트랜스-2-데센다이산이 천연꿀에서도 성분이 검출되는지 확인하고자 하였다. 벌꿀의 에틸아세테이트 추출물을 메탄올에 녹여 20 mg/mL로 만든 후 여과하여 분석에 사용하고 트랜스-2-데센다이산을 지표성

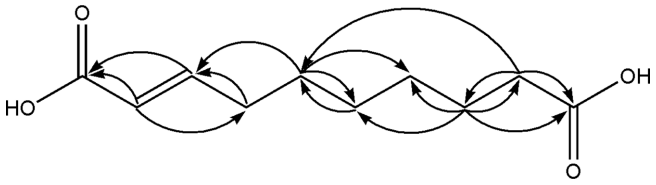

Fig. 4. HMBC correlations (H→C) and chemical structure of compound 1.

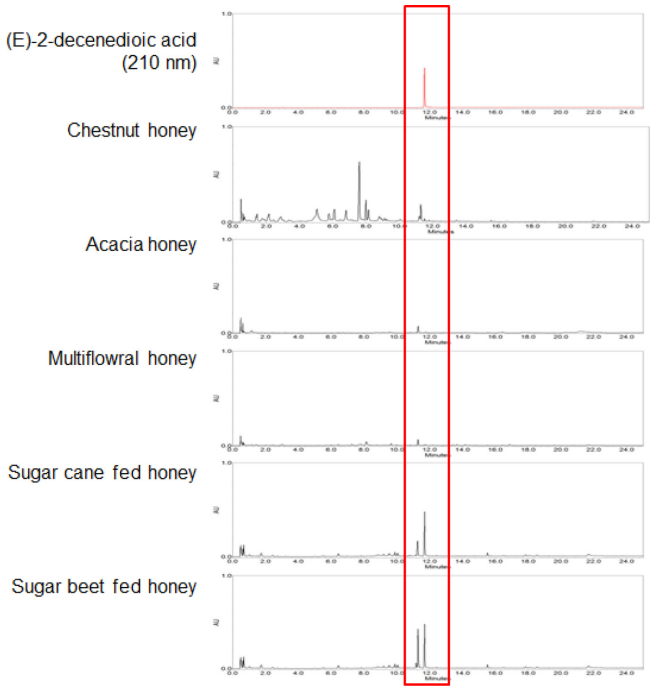

Fig. 5. UPLC chromatograms of (E)-2-decenedioic acid in natural nector acacia, chestnut and multi-floral honeys, and sugar cane fed and sugar beet fed honeys at 210 nm.

분으로 하여 UPLC 분석을 실시하였을 때 지표성분 (E)-2-decenedioic acid는 12분대에 검출되었고 인접한 피크와의 분리도는 우수하였다(Fig. 5). 또한 트랜스-2-데센다이산 표준품과 분리한 (E)-2-decenedioic acid이 UPLC 분석 결과 일치하는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 사탕수수와 사탕무 사양꿀에서 당류를 제외한 유기성분을 UPLC로 분석하여 특이적으로 210 nm에서 가장 큰 흡수를 보이는 트랜스-2-데센다이산 성분이 각각 121±5.9, 127±4.5 mg/100 g 확인 되었다(Table 3). 그러나 트랜스-2-데센다이산 성분 함량은 천연 아카시아꿀에서는 13±0.9 mg/100 g, 밤꿀은 17±0.6 mg/100 g, 그리고 잡화꿀에서는 13±1.3 mg/100 g로 사양꿀에 비하여 매우 적게 포함되어 있었다. 트랜스-2-데센다이산 성분은 사양꿀에서는 주요 성분이지만 천연꿀에서는 미량으로 존재하는 것으로 확인되었다. 트랜스-2-데센다이산은 지방산의 일종으로 로열젤리에서 확인된 바 있으나, 지금까지 벌꿀에서 트랜스-2-데센다이산에 대한 보고는 없었다(15,16). 이러한 결과로 보아 트랜스-2-데센다이산은 밀원에서 유래된 성분이 아닌 것으로 유추되며 이는 꿀벌의 밀선이나 인두선에서 분비된 것으로 사료되었다. 따라서 트랜스-2-데센다이산은 천연꿀과 사양꿀을 구분 할 수 있는 성분으로 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

Table 2. ^{1}H-NMR(600 MHz) and ^{13}C-NMR(150 MHz) data of (E)-2-decenedioic acid in DMSO-d_6

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	174.6	
2	122.0	5.76 (1H, d, *J*=15.6 Hz)
3	148.9	6.81 (1H, dt, *J*=15.6 Hz)
4	31.2	2.15 (2H, m)
5	27.3	1.39 (2H, m)
6	28.2	1.27 (2H, m)
7	28.2	1.27 (2H, m)
8	24.3	1.48 (2H, m)
9	33.6	2.21 (2H, m)
10	167.3	

Table 3. Contents of (E)-2-decenedioic acid in honeys (*n*=5)

Honeys		Contents of (E)-2-decenedioic acid (mg/100 g)
Natural nector	Acacia honey	13±0.9
	Chestnut honey	17±0.6
	Multi-floral honey	13±1.3
Sugar-fed	Sugar cane honey	121±5.9
	Sugar beet honey	127±4.5

요 약

천연꿀과 사양꿀의 성분 특성을 알아보기 위하여 천연 아카시아꿀, 밤꿀 그리고 잡화꿀을 대상으로 하였고, 사양꿀은 사탕수수 사양꿀 그리고 사탕무 사양꿀을 시료로 분석하였다. 사양꿀은 유기용매로 추출하여 단일물질을 분리하고, 이화학 분석을 통해 트랜스-2-데센다이산으로 동정하였다. 또한 UPLC를 이용하여 천연꿀과 사양꿀에서의 트랜스-2-데센다이산 함량을 분석한 결과, 사탕수수 사양꿀과 사탕무 사양꿀은 121±5.9, 127±4.5 mg/100 g 확인된 반면 천연 아카시아꿀에서는 13±0.9 mg/100 g, 밤꿀은 17±0.6 mg/100 g, 그리고 잡화꿀에서는 13±1.3 mg/100 g로 사양꿀에 비하여 상대적으로 매우 적게 포함되어 있음을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 트랜스-2-데센다이산 성분은 사양꿀에서는 주요 성분이지만 천연꿀에서는 미량으로 존재하는 것으로 확인되었으며. 천연꿀과 사양꿀을 구분 할 수 있는 성분으로 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 공동연구 국책기술개발사업 (과제번호:PJ01083701)의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

References

1. Bogdanov S, Jurendica T, Sieber R, Gallmann O. Honey for nutrition and health: a review. Am. J. Clin. Nutr. 27: 677-689 (2008)
2. Ediriweera ERHSS, Premarathna NYS. Medicinal and cosmetic uses of Bee's Honey-A review. Ayu. 33: 178-182 (2012)
3. Crane E. Honey: A comprehensive survey. Heinemann, London,

UK. pp. 157-158 (1979)
4. Kucuk M, Kolauli S, karaoglu S, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chem. 100: 526-534 (2007)
5. White JW, Riethof ML, Subers MH, Kushnir I. Composition of American honeys. Techincal Bulletin No. 1261. United States Department of Agriculture, Washington, D.C., USA (1962)
6. Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni G, Cantalamessa F. Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. Nutr. Res. 26: 130-137 (2006)
7. Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Mazzoni L, Giampieri F. The composition and biological activity of honey: A focus on manuka honey. Foods 3: 420-432 (2014)
8. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 20th ed. Method 998-12. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1995)
9. European Commission. Official controls and enforcement. Honey 2015-16. Brussels, Belgium (2015)
10. MFDS. Food Standard Code. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2014)
11. Padovan GJ, De JD, Rodrigues LP, Marchini JS. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}C/^{12}C$ isotopic ratio. Food Chem. 82: 633-636 (2003)
12. Martin IG, Macias EM, Sánchez JS, Rivera BG. Detection of honey adulteration with beet sugar using stable isotope methodology. Food Chem. 61: 281-286 (1998)
13. Schievano E, Morelato E, Facchin C, Mammi S. Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys. J. Agr. Food Chem. 61: 1747-1755 (2013)
14. Sivakesava S, Irudayaraj J. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. J. Sci. Food Agr. 81: 683-690 (2001)
15. Tsuji J, Yasuda H. Synthesis of 2-decenedioic acid (royal jelly acid) by sequential carbonylation of butadiene catalyzed by a palladium-phosphine complex and dicobalt octacarbonyl. J. Organomet. Chem. 131: 133-135 (1977)
16. Tamotsu F, Toshio S, Toshiyuki I. A novel synthesis of royal jelly acids and queen substance by the five carbon homologation using β-vinyl-β-propiolactone. Chem. Lett. 11: 219-220 (1982)