

Spectrophotometer와 HPLC에 의한 食用달팽이 및 엑기스製品中 黃酸콘드로이틴 分析

藥品分析科 · 食品分析科*

李永根, 尹鐘培, 姜正美*, 嚴柱吾

Spectrophotometric and High-performance Liquid chromatographic Assay of Chondroitin Sulfate in Edible Snail, *Achatina fulica* Bowdich

Drug Analysis Division · Food Analysis Division*

Young-Guen Lee, Jong-Bae Yun, Jung-Mi Kang* and Ju-Oh Um

Abstract

Chondroitin sulfate(ChS) contents in edible snail, *Achatina fulica* Bowdich, and its extract foods were determined by high-performance liquid chromatography(HPLC) and spectrophotometric method. Spectrophotometric method was based on the precipitation of acriflavine by ChS, and HPLC method was based on the detection of two unsaturated disaccharides, 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-4S) and 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose(Δ Di-6S) liberated from ChS by enzymatic digestion with chondroitinase ABC. The ratio of 125 μ mol of sodium hydroxide to mg of ChS and 80 $^{\circ}$ C of reaction temperature were proper for alkali hydrolysis to remove protein residue from ChS. In assay preparation for HPLC method, the optimum concentration of the enzyme chondroitinase ABC was 0.15 unit per 50 μ g of ChS at a fixed reaction time(30min) and pH 8.0 using Tris buffer. ChS content in edible snail was 177.6mg% by spectrophotometric method and 153.5mg% by HPLC method and in an extract food was 71.3mg% and 62.8mg%, respectively.

Key words : edible snail, *Achatina fulica* Bowdich, chondroitin sulfate, HPLC, spectrophotometer, chondroitinase ABC

I. 緒 論

食用달팽이(*Achatina fulica* Bowdich)는 螺旋形의 外殼을 가지는 有肺 腹足類¹⁾로서 原産地는 동아프리카로 알려져 있으며²⁾, 世界 到處에 分布되어 高級食品原料로서 뿐만 아니라 황산콘드로이틴의 存在로 因하여 強藏, 強情식으로도 널리 利用되고 있다³⁾.

황산콘드로이틴은 D-glucuronic acid, N-acetyl-D-glucosamine, 그리고 sulfate가 等量의 물수로 構成되어 있는 多糖類로서 動物 등의 細胞間 組織, 軟骨組織 및 神經組織 등에서 發見^{4,5)}되어 왔으며, 대부분 다른 glycosaminoglycan과 함께 蛋白質에 共有結合하여 proteoglycan으로 存在⁶⁾한다.

食用달팽이의 황산콘드로이틴은 漸質多糖體의 主成分으로 알려져 왔으나⁷⁾, 含量에 관한 科學的 根據는 거의 찾아 보기 어려워, 本 實驗에서는 他 食品 및 藥品중의 황산콘드로이틴을 分析한 몇가지 方法을 土臺로 spectrophotometer 및 HPLC를 利用하여 定量分析을 하였다. 또한, 最近 國內에서 널리 市販되고 있는 달팽이엑기스製品 몇가지를 比較分析하므로써 이들 製品의 달팽이含量을 推定하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

材 料

本 實驗에 使用한 食用달팽이(*Achatina fulica* Bowdich)는 1994년 4월 慶南 淸州市 관문 남동 所在 養殖場에서 體重 41~55g 정도를 選別하여 冷凍運搬하고 脫殼하여 試料로 使用하였다.

試料는 homogenizer로 磨碎하고 情製水로써 200ml로 한 후 0.2 μ m membrane filter로 濾過하여 試驗溶液으로 하였다.

試藥 및 機器

Ch-4S, Ch-6S, Δ Di-4S, Δ Di-6S 및 chondroitinase ABC(E.C.4.2.2.4)는 Sigma社(獨)에서 購入한 것을 利用하였으며

醋酸·醋酸칼슘緩衝液: 醋酸칼슘 7g에 水醋酸 1.5ml와 물을 가하여 녹여 1,000ml로 하였다.

아크리플라빈溶液: 아크리플라빈(중성) 50mg을 醋酸·醋酸칼슘緩衝液 100ml에 녹여 사용하였다.

Tris buffer, pH 8.0, 0.4M: Trizma HCl(Sigma, reagent grade) 3.55g과 Trizma base(Sigma, reagent grade) 2.12g을 정제수에 녹여 100ml로 하였다.

Phosphate buffer, pH 5.0, 0.01M: sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate 1.56g과 ammonium sulfate 3.96g을 물 800ml에 녹이고 orthophosphoric acid로 pH를 5.0으로 調整한 후 全量을 1l로 하였다.

吸光分析을 위한 spectrophotometer는 Varian Cary 13, HPLC分析을 위한 裝置는 Pharmacia LKB사의 2248 pump, LCC 2252 controller, VWM 2141 UV detector 및 2155 column oven을 利用하였으며, HPLC column은 無定形의 silica에 aminopropylmethylsilyl을 結合시킨 충전제(125Å 10 μ m)를 가지는 Waters社의 carbohydrate analysis column(3.9×300mm)을 사용하여 分析하였으며 分析結果는 Shimadzu社의 C-R5A chromatopac으로써 積分하였다.

Spectrophotometer에 의한 定量分析

吸光分析方法은 國立保健院의 基準 및 試驗方法⁹⁾을 準用하여 實施하였다. 즉, sodium chondroitin sulfate A와 B를 105°C에서 4時間 乾燥하고 데시케이터에서 방냉한 후 混合(1:1)한 것을 약 100mg 정도 取하여 물을 가하여 녹이고 100ml로 定容한 후, 이 液 2ml를 精確히 取하고 초산·초산칼슘완충액을 가하여 50ml로 하여 標準液으로 하였다.

試驗溶液 2.0ml을 유리시험관에 精確히 取하고 0.5N NaOH溶液 0.2ml을 正確히 加하고 흔들어서 混合한 후 90°C의 水浴槽에서 30분간 加熱하고 100ml의 容量플라스크에 옮기고 초산·초산칼슘완충액을 가하여 試驗溶液으로 하였다.

標準液 및 試驗溶液 10ml씩을 폴리프로필렌으로 만든 공전원심침전관에 精確히 取하고 각각에 아크리플라빈溶液 3ml을 精確히 加하여 振盪混合하고 5分 정도 방치한 후 멤브레인필터로 濾過하였다. 初流液 3ml을 버리고 다음 3ml을 精確히 取하여 메탄올을 加해 精確히 50ml로 하고, 이 液들에 대하여 초산·초산칼슘완충액 10ml을 가지고 同一한 操作을 하여 얻은 液을 對照液으로 하여 460nm 附近의 吸收極大波長에서 각 吸光度를 測定하였다. 이때, 초산·초산칼슘완충액에서 얻은 對照液은 測定側, 標準液 및 試驗溶液에서 얻은 液은

對照側에 넣어 測定하여 定量하였다.

HPLC에 의한 定量分析

HPLC를 使用한 分析은 Hamano 등⁸⁾의 方法을 準用하였다. 즉, chondroitin-4-sulfate와 chondroitin-6-sulfate의 等量混合物을 물에 녹여 약 50 μ g/ml의 濃度로 한 後 2.0ml을 試驗管에 取하고 tris buffer 2.0ml, chondroitinase ABC(2U/ml) 200 μ l을 각각 加한 後 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 反應시키고 멤브레인필터로 濾過한 것을 定量用 標準溶液으로 하였다.

試驗溶液 2.0ml을 取하여 spectrophotometer에 의한 分析의 경우와 같이 NaOH溶液으로 蛋白質 殘留를 除去하고 20ml로 稀釋한 後, 標準溶液의 境遇와 같이 chondroitinase ABC로써 二糖類로 分解하고 濾過하여 HPLC用 試驗溶液으로 하였다. HPLC分析의 移動狀은 0.01M phosphate buffer(pH 5.0), 檢出機의 波長은 235nm이었다.

III. 結果 및 考察

Spectrophotometer에 의한 分析

生體中の 황산콘드로이틴은 대부분 蛋白質과 結合된 形態로 存在하는 것으로 알려져 있어 蛋白質과 分離시키기 위하여 알칼리처리를 하여야 하며, 이때 適正한 알칼리濃度, 反應溫度 등이 황산콘드로이틴의 生成率에 影響을 줄 것으로 推定되어 食用달팽이를 試料로 하여 여러가지 濃度의 NaOH를 處理하고 spectrophotometer에 의하여 定量한 結果, Fig.1과 같은 結果를 얻었다.

食用달팽이에 알칼리처리를 하므로써 遊離되는 황산콘드로이틴나트륨의 相對的 生成率은 황산콘드로이틴나트륨 1mg당 125 μ mol의 NaOH를 處理한 結果에서 100%로 最大值를 보였으며, 이는 0.5N NaOH溶液 0.25ml에 該當하였다. 이보다 적은 量을 處理한 경우 蛋白質殘留의 分離가 충분치 못한 것으로 나타났으며, 最大 生成率을 이룬 NaOH量보다 處理量이 많을수록 漸進的인 減少가 일어난 結果는 過剩의 알칼리가 황산콘드로이틴의 變性を 誘發하므로써 acriflavine과의 沈澱形成에 障害을 일으킨 것으로 推定되었다. 또한 알칼리처리시 反應溫度의 影響은 Fig.2에서 나타난 바와 같이 80 $^{\circ}$ C 以上の 溫度에서 反應率을 보였다.

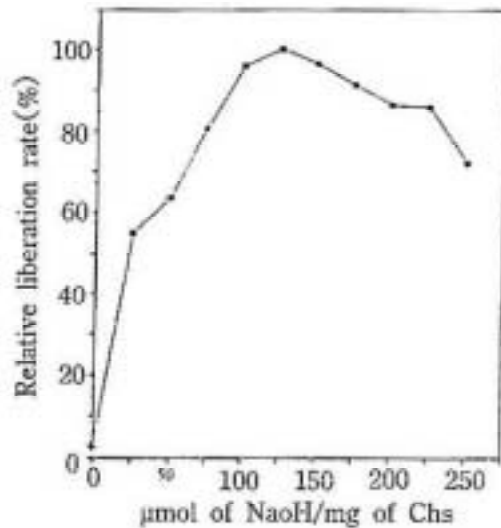


Fig. 1 Effect of NaOH concentration on the rate of liberation of ChS. is edible snail equivalent to 1mg of ChS. Reaction time, 30min : temperature, 80°C

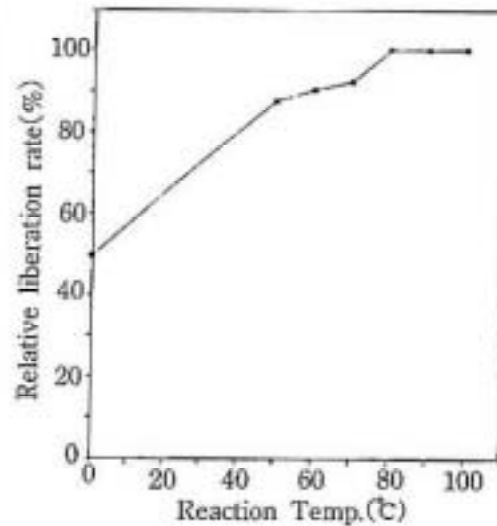


Fig. 2 Effect of reaction temperature of alkali treatment on the rate of liberation of ChS. Conjugated ChS used in this test is same as Fig.1. Reaction time, 30min.

HPLC에 의한 분석

HPLC에 의한 분석은 chondroitin-4-sulfate와 chondroitin-6-sulfate를 chondroitinase ABC로서 不飽和 二糖類인 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-O-sulfo-D-galactose(ΔDi-4S)와 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose(ΔDi-6S)로 각각 分解하고 이를 HPLC로 分析하였다.

Chondroitin-4-sulfate와 chondroitin-6-sulfate의 混合標準品을 chondroitinase ABC로 分解하여 얻은 二糖類를 HPLC로 分析한 chromatogram은 Fig.3의 b와 같이 4.9분과 5.5분대에 서 ΔDi-4S와 ΔDi-6S로 分離되었으며 3분대 以前の 3個 peak는 buffer와 酵素만을 處理한 blank(a)에서도 發見할 수 있어 이들 物質에서 由來된 것을 알수 있었다. 따라서 황산콘드로틴의 定量에는 ΔDi-4S와 ΔDi-6S의 두 피크面積의 合을 定量用 比較值로 하였다.

또한, chondroitinase의 適正濃度を 調査하기 위하여 處理酵素의 역가와 二糖類의 回收率을 比較分析한 結果 Fig.4와 같이 황산콘드로이틴 50μg에 대하여 0.15 unit에 到達할때까지는 處理濃도를 增加할수록 加水分解率이 增加하였으며, 그 濃度 以上에서는 反應率의 變化가 없어 이미 充分한 分解가 이루어진 것으로 判斷하였다.

Tris buffer에서 chondroitinase ABC의 活性은 Hamano 등⁹⁾이 밝힌 바와 같이 最適 pH는 8.0이었으며 反應濃도는 酵素의 製造社인 Sigma사의 勸奨濃度인 37°C에서 最大活性이 나타

났다.

食用달팽이中的 황산콘드로이틴을 분석하기 위하여, spectrophotometer에 의한 분석結果를 根據로한 最適의 NaOH量과 反應溫度에서 蛋白質殘留를 分離한 後 充分한 濃度의 chondroitinase ABC를 處理하고 HPLC로 分析한 結果, Fig.5의 a와 같은 chromatogram을 얻었다. 大部分을 차지하는 큰 peak들은 生體에서 由來된 自然物質들로 推定되며 Δ Di-4S와 Δ Di-6S의 peak들은 큰 peak의 등성에 겹쳐진 작은 peak로 檢出되었다.

食用달팽이를 主原料로 하여 加工한 市中の 달팽이역기스製品을 本 分析法으로 分析한 結果, 代表的인 HPLC chromatogram은 Fig.4의 b와 같이 Δ Di-4S와 같이 Δ Di-6S의 peak가 比쪽 약하지만 感知되었으나, 一部 製品에서는 不純物peak들과의 分離가 充分하지 않아 定量이 어려웠다. 이러한 製品들은 食用달팽이 이외에도 大개 여러가지 漢藥材를 副原料로 添加하므로, 보다 明確한 定量을 위해서는 이 不純物들을 前處理에서 除去하는 方案이 研究되어야 할 것으로 생각되었다.

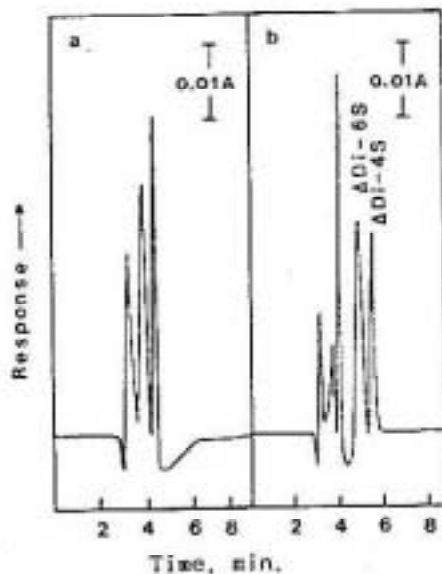


Fig. 3 HPLC chromatograms of unsaturated disaccharides produced from standard ChS(b) and blank(chondroitinase ABC and Tris buffer) (a).
Chondroitin-4-sulfate, 25 μ g/ml ;
Chondroitin-6-sulfate, 25 μ g/ml ;
volume injected, 20 μ l

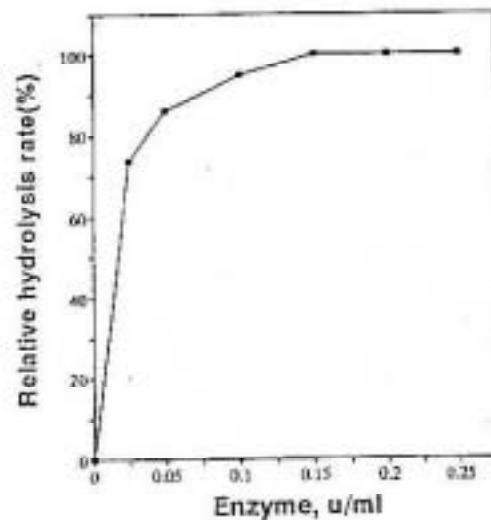


Fig. 4 Effect of chondroitinase ABC activity on the rate of hydrolysis of ChS. The ratio is calculated from the sum of peak areas of Δ Di-4s and Δ Di-6S. Concentration of ChS, 50 μ g/ml ; incubation time, 30 min ; temperature, 37 $^{\circ}$ C

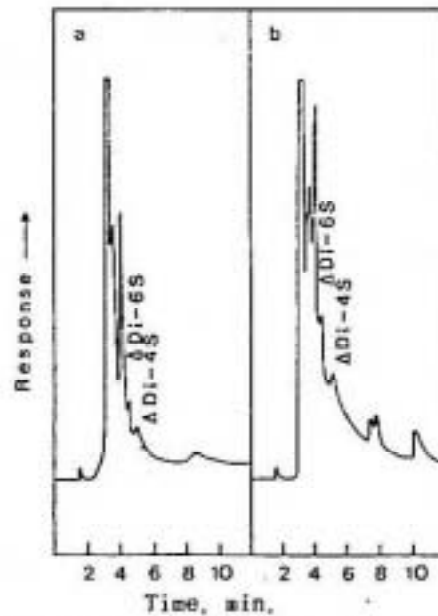


Fig. 5 HPLC Chromatograms of edible snail(a) and an extract food(b) degraded by chondroitinase ABC after alkali treatment.

食用달팽이 및 엑기스제품들의 황산콘드로이틴 함량

Spectrophotometer 및 HPLC를 利用하여 前述한 方法에 따라 食用달팽이와 市販中인 食用달팽이엑기스製品을 對象으로 分析한 황산콘드로이틴의 含量은 Table 1과 같았다.

Table 1. Content of ChS and ratio of Δ Di-4S to Δ Di-6S in edible snail and its commercial extract foods

Sample	Spectrophotometric method	HPLC method
Edible snail	177.6mg%	153.5mg%(0.48) ^a
Extract food A	5.3mg%	—
Extract food B	8.2mg%	—
Extract food C	41.8mg%	35.3mg%(0.41)
Extract food D	71.3mg%	62.8mg%(0.50)
Extract food E	8.0mg%	—

a : values in parentheses are the ratio of Δ Di-4S to Δ Di-6S.

食用달팽이종의 황산콘드로이틴은 spectrophotometer方法에서 177.6mg%, 그리고 HPLC方法에서는 153.5mg%의 比率로 含有되어 있었으며, Δ Di-6S에 대한 Δ Di-4S의 比率는 0.48이었다. chondroitin-4-sulfate와 chondroitin-6-sulfate의 比率는 多糖類의 生理的 機能과 生物種間 差異性에서 重要な 要素로 알려져 있으며, Hjerpe 등²⁰의 分析結果에 의하면 고래와 상어의 軟骨組織에서 抽出한 황산콘드로이틴의 Δ Di-4S/ Δ Di-6S의 比率는 약 3.54와 0.23으로 食用달팽이의 結果와 比較하면 큰 差異가 있었다.

食用달팽이 및 액기스製品的의 모든 試料에서 황산콘드로이틴함량은 HPLC보다 spectrophotometer方法에서 더 많이 나타났으며, 이는 황산콘드로이틴에 의한 acriflavine의 沈澱 分離를 定量原理로 하고 있는 spectrophotometer方法에서 他 多糖類에 의한 沈澱分離도 一部 일어난 結果로 생각되었다.

食用달팽이를 主原料로 하는 市販 액기스製品的의 황산콘드로이틴함량은 D製品이 71.3 mg%(HPLC方法) 및 62.8mg%(spectrophotometer方法)로서 食用달팽이의 황산콘드로이틴 含量을 基準으로 算出하면 이 製品의 食用달팽이함량은 약 40% 정도인 것으로 推算되며, 그 이외의 製品들은 약 24% 및 그 未滿으로 推算되었다. 그리고 HPLC方法에서 定量되지 않은 A, B 및 E 제품은 spectrophotometer分析結果를 勘案하면 食用달팽이를 微量 含有하고 있는 것으로 推定되었다.

IV. 要 約

食用달팽이(*Achatina fulica* Bowdich)의 황산콘드로이틴함량을 分析하기 위하여, 蛋白質 致期를 除去하기 위한 알칼리加水分解의 適正條件 및 chondroitinase ABC의 適正濃度를 調査하고, spectrophotometer와 HPLC를 利用하여 定量한 結果, 황산콘드로이틴을 遊離시키기 위한 알칼리처리 適正比率는 황산콘드로이틴 1mg당 NaOH 125 μ mol, 적정한 反應 溫度는 80°C이고, 過剩의 알칼리는 定量結果를 減少시켰다. 황산콘드로이틴을 不飽和 二糖類로 分解시키기 위한 chondroitinase ABC의 適正역가는 황산콘드로이틴 50 μ g당 0.15 unit이며, 이러한 適正條件에 따라 前處理하고 HPLC로써 分析한 食用달팽이의 황산콘드로이틴은 chondroitin-4-sulfate/chondroitin-6-sulfate의 比率이 0.48이었고 그 含量은 153.5mg%이며, spectrophotometer로써 分析한 含量은 177.6mg%이었다.

市販中인 달팽이액기스제품들의 황산콘드로이틴함량은 한 製品이 약 60mg% 以上으로 가장 많았었고 그 외에는 35mg% 以下이었으며, 황산콘드로이틴함량을 根據로 이들 製品의

달팽이함량을推算하면 가장 많은 것이 약 40%이고 그의 製品들은 25% 以下이었다.

V. 參考 文獻

- 1) Leftwich, A. W. : *A dictionary of zoology*. Constable and Company Limited, London, 450 (1977)
- 2) 權伍吉, 朴甲萬, 李俊相 ; 原色韓國貝類圖鑑. 아카데미서적, 177(1993)
- 3) 이경삼 : 식용달팽이 양식과 요리법. 오성출판사, 179(1992)
- 4) Zapsalis, C. and Beck, R.A. : *Food chemistry and Nutritional biochemistry*. John Wiley & Sons press, New York, 390(1985)
- 5) Krueger, R.C., Hennig, A.K. and Schwartz, N.B. : Two immunologically and developmentally distinct chondroitin sulfate proteoglycans in embryonic chick brain. *J. of Biological Chemistry*, 267(17), 12149(1992)
- 6) Pieter de Waard and Vliegenthart, J.F.G. : Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin-6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. *J. of Biological Chemistry*, 267(9), 6036(1992)
- 7) Davidson, E.A. and Meyer, K. : Chondroitin, a new mucopolysaccharide. *J. of Biological Chemistry*, 211, 605(1954)
- 8) 국립보건원 : 의약품기준 및 시험방법(I) 추보7, 96(1992)
- 9) Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Acki, N. and Yamamoto, S. : High-performance liquid chromatographic assay of chondroitin sulphate in food products. *Analyst*, 114, 891(1989)
- 10) Hjerpe, A., Antonopoulos, C.A. and Engfeldt, B. : Determination of sulphated disaccharides from chondroitin sulphates by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography*, 171, 339(1979)