

HPLC에 의한 市販水産乾製品의 ATP分解生成物の 迅速定量法

李應昊 · 具在根 · 安昌範 · 車庸準 · 吳光秀
釜山水産大學 食品工學科

A Rapid Method for Determination of ATP and Its Related Compounds in Dried Fish and Shellfish Products Using HPLC

Eung-Ho LEE, Jae-Geun KOO, Chang-Bum AHN, Yong-Jun CHA
and Kwang-Soo OH
Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,
Namgu, Pusan, 608 Korea

This paper deals with a rapid method for determination of ATP and its related compounds in fish and shellfish products using high performance liquid chromatography(HPLC). The HPLC used is a HPLC/ALC-224 equipped with UV-spectrophotometer (254 nm) as detector and integrator (Yanagimoto system-1000). The column used is a stainless steel tubing (30.0 cm×3.9 mm i.d.) packed with μ -Bondapak C₁₈. A mixture of 1% triethylamine-phosphoric acid(pH6.5) was used as an eluent and the flow rate of the eluent was controlled at 2 ml/min. For the separation of ATP and its related compounds, a standard mixture of ATP, ADP, AMP, IMP, inosine and hypoxanthine was subjected to HPLC under the above mentioned conditions. Six peaks were obtained with retention times within 20 min, and elution order were hypoxanthine, IMP, inosine, AMP, ADP and ATP. But 5'-IMP and 5'-GMP fractions were not separated by this method.

In generally, IMP content in boiled-dried fish and shellfish products purchased from the market was comparatively higher than that of other nucleotides. Especially, boiled-dried big eye herring marked higher value in IMP content than other boiled-dried ones. Hypoxanthine and inosine were major components of ATP-related compounds in dried products and seasoned-dried ones. And IMP content in seasoned-dried products was higher than that of dried ones. This fact is suggested that a part of IMP in seasoned-dried ones was derived from flavoring matter (MSG, 5'-IMP and 5'-GMP) which is added during the seasoning treatment.

서 론

어패류에 있어서 핵산관련물질은 정미성분으로서도 중요한 성분일 뿐 아니라 이들의 변화는 어패류의 선도를 판정하는 지표로서도 중요시되고 있다. 그런데 핵산관련물질의 정량방법은 현재 이온교환칼럼 크로마토그래피법이 주로 사용되고 있으나 그 조작이 복잡하고 시간이 오래걸리는 단점이 있으므로 본 연구에서는 보다 간단하고 단시간내 핵산관련물질을

분석하기 위해 고속액체 크로마토그래피를 이용한 분석방법을 검토하였으며, 이 방법을 이용하여 시판 수산 건제품의 핵산관련물질 함량을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 시판 각종 건제품을 1984년 4월 16

일 부산자갈치 어시장에서 구입하여 0.03mm 폴리예틸렌 겹주머니에 넣어 냉장고에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

2. 핵산관련물질의 정량방법

핵산관련물질의 추출: 새멸, 캐류 및 새우는 그대로 잘게 절단하여 마쇄하였으며 그 외의 시료는 뼈와 내장을 제거하고 육만을 세절 마쇄하여 ³의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 혼합 마쇄한 시료 약 5g을 취하여 냉 10% 과염소산용액 25ml를 가하고 빙냉하면서 막자사발에서 30분간 마쇄한 후 원심분리(4,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 분리하고 다시 잔사에 10% 과염소산용액 20ml를 가해 빙냉하면서 마쇄한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 이 재추출 조작을 2회 반복하고 분리한 상층액을 모두 합친 후 냉 5N 수산화칼륨용액으로 pH 6.5로 조절한 후 중화된 과염소산용액으로 100ml로 하였다. 약 30분간 방치시킨 후 일부를 취하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 Millipore filter(0.45 μm)로 여과하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)분석용 시료로 하였다.

HPLC 조건: 실험에 사용한 HPLC는 HPLC/ALC-244(Waters Associates Inc., Milford, MA, USA)를 사용하였으며 검출기는 Model 440 Absorbance detector(Waters Associates Inc.)를 사용하였고 이때의 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Conditions for HPLC analysis of nucleotides and their related compounds of fish muscle

Column	μ-Bondapak C ₁₈ (3.9mm i. d. × 30.0 cm)
Mobile phase	1% triethylamine-phosphoric acid (pH6.5)
Flow rate	2.0 ml/min
Chart speed	0.5 cm/min
Detector	UV detector(254 nm)
Temperature	40°C

시약 및 표준용액의 검량선 작성: ATP, ADP, AMP, IMP, inosine, hypoxanthine 표준품은 Sigma Chemical Co., 이동상인 triethylamine은 특급 賜久藥品(株)을 사용하였다. 그리고 검량선 작성은 표준용액을 각각 0.001 mole 용액을 조제하여 3 μl, 5 μl, 7 μl를 각각 주입하여 Integrator(System-1000, 柳本社製)를 사용하여 peak 면적으로 검량선을 작성하였다.

정량: 표준품과 retention time을 비교하고 검량선을 이용하여 각 시료용액의 peak 면적으로서 환산하였다.

수분의 정량: 수분은 상압가열건조법으로 하였다.

결과 및 고찰

HPLC 조건의 검토: HPLC로 nucleoside, nucleotide, 핵산염기의 분석방법으로서는 北田²⁾의 Zobax ODS 칼럼을 이용한 방법, ³⁾의 μ-Bondapak C₁₈ 칼럼을 이용하여 핵산관련물질을 정량한 방법이 있으나, 北田²⁾의 방법은 농도구배를 하는 어려움이 있고, ³⁾의 방법은 ATP, ADP, AMP가 분리되지 않는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 ³⁾의 방법을 개선하여 역상분배칼럼인 μ-Bondapak C₁₈을 사용하여 단일용매 농도로서 핵산 관련물질의 분리를 시도하였다. 즉, 칼럼은 μ-Bondapak C₁₈을 사용하고, 이동상(mobile phase)으로서는 北田²⁾의 방법에 따라 1% triethylamine 용액을 phosphoric acid로써 pH를 조절하여 사용하였는데 triethylamine 농도 보다 phosphoric acid로 pH를 조절한 것이 분리도 및 retention time의 영향이 컸다. 즉 pH가 6.5보다 산성 측에서는 retention time이 길어졌고, 6.5보다 알칼리 측에서는 hypoxanthine(Hx), IMP, inosine(HxR)의 분리능이 떨어졌다. 따라서 이동상의 pH는 6.5로 하였다. 또한 온도의 영향도 크게 작용하여 온도가 40°C보다 낮을 수록 retention time이 길어져 ATP 용출시간이 오래 걸리고 peak가 퍼지게되는 결점이 있으므로 온도는 40°C로 하였다.

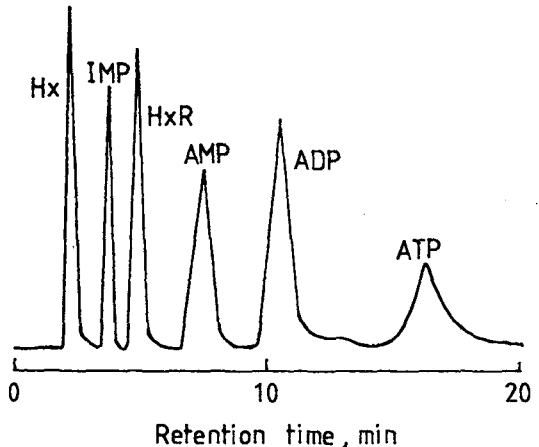


Fig. 1. High performance liquid chromatogram of authentic mixture of ATP and its related compounds

Table 2. The recovery rate of authentic mixture of ATP and its related compounds analysed by HPLC

ATP and its related compounds	Added ($10^{-3}\mu\text{mole}$)	Detected ($10^{-3}\mu\text{mole}$)	Recovery (%)
ATP	2.0	1.87	93.5
ADP	2.0	1.87	93.5
AMP	2.0	1.95	97.5
IMP	2.0	1.91	95.5
Inosine	2.0	1.98	99.0
Hypoxanthine	2.0	2.05	104.0

Table 3. Contents of nucleotide and its related compounds in boiled dried fish products ($\mu\text{mole/g}$, dry basis)

Products		Moisture (%)	Nucleotides and their related compounds					
Korean name	English name		ATP	ADP	AMP	IMP	HxR*	Hx**
Myeol-chi	Anchovy							
Dae-myeol	Large size	23.8	trace	0.01	0.54	10.20	0.21	1.92
Jung-myeol	Middle size	33.5	0.81	3.74	2.07	2.19	2.48	19.17
Sau-myeol	Small size	32.9	0.08	0.82	2.52	17.56	2.92	13.14
Sae-myeol	Least size	35.9	trace	0.18	1.87	13.99	3.10	5.52
Baen-daeng-i	Big eye herring	28.1	trace	0.01	1.68	24.52	4.91	5.67

*: inosine, **: hypoxanthine

Fig. 1에 표준품 혼합액의 크로마토그램을 나타내었는데, Hx, IMP, HxR, AMP, ADP 및 ATP 순으로 분리되었다.

회수율의 검토: 회수율을 검토하기 위하여 임의의 표준용액 혼합액에 ATP, ADP, AMP, IMP, inosine (HxR), hypoxanthine (Hx)의 표준용액(0.001 mole 용액)을 각각 2 μl 씩 첨가하여 HPLC에 주입한 후 peak 면적을 검량선을 이용하여 회수율을 구하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 즉 ATP, ADP는 93.5%, AMP 97.5%, IMP 95.5%, HxR 99.0%, Hx 104.3%로 양호하였다.

자건품의 핵산관련물질 함량: 멸치 및 벤벙이의 자건품 함량을 Table 3에 나타내었다. 대멸의 경우 IMP 함량이 10.20 $\mu\text{mole/g}$ 으로 가장 많았고, 다음이 hypoxanthine, AMP, inosine, ADP 순이었으며, 소멸, 세멸, 벤벙이도 IMP 함량이 각각 17.56 $\mu\text{mole/g}$, 13.99 $\mu\text{mole/g}$, 24.52 $\mu\text{mole/g}$ 으로 가장 많았다. 이는 藤田등⁴⁾이 보고한 바와같이 자숙시로는 생체일 때 IMP가 축적되어 있는 상태에서 자숙되므로 IMP 분해에 관여하는 효소계가 파괴되고 또한 IMP는 열에 대해 안정성이 높아 저장중 안정하게 유지되기 때문이라고 볼 수 있으며 李등⁵⁾의 보고와 잘 일치하고 있다. 중멸의 경우는 다른 멸치에 비해 IMP 함량이 낮았는데 이는 원료의 선도가 떨어진 것을 자숙

하였기 때문이라고 생각된다.

소건품의 핵산관련물질 함량: 소건품의 핵산관련물질 함량은 Table 4에 나타내었다. 소건품은 거의 ATP, ADP, AMP가 inosine, hypoxanthine으로 분해되었으며, 명태, 말쥐치, 굴비, 도루묵, 봉장어, 갯장어, 오징어의 경우는 inosine 함량에 비해 hypoxanthine 함량이 월등히 많으므로 hypoxanthine 축적형임을 알 수 있고, 대구, 가오리, 새우는 hypoxanthine과 inosine 중간 축적형이었다. IMP 함량이 많은 것으로서는 말쥐치, 갯장어, 새우였으며 굴비는 90% 이상이 hypoxanthine이고 IMP가 거의 검출되지 않는 점으로 미루어 보아 굴비의 정미성분엔 핵산관련물질이 거의 관여하지 않는다는 李등⁶⁾의 보고와 잘 일치하고 있다.

연체동물인 오징어, 피문어의 ATP 분해경로는 일반어류와 달리 IMP가 거의 축적되지 않는다는 新井⁷⁾의 보고와 본 실험 조건에서 IMP 용출 위치에 GMP도 나타난 점을 미루어 볼 때 오징어, 피문어의 IMP 값은 IMP와 GMP의 혼합물로 생각되거나 확실한 동정을 하지 못하였으므로 앞으로 더 검토되어야 할 것으로 생각된다. 또한 대구와 명태의 경우 ATP와 AMP가 거의 소실되었는데도 상당량의 ADP가 존재하는 데 이때의 ADP는 ATP가 분해되어 생성되는 유리 ADP가 아니고 小林등⁸⁾이 보고한 myo-

Table 4. Contents of nucleotide and its related compounds in dried sea products

($\mu\text{mole/g}$, dry basis)

Products		Moisture (%)	Nucleotide and its related compounds					
Korean name	English name		ATP	ADP	AMP	IMP	HxR*	Hx**
Dae-gu	Cod	23.7	trace	1.74	0.01	0.01	16.49	10.73
Myeong-tae	Alaska pollack	33.5	0.01	0.74	0.02	0.36	3.85	26.77
Mal-jwi-chi	File fish	22.6	0.09	0.41	0.48	2.64	7.05	18.25
Cham-jo-gi	Yellow corvenia	67.1	trace	trace	trace	trace	1.09	32.28
Do-ru-mug	Sand fish	33.6	0.11	0.18	0.02	trace	0.35	21.17
Gaed-jang-eo	Conger eel	51.0	trace	0.10	0.02	0.78	4.65	12.78
Bung-jang-eo	Sharp tooth eel	43.7	trace	0.27	0.23	6.02	4.25	14.28
Ga-o-ri	Stingray	29.2	trace	trace	trace	0.59	4.51	6.05
O-jing-eo	Squid	27.5	trace	1.34	0.58	0.18	0.01	22.32
Pi-mun-eo	Common octopus	18.7	trace	0.31	0.48	0.37	0.50	5.98
Sae-u	Shrimp	24.6	0.01	0.07	5.23	2.75	15.45	15.45

*: inosine, **: hypoxanthine

Table 5. Contents of nucleotides and its related compounds in seasoned and dried sea products

($\mu\text{mole/g}$, dry basis)

Products		Moisture (%)	Nucleotide and its related compounds					
Korean name	English name		ATP	ADP	AMP	IMP	HxR*	Hx**
Hark-gong-chi	Half beak	19.8	0.02	0.49	0.35	2.85	16.33	16.60
Sang-eo	Shark	65.9	trace	0.06	0.06	0.23	0.47	38.91
Ga-o-ri	Stingray	23.8	trace	0.51	0.32	0.18	0.31	7.75
O-jing-eo	Squid	29.0	trace	7.08	7.39	0.62	1.28	17.24
Mun-eo	Poulop squid	34.8	trace	1.00	11.00	1.00	0.15	22.25
Sae-u	Shrimp	19.4	0.25	0.20	0.60	1.72	7.46	5.52
Gae	Crab	27.4	trace	1.07	6.35	2.78	3.33	0.23
Sae-jo-gae	Heart cockle A	23.6	trace	0.72	1.34	0.69	6.77	9.70
Sae-jo-gae	Heart cockle B	20.5	0.52	2.04	3.26	1.87	9.94	12.84
Ban-ji-rack	Short necked clam	14.7	trace	trace	trace	0.53	0.42	0.93
Baen-deng-i	Mussel	16.0	trace	3.40	4.40	3.49	4.06	17.54

*: inosine, **: hypoxanthine

fibril과 결합하여 효소에 대해 안정한 bound nucleotide라고 생각된다.

조미건제품의 핵산관련물질 함량: 조미건제품의 핵산관련물질 함량은 Table 5에서 보는 바와 같이 어류조미건제품인 학꽂치, 상어육, 가오리육의 핵산관련물질 함량은 hypoxanthine, inosine, IMP, ADP, AMP, ATP 순으로 많았으며, 패류 및 연체동물의 조미건제품인 조미건조 새조개, 조미건조 진주담치, 조미건조 문어, 조미건조 오징어의 핵산관련물질 함량은 hypoxanthine, inosine, AMP, ADP, IMP, ATP 순으로 많았다. 즉 어류에 비해 AMP와 ADP 함량이 많은데 이는 패류 및 연체동물의 ATP 분해경로가 어류와는 달라 AMP deaminase가 거의 없거나 활성이 현저히 약한 대신 adenosine monophosphatase 활성이 높기 때문에 ATP→ADP→AMP→adenine→

inosine→hypoxanthine으로 분해되어 ATP의 감소에 따라 ADP 및 AMP가 축적되고 IMP의 축적은 거의 나타나지 않는다는 新井⁷⁾의 보고로 미루어 볼 때 조미건조 새조개, 조미건조 진주담치, 조미건조 문어, 조미건조 오징어의 ADP 및 AMP의 축적현상은 AMP deaminase의 활성이 거의 없거나 약하기 때문이며 IMP의 값이 비교적 높게 나타난 것은 조미시 핵산계 조미료에 의한 것이라고 추정된다.

또한 갑각류인 새우 및 게의 ATP 분해경로는 주로 일반어류와 같으나, 부경로로서 연체동물 및 패류와 같은 경로로 분해되는 경우도 있으므로 조미건조 게살의 AMP가 축적된 것은 연체동물 및 패류와 마찬가지로 AMP deaminase의 활성이 약하기 때문으로 추측되나 앞으로 더 검토되어야 할 것으로 보이며, 게의 정미성분에 AMP가 glutamine산과 함

문 헌

계 관여한다는 보고⁹⁾와 조미건조 계살의 핵산관련물질 함량중 AMP 함량이 6.35 $\mu\text{mole/g}$ 으로 가장 많은 것으로 볼 때 계의 정미성분에 AMP가 중요한 역할을 할 것이라고 추정된다.

요 약

보다 간편하게 핵산관련물질을 정량할 목적으로 고속액체크로마토그래피를 이용한 정량방법을 검토하였으며, 이 방법을 이용하여 시판 수산건제품의 ATP 분해생성물의 함량을 정량하였다.

장치는 HPLC/ALC-244(Waters Associates Inc.)를, 칼럼은 μ -Bondapak C₁₈ stainless steel column(3.9 mm i.d. \times 30.0 cm)을, 검출기는 UV 검출기(254nm)를, integrator는 Yanagimoto system-1000을 각각 사용하였으며, 이동상(移動相)으로서는 1% triethylamine-phosphoric acid 혼액(pH 6.5, 1% triethylamine 용액을 phosphoric acid 로써 pH 조절)을 사용하고 2 ml/min 로 용리시키는 것이 가장 분리능이 좋았다. 용리되는 순서는 hypoxanthine, IMP, inosine, AMP, ADP 및 ATP의 순이었으며, retention time 20분이내에 분석이 완료되었다. 그러나 5'-IMP와 5'-GMP는 분리되지 않았다.

자건품(煮乾品)은 이노신산(IMP) 함량이 전반적으로 많았는데, 그 중에서도 벤벵이가 가장 함량이 많았다. 소건품(素乾品)에는 inosine, hypoxanthine 함량이 많았으며, 조미건제품(調味乾製品)도 소건품과 비슷한 양상이었으나 IMP 함량이 비교적 높은 것은 조미할 때 핵산제조미료가 첨가되었기 때문이라고 볼 수 있었다.

1. 李應昊·朴榮浩. 1971. 水産食品의 加工 및 保藏中の 核酸關聯物質의 變化에 관한 研究. (1) 마른멸치 製造過程中的 核酸關聯物質의 變化. 韓水誌 4(1), 31-41.
2. 北田善三·佐々木美智子·谷川薫·直井裕·福田忠明·加藤善規·岡本一郎. 1983. 逆相分配クロマト그래フィーによる鮮魚の ATP 關連化合物の分析と鮮度調査. 食衛誌 24(2), 225-229.
3. Eung-Ho Lee, Toshiaki Ohsima and Chiaki Koizumi. 1982. High performance liquid chromatographic determination of K-value as an index of freshness of fish. Bull. of the Japanese Society of Scientific Fisheries 48(2), 225.
4. 藤田孝夫·橋本芳郎. 1960. 食品のイノシン酸含量-3, 各種水産食品. 日水誌 26, 907-950.
5. 李應昊·金世權·錢重均·車庸準·鄭淑鉉. 1981. 市販 마른 멸치의 呈味成分. 韓水誌 14(4), 194-200.
6. 李應昊·金洙賢. 1975. 멸치 製造中の 核酸關聯物質의 變化. 釜山水大研報 14(2), 29-40.
7. 新井健一. 1966. 海産無脊椎動物筋肉中のヌクレオチド. 日水誌 32(2), 174-179.
8. 小林邦男. 1966. 魚肉のヌクレオチド. 日水誌 32(2), 166-170.
9. 池田静徳. 1981. 魚介類の微量成分. 恒星社厚生閣, p. 34.