

Spectrophotometer 및 HPLC에 의한 식용달팽이의 황산콘드로이틴 분석

이영근[†] · 강정미

부산직할시 보건환경연구원

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

Young-Guen Lee[†] and Jung-Mi Kang

Pusan Institute of Health and Environment, Pusan 608-104, Korea

Abstract

Chondroitin sulfate (ChS) contents in edible snail, *Achatina fulica* Bowdich, and its processed meat extracts 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°C of reaction temperature were proper for alkaline 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 (30 min) and pH 8.0 using Tris buffer. ChS content in edible snail was 177.6 mg% by spectrophotometric method and 153.5 mg% by HPLC method and those in the processed meat extract was 71.3 mg% by spectrometric method and 62.8 mg% by HPLC method, respectively.

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

서 론

식용달팽이 (*Achatina fulica* Bowdich)는 나선형의 외각을 가지는 유패 복족류¹⁾로서 원산지는 동아프리카로 알려져있으며²⁾, 세계 도처에 분포되어 고급 식품원료로서 뿐만 아니라 황산콘드로이틴의 존재로 인하여 강장, 강정식으로 널리 이용되고 있다³⁾.

황산콘드로이틴은 D-glucuronic acid, N-acetyl-D-glucosamine, 그리고 sulfate가 등량의 몰수로 구성되어 있는 다당류로서 동물 등의 세포간 조직, 연골조직 및 신경조직 등에서 발견^{4,5)}되어 왔으며, 대부분 다른 glycosaminoglycan과 함께 단백질에 공유결합하여 proteoglycan으로 존재⁶⁾한다.

식용달팽이의 황산콘드로이틴은 점질다당체의 주

성분으로 알려져왔으나⁷⁾, 함량에 관한 과학적 근거는 거의 찾아 보기 어려워, 본 실험에서는 타 식품 및 약품 중의 황산콘드로이틴을 분석한 몇가지 방법을 토대로 spectrophotometer 및 HPLC를 이용하여 정량분석을 하였다. 또한, 최근 국내에서 널리 시판되고 있는 달팽이 엑기스 제품 몇가지를 비교분석하므로써 이들 제품의 달팽이 함량을 추정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 식용달팽이 (*Achatina fulica* Bowdich)는 1994년 4월 경남 진주시 판문남동 소재 양식장에서 체중 41~55g 정도를 선별하여 냉동운반하고

[†]To whom all correspondence should be addressed

탈각하여 시료로 사용하였다.

시료는 homogenizer로 마쇄하고 증류수로써 200ml로 정용한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였다.

시약 및 기기

Ch-4S, Ch-6S, Δ Di-4S, Δ Di-6S 및 chondroitinase ABC (E.C.4.2.2.4)는 Sigma사(독일)에서 구입한 것을 이용하였으며 흡광분석을 위한 spectrophotometer는 Varian Cary 13, HPLC분석을 위한 장치는 Pharmacia LKB사의 2248 pump, LCC 2252 controller, VWM 2141 UV detector 및 2155 column oven을 이용하였으며, HPLC column은 부정형의 silica에 aminopropylmethylsilyl을 결합시킨 충진재 (125 \AA 10 μ m)를 가지는 Waters사의 carbohydrate analysis column (3.9 \times 300mm)을 사용하여 분석하였으며 분석결과는 Shimadzu사의 C-R5A chromatopac으로써 적분하였다.

Spectrophotometer에 의한 정량분석

흡광분석방법은 국립보건원의 기준 및 시험방법⁹⁾에 따라서 실시하였다. 즉, sodium chondroitin sulfate A와 B를 105°C에서 4시간 건조하고 데시케이타에서 방냉한 후 혼합(1:1)한 것을 약 100mg 정도 취하여 물을 가하여 녹이고 100ml로 정용한 후, 이 액 2ml을 정확히 취하고 초산·초산칼륨완충액(초산칼륨 7g+빙초산 1.5ml/1000ml 증류수)을 가하여 50ml로 하여 표준액으로 하였다.

시험용액 2.0ml을 유리시험관에 정밀히 취하고 0.5N NaOH용액 0.2ml을 정확히 가하고 흔들어 혼합한 후 90°C의 수욕조에서 30분간 가열하고 100ml의 용량 플라스크에 옮기고 초산·초산칼륨완충액을 가하여 시험용액으로 하였다.

표준액 및 시험용액 10ml씩을 폴리프로필렌으로 만든 광전원실 칩전관에 정확히 취하고 각각에 아크릴플라민용액(중성 아크릴플라민 50mg/초산·초산칼륨완충액 100ml) 3ml을 정확히 가하여 진탕혼합하고 5분 정도 방치한 후 멤브레인 필터로 여과하였다. 초유액 3ml을 버리고 다음 3ml을 정확히 취하여 매탄올을 가해 정확히 50ml로 하고, 이 액들에 대하여 초산·초산칼륨완충액 10ml을 가지고 동일한 조작을 하여 얻은 액을 대조액으로 하여 460nm 부근의 흡수 극대파장에서 각 흡광도를 측정하였다. 이때, 초산·초산칼륨완충액에서 얻은 대조액은 측정축, 표준액 및 시험용액에서 얻은 액은 대조축에 넣어 측정하여 정량하였다.

HPLC에 의한 정량분석

HPLC를 이용한 분석은 Hamano 등¹⁰⁾의 방법을 준용하였다. 즉, chondroitin 4-sulfate와 chondroitin 6-sulfate의 동량혼합물을 물에 녹여 약 50 μ g/ml의 농도로 한 후 2.0ml을 시험관에 취하고 tris buffer (pH 8.0, 0.4 M Trizma HCl 3.55g+Trizma base 2.12g/100ml 증류수) 2.0ml, chondroitinase ABC (2U/ml) 200 μ l을 각각 가한 후 37°C에서 30분간 반응시키고 멤브레인 필터로 여과한 것을 정량용 표준용액으로 하였다.

시험용액 2.0ml을 취하여 spectrophotometer에 의한 분석의 경우와 같이 NaOH용액으로 단백질을 제거하고 20ml로 희석한 후, 표준용액의 경우와 같이 chondroitinase ABC로써 이당류로 분해하고 여과하여 HPLC용 시험용액으로 하였다. HPLC분석의 이동상은 0.01M phosphate buffer (pH 5.0), 검출기의 파장은 235nm이었다.

결과 및 고찰

Spectrophotometer에 의한 분석

생체 중의 황산콘드로이틴은 대부분 단백질과 결합된 형태로 존재하는 것으로 알려져있어¹¹⁾ 단백질과 분리시키기 위하여 알칼리처리를 하여야하며, 이때 적절한 알칼리농도, 반응온도 등이 황산콘드로이틴의 생성율에 영향을 줄 것으로 추정되어 식용달팽이를 시료로

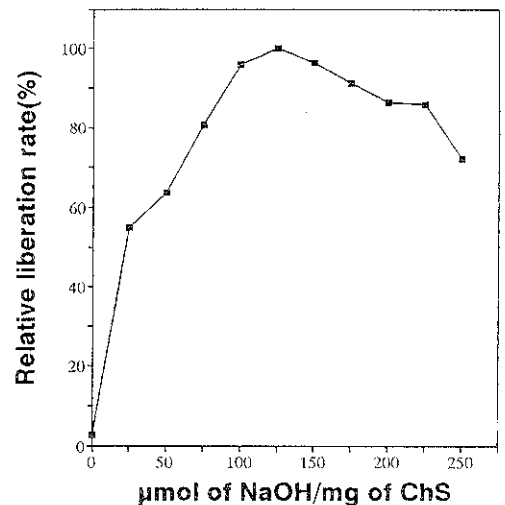


Fig. 1. Effect of NaOH concentration on the rate of liberation of ChS.

Conjugated ChS used in this test is edible snail equivalent to 1mg of ChS. Reaction time, 30min; temperature, 80°C.

하여 여러가지 농도의 NaOH를 처리하고 spectrophotometer에 의하여 정량한 결과, Fig. 1과 같은 결과를 얻었다.

식용달팽이에 알칼리처리를 하므로써 유리되는 황산콘드로이틴나트륨의 상대적 생성율은 황산콘드로이틴나트륨 1mg당 125 μ mol의 NaOH를 처리한 결과에서 100%로 최대치를 보였으며, 이는 0.5N NaOH용액 0.25ml에 해당하였다. 이 보다 적은 양을 처리한 경우 단백질잔기의 분리가 충분치 못한 것으로 나타났으며, 최대 생성율을 이룬 NaOH량 보다 처리량이 많을수록 점진적인 감소가 일어난 결과는 과잉의 알칼리가 황산콘드로이틴의 변성을 유발하므로써 acriflavine과의 침전형성에 장애를 일으킨 것으로 추정되었다. 또한 알칼리처리시 반응온도의 영향은 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 80°C이상의 온도에서 최대 반응율을 보였다.

HPLC에 의한 분석

HPLC에 의한 분석은 chondroitin-4-sulfate와 chondroitin-6-sulfate를 chondroitinase ABC로써 분포화이당류인 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-4S)와 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-6S)로 각각 분해하고 이를 HPLC로 분석하였다.

Chondroitin-4-sulfate와 chondroitin-6-sulfate의 혼합표준품을 chondroitinase ABC로 분해하여 얻은 이당

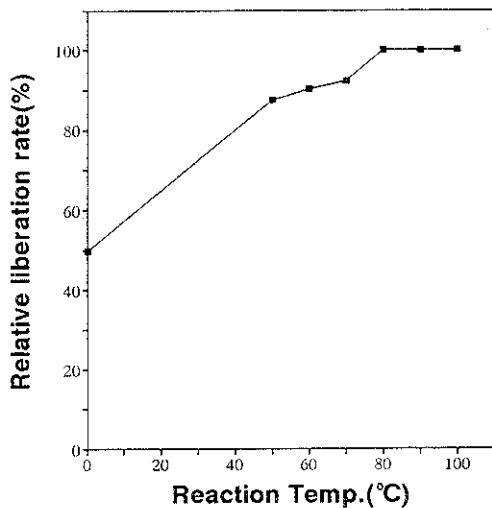


Fig. 2. Effect of reaction temperature of alkaline treatment on the rate of liberation of ChS. Conjugated ChS used in this test is same as Fig. 1. Reaction time, 30min.

류를 HPLC로 분석한 chromatogram은 Fig. 3의 b와 같이 4.9분과 5.5분대에서 Δ Di-4S와 Δ Di-6S로 분리되었으며 3분대 이전의 3개 peak는 buffer와 효소만을 처리한 blank (a)에서도 발견할 수 있어 이들 물질에서 유래된 것을 알 수 있었다. 따라서 황산콘드로이틴의 정량에는 Δ Di-4S와 Δ Di-6S의 두 피크면적의 합을 정량용 비교치로 하였다.

또한, chondroitinase의 적정농도를 조사하기 위하여 처리효소의 역가와 이당류의 회수율을 비교분석한 결과 Fig. 4와 같이 황산콘드로이틴 50 μ g에 대하여 0.15unit에 도달 할 때 까지는 처리농도를 증가할수록 가수분해율이 증가하였으며, 그 농도 이상에서는 반응율의 변화가 없어 이미 충분한 분해가 이루어진 것으로 판단되었다.

Tris buffer에서 chondroitinase ABC의 활성은 Hamano 등²⁾이 밝힌 바와 같이 최적 pH는 8.0이었으며 반응온도는 효소의 제조사인 Sigma사의 권장온도인 37°C에서 최대활성이 나타났다.

식용달팽이 중의 황산콘드로이틴을 분석하기 위하여, spectrophotometer에 의한 분석결과를 근거로 한 최

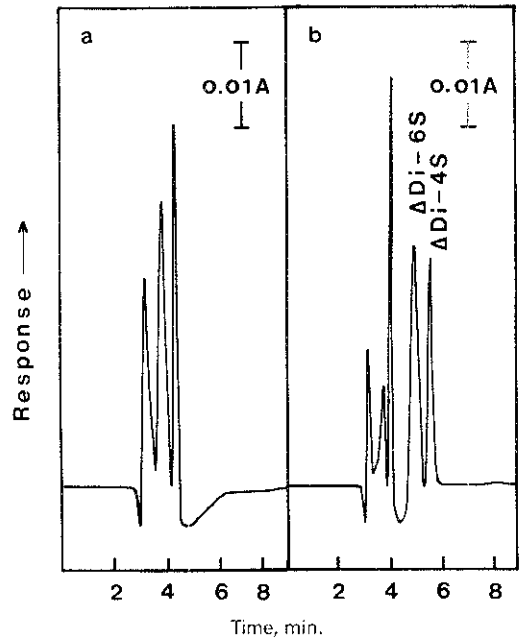


Fig. 3. HPLC chromatograms of unsaturated disaccharides produced from standard ChS (b) and blank (chondroitinase ABC and Tris buffer) (a). Chondroitin-4-sulfate, 25 μ g/ml Chondroitin-6-sulfate, 25 μ g/ml Volume injected, 20 μ l

적의 NaOH량과 반응온도에서 단백질잔기를 분리한 후 충분한 농도의 chondroitinase ABC를 처리하고 HPLC로 분석한 결과, Fig. 5의 a와 같은 chromatogram을

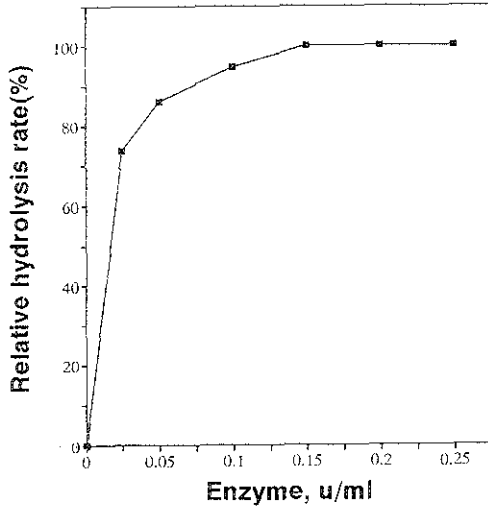


Fig. 4. Effect of chondroitinase ABC activity on the rate of hydrolysis of ChS. The ratio is calculated from the sum of peak areas of Δ Di-4S and Δ Di-6S. Concentration of ChS, 50 μ g/ml; incubation time, 30 min; temperature, 37 $^{\circ}$ C.

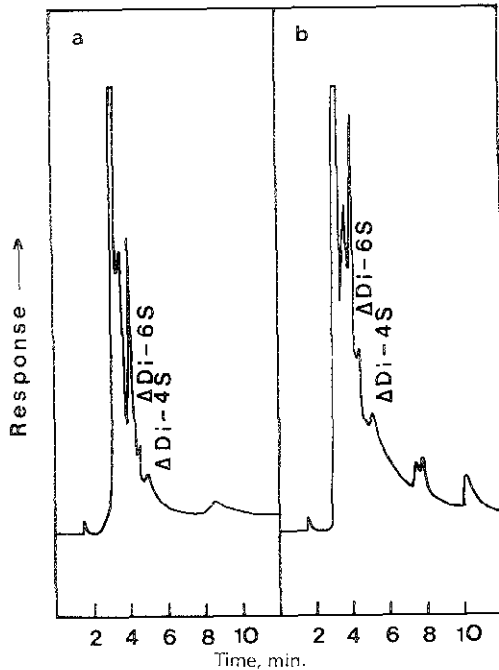


Fig. 5. HPLC chromatograms of edible snail(a) and an extract food(b) degraded by chondroitinase ABC after alkaline treatment.

얻었다. 대부분을 차지하는 큰 peak들은 생체에서 유래된 천연물질들로 추정되며 Δ Di-4S와 Δ Di-6S의 peak들은 큰 peak의 등성에 겹쳐진 작은 peak로 검출되었다.

식용달팽이를 주원료로 하여 가공한 시중의 달팽이 엑기스제품을 본 분석법으로 분석한 결과, 대표적인 HPLC chromatogram은 Fig. 5의 b와 같이 Δ Di-4S와 Δ Di-6S의 peak가 비록 약하지만 감지되었으나, 일부 제품에서는 불순물 peak들과의 분리가 충분하지 않아 정량이 어려웠다. 이러한 제품들은 식용달팽이 이외에도 대개 여러가지 한약재를 부원료로 첨가하므로, 보다 명확한 정량을 위해서는 이 불순물들을 전처리에서 제거하는 방안이 연구되어야 할 것으로 생각되었다.

식용달팽이 및 엑기스제품들의 황산콘드로이틴 함량

Spectrophotometer 및 HPLC를 이용하여 전술한 방법에 따라 식용달팽이와 시판 중인 식용달팽이 엑기스제품을 대상으로 분석한 황산콘드로이틴의 함량은 Table 1과 같았다.

식용달팽이 중의 황산콘드로이틴은 spectrophotometer방법에서 177.6mg%, 그리고 HPLC방법에서는 153.5mg%의 비율로 함유되어 있었으며, Δ Di-6S에 대한 Δ Di-4S의 비율은 0.48이었다. Chondroitin-4 sulfate와 chondroitin-6 sulfate의 비율은 다당류의 생리적 기능과 생물중간 차이성에서 중요한 요소로 알려져있으며, Hjerpe 등¹⁰⁾의 분석결과에 의하면 고래와 상어의 연골 조직에서 추출한 황산콘드로이틴의 Δ Di-4S/ Δ Di-6S의 비율은 약 3.54와 0.23으로 식용달팽이의 결과와 비교하면 큰 차이가 있었다. 식용달팽이 및 엑기스제품의 모든 시료에서 황산콘드로이틴 함량은 HPLC 보다 spectrophotometer방법에서 더 많이 나타났으며, 이는 황산콘드로이틴에 의한 acriflavine의 침전분리를 정량원리로 하고 있는 spectrophotometer방법에서 타 다당류에 의한 침전분리도 일부 일어난 결과로 생각되었다.

Table 1. Content of ChS and ratio of Δ Di-4S to Δ Di-6S in edible snail and its processed meat extracts

| Sample | Spectrophotometric method (mg%) | HPLC method (mg%) |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Edible snail | 177.6 \pm 6.2 ^a | 153.5 \pm 3.8 (0.48) ^b |
| Processed meat extract A | 5.3 \pm 1.2 | |
| Processed meat extract B | 8.2 \pm 1.4 | |
| Processed meat extract C | 41.8 \pm 2.1 | 35.3 \pm 2.7 (0.41) |
| Processed meat extract D | 71.3 \pm 3.3 | 62.8 \pm 2.8 (0.50) |
| Processed meat extract E | 8.0 \pm 2.0 | |

^aMean \pm S.D. of triplicate measurement

^bValues in parentheses are the ratio of Δ Di-4S to Δ Di-6S

식용달팽이를 주원료로 하는 시판 액기스제품들의 황산콘드로이틴 함량은 D제품이 71.3mg% (HPLC방법) 및 62.8mg% (spectrophotometer방법)로서 식용달팽이의 황산콘드로이틴 함량을 기준으로 산출하면 이 제품의 식용달팽이 함량은 약 40% 정도인 것으로 추산되며, 그 이외의 제품들은 약 24% 및 그 미만으로 추산되었다. 그리고 HPLC방법에서 정량되지 않은 A, B 및 E 제품은 spectrophotometer 분석결과를 감안하면 식용달팽이를 미량 함유하고 있는 것으로 추정되었다.

요 약

식용달팽이 (*Achatina fulica* Bowdich)의 황산콘드로이틴 함량을 분석하기 위하여, 단백질잔기를 제거하기 위한 알칼리 가수분해의 적정조건 및 chondroitinase ABC의 적정농도를 조사하고, spectrophotometer와 HPLC를 이용하여 정량한 결과, 황산콘드로이틴을 유리시키기 위한 알칼리처리의 적정비율은 황산콘드로이틴 1mg당 NaOH 125 μ mol, 적정한 반응온도는 80°C 이고, 과잉의 알칼리는 정량결과를 감소시켰다. 황산콘드로이틴을 불포화이당류로 분해시키기 위한 chondroitinase ABC의 적정역가는 황산콘드로이틴 50 μ g당 0.15unit이며, 이러한 적정조건에 따라 전처리하고 HPLC 로써 분석한 식용달팽이의 황산콘드로이틴은 chondroitin-4-sulfate/chondroitin-6-sulfate의 비율이 0.48이었고 그 함량은 153.5mg%이며, spectrophotometer로써 분석한 함량은 177.6mg%이었다. 시판 중인 달팽이액기스제품들의 황산콘드로이틴 함량은 한 제품이 약 60mg% 이상으로 가장 많았었고 그외에는 35mg% 이하이었으며, 황산콘드로이틴 함량을 근거로 이들 제품의 달팽이 함량을 추산하면 가장 많은 것이 약 40%이고 그의 제품들은 25% 이하이었다.

문 헌

1. Leftwich, A. W. : *A dictionary of zoology*. Constable and Company Limited, London, p.450 (1977)
2. 권오길, 박갑만, 이준상 : 원색한국패류도감. 아카데미서적, p.177 (1993)
3. 이경삼 : 식용달팽이 양식과 요리법. 오성출판사, p. 179 (1992)
4. Zapsalis, C. and Beck, R. A. : *Food chemistry and nutritional biochemistry*. John Wiley and Sons Press, New York, p.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. Biological Chemistry*, **267**, 12149 (1992)
6. Pieter de Waard and Vliegthart, J. F. G. : Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin-6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. *J. Biological Chemistry*, **267**, 6036 (1992)
7. Davidson, E. A. and Meyer, K. : Chondroitin, a new mucopolysaccharide. *J. Biological Chemistry*, **211**, 605 (1954)
8. 국립보건원 : 의약품기준 및 시험방법 (I). 후보, **7**, 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. Chromatography*, **171**, 339 (1979)

(1994년 8월 16일 접수)