

## 키토올리고당의 측정법으로 비색법과 HPLC법의 비교

강길진 · 조정일\*

식품의약품안전청 광주지방청, \*조선이공대학 식품공학과

### Comparison of Colorimetry and HPLC Method for Quantitative Analysis of Chitooligosaccharide

Kil-Jin Kang and Jung-II Cho\*

Korea Food & Drug Administration, Kwangsan-ku, Kwangju, 506-050 Korea

\*Department of Food Technology, Chosun College of Science and Technology

#### Abstract

The quantitative analysis of chitooligosaccharide was compared to using colorimetry and HPLC method. HPLC method required less than 10mins per sample in analytical time of glucosamine and its the recovery rate was 98.4% (10 mg/ml, w/v). Also there was no the effects of interfering substances(false positive response) by HPLC method. The content of chitooligosaccharide in processed chitooligosaccharide products obtained using HPLC showed lower levels compared to colorimetry. Thus, HPLC method was more sensitive, effective and precise than the colorimetry currently used to determine the glucosamine of chitooligosaccharide.

Key words : chitooligosaccharide, glucosamine, HPLC, colorimetry

#### 서 론

키토산은 게, 새우 등 갑각류의 껍질이나 곤충류의 cuticle층, 오징어나 krill과 같은 연체동물의 골격과 껍질 등에 존재하는 키틴을 고온에서 강 알칼리로 처리하여 탈 아세틸화로 생성된 천연고분자 물질이다. 이것은 glucosamine의  $\beta$ -1,4 다당체로서 분자 내에 유리 아미노기가 존재하며 효소 등으로 좀 더 분해하면 키토올리고당으로 된다. 이러한 키토산이나 키토올리고당은 식품산업분야, 의약품 및 화장품 등에 이르기까지 광범위하게 응용할 수 있는 신소재로서 주목을 받고 있다. 키토산 및 키토올리고당은 항균작용<sup>(1-3)</sup>, 항암작용<sup>(4-5)</sup>, 면역강화작용<sup>(6,7)</sup>, 유산균 증진작용<sup>(8)</sup> 등 다양한 생리적 기능이 알려져 있다. 키토산은 체내 흡수에 다소 문제가 있어서 최근 들어 체내 흡수가 빠른 키토올리고당에 대한 연구<sup>(2,9)</sup>들이 활발해 지면서 키토올리고당을 이용한 제품개발에도 많은 연구들이 이루

어지고 있다<sup>(8,9)</sup>.

현재 국내에서는 건강보조 식품으로 키토산 가공식품을 규정하고 있는데, 이는 키토올리고당이 20%(w/w) 이상 함유하여야 한다<sup>(10)</sup>. 키토산 가공식품의 품질 관리는 키토올리고당의 함량이 매우 중요한데, 그 함량은 키토올리고당을 단당인 glucosamine으로 분해하고 분해된 glucosamine을 *p*-dimethylamino-benzaldehyde와 반응시켜 비색에 의한 방법으로 정량하고 있다<sup>(10)</sup>. 그러나 이 방법은 반응시 주의를 요하는 숙련도와 3시간 이상의 많은 시간이 요구되는 등 정확도 측면에서도 다소 문제가 있다.

따라서 본연구에서는 신속하고 정확하게 키토올리고당을 정량할 수 있는 방법으로 HPLC에 의한 방법을 확립하고 기존의 비색법과 비교 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

D-glucosamine 표준품은 Sigma사의 D-glucosamine-HCl를 사용하였으며 키토올리고당은 국내의 SK사, 진식품 및 미국의 Tishcon Corp사의 것을 사용하고 키토산 제품으로는 국내 바이오테크사의 제품을 사용하였다.

Corresponding author : Kil-Jin Kang, Korea Food & Drug Administration, Woosan-dong 1582-2, Kwangsan-ku, Kwangju, 506-050 Korea  
Tel : 82-62-955-7355  
Fax : 82-62-955-7305  
E-mail : kjkang@kfda.go.kr

키토올리고당의 D-glucosamine화

일정량(0.05-0.1 g)의 시료를 물에 녹여 중화시키고 glass filter(3G3)로 여과한 후 여액을 100 mL로 하였다. 이때 지방성분이 있는 시료는 탈지한 후 사용하였다. 여액 10 mL에 HCl 7 mL와 H<sub>2</sub>O 3 mL를 가하고 혼합시킨 후 5 mL를 취하여 탈기밀봉 후 110°C에서 24시간 반응으로 키토올리고당을 glucosamine으로 분해하였다<sup>(10)</sup>. 분해된 시료는 60°C 감압 하에서 농축하여 HCl과 H<sub>2</sub>O를 제거한 후 비색법은 몰로 녹여 사용하고, HPLC법은 65% CH<sub>3</sub>CN(HPLC용 용매)로 녹이고 여과하여 사용하였다.

비색법에 의한 키토올리고당의 정량

키토올리고당에서 glucosamine으로 분해한 여액 1 mL를 취하여 acetyl acetone 1.5 mL에 1.2 N 탄산나트륨 50 mL을 가하여 만든 액 2 mL와 혼합한 후 96°C에서 1시간 가열하고 흐르는 물에 냉각시켰다. 다시 96% ethyl alcohol 20 mL을 가하고 p-dimethylamino-benzaldehyde 1.6 g에 HCl 3 mL 그리고 96%(v/v) ethyl alcohol 30 mL을 가하여 만든액 2 mL을 가해서 혼합한 후 실온에서 2시간 방치한 다음에 530 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>(10)</sup>.

HPLC에 의한 키토올리고당의 정량

HPLC을 이용한 키토올리고당의 정량은 키토올리고당을 D-glucosamine화한 다음, D-glucosamine을 HPLC에 의해 분석하여 정량하였다.

HPLC 분석조건으로 사용된 column은 Bondclone10 NH<sub>2</sub>(300×3.9 mm, 10 micron, phenomenex), 이동상은 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 65 : 35을 사용하였으며, 검출기는 RI를 그리고 유속은 0.8 mL/min으로 하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의하여 분석된 D-glucosamine의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. D-glucosamine의 표준품인 D-glucosamine-HCl을 glucosamine으로의 분해과정을 거친 후 HPLC로 분석한 결과가 retention time 7.2분에서 단일 피크를 보였으며 키토올리고당도 같은 조건으로 분석하였을 때 retention time 7.2분에서 피크를 보였다.

D-glucosamine 정량시 소요되는 시간은 비색법이 96°C에서 1시간 가열→냉각→2시간 반응→흡광도 측정 등으로 4시간 이상이 소요되나 HPLC법은 10분 이내에 가능하였다.

Fig. 2는 각 농도별로 분석한 D-glucosamine의 결과

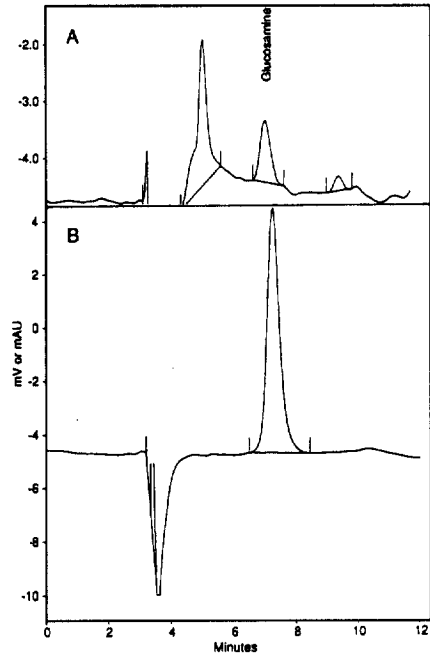


Fig. 1. HPLC chromatograms of D-glucosamine(B) and chitosan processed food(chitooligosaccharide)(A).

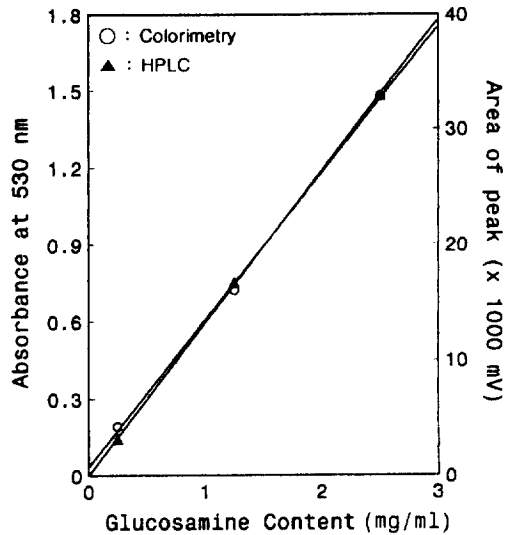


Fig. 2. Comparison of glucosamine analyzed by colorimetry and HPLC.

로서 비색법과 HPLC법을 비교하였다. HPLC에 의해 분석한 D-glucosamine은 각 농도별로 비례하여 일직선을 보이면서 증가하였으며 비색법과 비교하였을 때 매우 잘 일치하였다. 상관관계를 나타내는 R값은 HPLC법이 0.9999, 비색법이 0.9987였다.

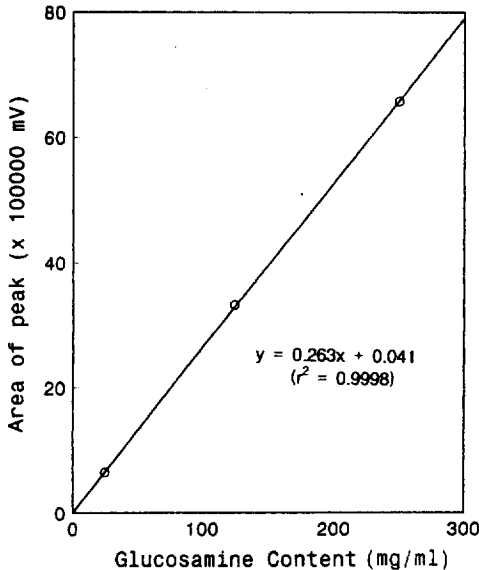


Fig. 3. Standard curve of glucosamine analyzed by HPLC.

따라서 D-glucosamine은 HPLC에 의한 정량이 가능하였으며 또한 비색법보다도 더 짧은 시간에 더 용이하게 분석이 가능하였다.

Fig. 3은 D-glucosamine을 고농도(100~300 mg/mL)에서 HPLC로 분석한 결과이다. HPLC에 의한 D-glucosamine의 분석은 고농도에서도 농도가 증가함에 따라 HPLC peak 면적이 일직선으로 비례하였다.

비색법은 흡광도의 한계치 때문에 저농도에서만 D-glucosamine의 분석이 가능하지만 HPLC법은 고농도로도 D-glucosamine의 분석이 가능함을 보여주고 있다.

비색법과 HPLC법에 의한 D-glucosamine의 회수율을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 10 mg/mL, 20 mg/mL, 50 mg/mL 농도에서 D-glucosamine에 대한 비색법의 회수율은 89.8~91.5%였지만 HPLC법의 회수율은 96.3~98.4%였다. 각 농도에서 D-glucosamine의 회수율은 비색법보다 HPLC법이 더 높은 값을 보였다. 이것은 HPLC에 의한 정량이 더 정확하다는 것을 알 수 있다.

일반 유통중인 키토산 가공식품 및 키토산 중의 키토올리고당을 비색법과 HPLC법으로 정량한 결과는 Table 2에서 볼 수 있다.

SK사의 키토올리고당은 비색법으로는 28.4%(w/w)였으나 HPLC법으로는 25.1%(w/w)였으며, 진식품사와 Tishcon Corp사의 경우도 각각 비색법으로는 79.3%(w/w), 23.8%(w/w) 그리고 HPLC법으로는 71.9%(w/w), 21.4%(w/w)로서 진식품사와 Tishcon Corp사 모두 비

Table 1. Recovery rate of D-glucosamine analyzed by colorimetry and HPLC

D-Glucosamine(mg)	Colorimetry(%)	HPLC method(%)
10	91.5 (9.2)*	98.4 (9.8)
20	89.8 (18.0)	96.3 (19.3)
50	91.0 (45.5)	97.4 (49.0)

\*contents of D-glucosamine

Table 2. Chitooligosaccharide contents of processed products

	Colorimetry(%)	HPLC method(%)
Chitooligosaccharide processed products		
SK Co.	28.4	25.1
JIN FOOD Co.	79.3	71.9
Tishcon Corp Co.	23.8	21.4
Chitosan product		
BIOTECH Co.	1.2	0

색법으로 분석한 결과치가 HPLC법으로 분석한 결과치 보다 9.3%~11.6%(w/w) 정도 많은 양이 검출되었다. 또한 바이오테크사의 키토산은 비색법에 의하여 1.2%로 키토올리고당이 검출되었으나 HPLC법으로는 검출되지 않았다.

따라서 키토올리고당의 정량을 비색법으로 하였을 경우 glucosamine 이외의 키토산 등 다른 성분에 의한 false positive response가 일어남을 알 수 있었다.

결론적으로 HPLC에 의한 키토올리고당의 정량은 비색법 보다 분석시간의 단축효과가 있으며 또한 더 정확하였다. 그리고 비색법은 glucosamine의 농도 2.5 mg/mL 이하에서만 분석이 가능하나 HPLC에 의한 방법은 고농도(100 mg/mL 이상)에서도 분석이 가능하였다. 또한, 비색법은 chitosan등의 다른 성분에 의해서 영향을 받지만 HPLC법은 영향을 받지 않았다.

따라서 키토올리고당의 정량분석은 HPLC에 의한 방법이 기존의 방법(비색법)보다 더 신속·용이하고 정확하였다.

## 요 약

키토올리고당의 정량법으로 기존의 비색법과 HPLC 방법을 비교 검토하였다. HPLC에 의한 키토올리고당의 정량은 키토올리고당을 D-glucosamine로 분해한 다음, D-glucosamine을 분석하므로써 가능하였다. D-glucosamine을 분석하기 위한 HPLC 분석 조건은 검출기로서 RI detector 그리고 컬럼으로 Bondclone10 NH<sub>2</sub>

column(330×3.9 mm, 10 micron, Phenomenex)을 사용하고 이동상으로는 acetonitrile : H<sub>2</sub>O(65 : 35)으로 하였다. 키토올리고당의 정량은 비색법 보다 HPLC법이 높은 회수율을 보였으며, 분석시간도 시료당 10분 이내로서 비색법의 4 시간 보다 더 짧았다. 비색법은 키토산 등에 의한 false positive response가 일어났으나 HPLC법은 glucosamine 이외의 다른 성분에 의한 영향을 받지 않았다. 따라서 HPLC에 의한 키토올리고당의 정량은 가능하였으며 기존의 비색법 보다 신속·정확하였다.

문 헌

1. Suzuki, K., Okawa, Y., Hasimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.* 28: 903-910 (1990)
2. Kobayashi, M., Watanabe, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.* 34: 413-419 (1984)
3. Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, M., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monosytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 33: 357-365 (1989)
4. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.* 151: 403-409 (1986)
5. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 784-792 (1988)
6. Suzuki, K., Okawa, Y., Hasimoto, K., and Suzuki, M. Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan. p.210. In: *Chitin and chitosan*, Hirano, S. and Tokura, S.(eds), The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottri University (1982)
7. Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. Enhancing effect of N-acetylchitohexaose on the active oxigen-generating and microbicidal activities of perritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 886-894 (1985)
8. Choi, Y.J., Kim, U.J., Kim, Y.S. and Shin, Y.C. Enzymatic production of chitoooligosaccharides from chitosan. *Korean Society for chitin and chitosan* 2: 40-51 (1997)
9. Jeon, Y.J. and Kim, S.K. Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. *Korean Society for chitin and chitosan* 2: 60-78 (1997)
10. Korean Food Code. pp. 384-385. Korea Food and Drug Administration (1999)

(2000년 5월 30일 접수)