

## Capillary electrophoresis(CE)를 이용한 천공의 원산지 판별

김정현 · 김은영 · 정경숙 · 류미라\*

한국식품개발연구원

(2003년 8월 4일 접수, 2003년 10월 13일 수리)

최근 수입자유화 이후 중국산 한약재의 수입이 증가하면서 수입산과 국산의 명확한 판별이 요구되고 있는데 수입이 급증한 품목 중 하나인 천공을 선택, CE를 이용한 분석조건을 확립하고 원산지판별에의 적용가능성을 검토하였다. 분석을 위한 지표물질의 추출에는 30% ethanol 을 사용하였고, 50  $\mu$ m I.D.×27 cm 길이의 uncoated fused-silica capillary를 이용하여 40°C, 10 kV로 200 nm에서 분석하였다. 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5)에 40% methanol과 15 mM IDA를 첨가하여 분석 buffer로 사용하였고, 국산시료는 5초, 수입산은 2초 동안 pressure injection하였다. 분석 시 시료 injection 전에 증류수로 4분간 흘려주고 분석 buffer로 10분간 평형화시켰으며 분석이 끝난 후 0.1 M phosphoric acid와 1 N sodium hydroxide를 각각 4분씩 흘려 분석의 재현성을 높이고자 하였다. 이상의 조건으로 시중에 유통되는 국내산(62점)과 수입산(51점) 천공을 분석한 결과 전체 peak에 대한 구성비율이 서로 차이를 나타내는 peak LW-1과 peak LW-5(용출시간 약 11분, 14분)를 원산지 판별에 적용할 수 있는 peak로 도출하였으며, 이 peak를 이용한 국산 및 수입산 천공의 원산지 판별율은 국산이 약 65%(총 62점 중 40점을 바르게 판별), 수입산은 약 63%(총 51점 중 32점을 바르게 판별)로 나타났다.

**Key words:** capillary electrophoresis, 천공, 분석조건, 원산지 판별

### 서 론

최근 국민소득의 증가에 따라 한방의료 및 한약재를 이용한 건강식품의 수요가 많아지고 약용작물 재배면적이 증가하는 추세이나 더불어 WTO 체재에 따른 수입 자유화로 중국산 한약재의 수입이 급증하면서 약용작물 재배농가들이 어려움을 겪고 있다. 일반적으로 수입산 제품들은 국산보다 가격이 저렴하여 의도적으로 산지를 속이는 경우가 많아 정부에서 관련법을 정하여 국산농산물에 관한 표시를 의무화하고 있으나 구분이 쉽지 않은 실정이다. 더욱이 수입규제 품목으로 관리되고 있는 천공, 당귀 등 21종의 중국산 한약재가 2001년 말 완전히 개방됨에 따라 무분별한 수입이 우려되고 있다. 한약재나 농산물의 품종이나 원산지는 외형적 특성만으로는 판별이 어려워 곡류를 중심으로 전기영동, HPLC 등의 단백질 분석법을 통한 연구가 진행되어 왔다. 그러나 이러한 이화학적 분석법은 분석에 필요한 시간이나 비용이 많이 드는 단점이 있어 현장 적용에는 어려움이 있다.

Capillary electrophoresis(CE)는 1980년 초에 이르러 알려지기 시작하였고, 그후 불과 몇 년 사이에 급속도로 그 활용이 발전한 새로운 분석법으로 기존의 분석법에 비해 분석시간이 짧고 resolution이 뛰어나며 분석에 필요한 시간 및 시료의 양을 최소화 할 수 있고 양적 디지털 분석이 가능한 방법이다.<sup>1)</sup> CE는 전하를 띤 이온이 반대의 전극으로 이동하는 전기적인 이동과 capillary 내벽의 표면전하로 인해 생기는 액체의 흐름에 의해

이동하는 electrosmotic 이동에 의해 분리되는 방법<sup>2)</sup>으로 SDS-PAGE나 HPLC로 분리 가능한 물질들에 모두 적용할 수 있을 뿐만 아니라 전처리가 까다로운 시료도 쉽게 분석 할 수 있다.<sup>3)</sup> CE는 또한 Bietz와 Schmalzried<sup>4,5)</sup>가 밀의 gliadin을 분석하여 품종판별을 시도한 것을 시작으로 귀리,<sup>6)</sup> 쌀,<sup>7)</sup> 옥수수,<sup>8)</sup> 보리<sup>9)</sup> 및 수수<sup>10)</sup>에 적용되어 왔으며, 우리 나라에서도 본 연구팀에 의해 국내산 쌀의 품종판별<sup>11)</sup> 및 차이식별<sup>12)</sup>과 울무의 원산지판별<sup>13)</sup> 등에 이용된 바 있다.

따라서 본 연구는 최근 수입이 급증한 품목 중 하나인 천공을 택하여 CE를 이용한 분석조건을 확립하고 원산지 판별에 대한 적용가능성을 검토하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**시료 전처리 및 시약.** 시료는 2001년 국내산 62점, 수입산 51점 천공분말을 국립농산물 검사소로부터 제공받아 사용하였다. 시료에 5배량(w/v)의 추출용매를 가하여 실온에서 1시간 동안 추출 후 4°C에서 10분간 원심분리(7,800×g)하여 상정액을 얻었다. 상정액은 분석하기까지 실온 보관하였으며, 0.45 및 0.22  $\mu$ m micro filter로 순차적으로 filtration 한 시료를 15시간 이내에 분석하는 것을 원칙으로 하여 실험하였다. 최적의 분석 buffer 결정을 위하여 기본 buffer로 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5, P-buffer)와 0.3 M borate buffer(pH 8.5, B-buffer)를 이용하여 검토하였고 buffer 첨가제로 organic modifier 및 detergent 첨가에 따른 분리도 개선효과 또한 검토하였다. Organic modifier로는 ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을, zwitterionic detergents로 CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl ammonio]-1-propanesulfate), lauryl

\*연락처

Phone: 82-31-780-9268; Fax: 82-31-709-9876

E-mail: mrrhyu@kfri.re.kr

sulfobetain(SB-12, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)과 octyl-sulfobetain(SB3-8, N-octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)을, nonionic detergent로 Brij35(propylene glycol lauryl ether)를 사용하였으며, hexane sulfonic acid(HSA)와 iminodiacetic acid(IDA)도 사용하였다. 분석 buffer는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)로부터, 각 detergent는 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, organic modifier는 HPLC급을 사용하였다.

**사용 기기 및 capillary cleaning.** Capillary Electrophoresis(CE)는 Beckman P/ACE 5500 system(Beckman, Fullerton, CA, USA)을 사용하였고 uncoated fused-silica(50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  27 cm, 20 cm inlet to detector) capillary를 이용하여 분석하였다. 분석하는 동안 전압은 10 kV, capillary의 온도는 40°C가 유지되도록 하였으며 200 nm에서 검출하였다.

새로운 capillary를 사용할 때 또는 필요에 따라서 capillary의 세척을 실시하였다. 즉, 1 N sodium hydroxide와 1 M phosphoric acid로 각각 20분, 60분간 흘려준 후 P-buffer로 다시 20분간 흘려주고 분석 buffer로 60분간 평형화시켜 사용하였다. 또 매번 CE를 1-2시간 이상 정지 후 사용할 때는 0.1 M phosphoric acid와 1 N sodium hydroxide로 각각 15분씩 흘려주고 다시 0.1 M P-buffer로 10분간 흘려준 후 분석을 수행하였다.

**분석 protocols.** 반복적인 분석에 의한 capillary내 시료의 잔존 예방 및 capillary 내막의 최적 분석조건 유지를 위하여 분석 전에 증류수를 4분간 흘려주고 분석 buffer로 10분간 평형화시킨 후 시료를 pressure injection 하였다. 분석 완료 후 다시 0.1 M phosphoric acid와 1 N sodium hydroxide로 각각 4분씩 흘려주었다. 분석시간은 30분으로 capillary의 세척 및 평형화 과정까지 합하여 하나의 시료를 분석하는 데 총 52분이 소요되었다.

## 결과 및 고찰

**CE를 이용한 천공의 분석조건 결정.** 추출용매별 지표물질의 추출적정성 검토를 위해 30% methanol, 30% ethanol, 30% 2-propanol, methanol:0.1 M P-buffer(3:7), methanol:0.3 M B-buffer(3:7)를 이용하여 시료를 추출하여 예비 실험한 결과 추출물에 현탁이 생기지 않으며 추출율이 좋고 분리도가 적합한 30% ethanol을 추출용매로 선정하였다. 또한 기본 분석 buffer 결정을 위하여 0.1 M P-buffer와 0.3 M B-buffer를 사용하여 비교 한 결과 0.1 M P-buffer 사용 시 peak분리도가 뛰어나고 전체적인 peak 형태가 안정적이었다(data not shown). CE를 이용하여 미지의 물질 분석 시 가장 큰 문제점 중 하나는 capillary의 내막과 분석하는 물질간의 상호작용을 들 수 있다.

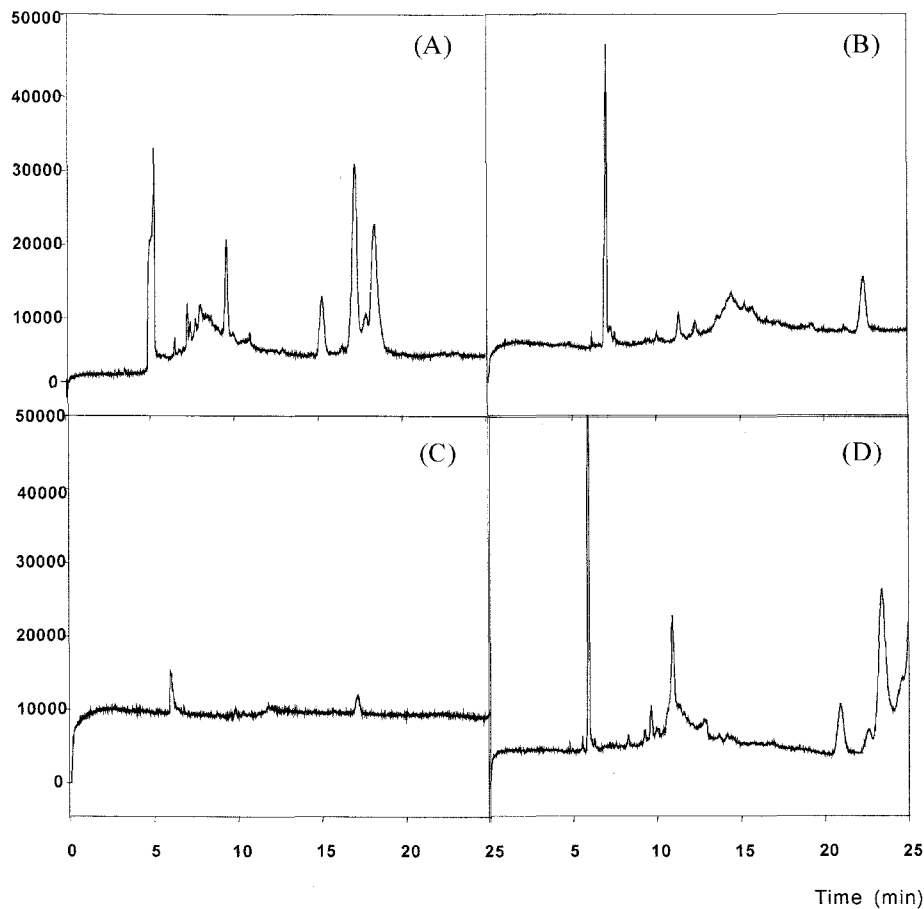


Fig. 1. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of domestic *ligusticum* root (*Ligusticum wallichii*) with 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, plus an organic modifier; 30% methanol (A), 30% 2-propanol (B), 30% 2-methoxy ethanol (C) and 30% ethylene glycol (D).

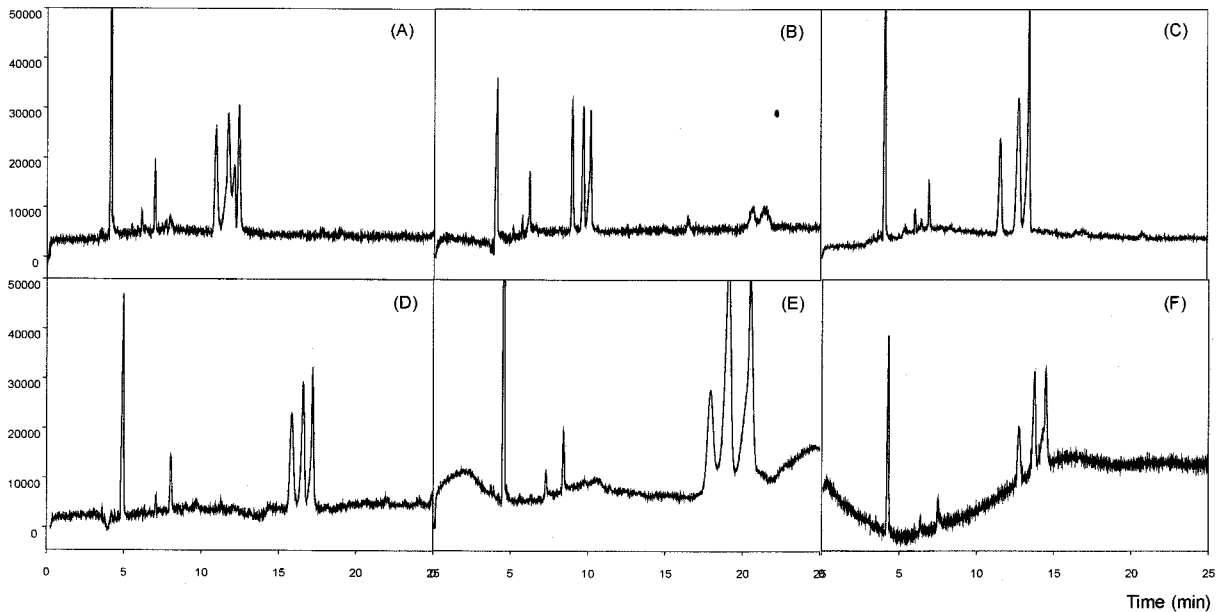


Fig. 2. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of domestic *ligusticum* root using the following separation buffers: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, plus 20% methanol plus 26 mM hexane sulfonic acid (HSA, A), 26 mM iminodiacetic acid (IDA, B), 26 mM octyl-sulfobetain (SB3-8, C), 26 mM lauryl sulfobetain (SB-12, D), 26 mM Brij 35 (E) and 26 mM CHAPS (F).

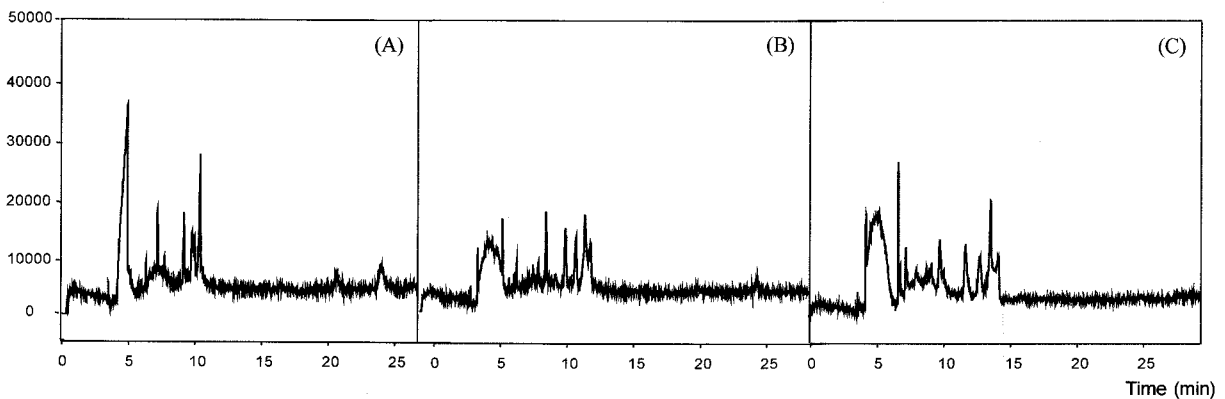


Fig. 3. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of domestic *ligusticum* root using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, plus 20% methanol +15 mM iminodiacetic acid (A), +26 mM iminodiacetic acid (B) and +40 mM iminodiacetic acid (C).

이러한 상호작용에 의해 분석하는 물질이 capillary 내막의 이온화된 silanols과 결합하면 capillary내의 전하가 변화하여 전기적 이동에 변화를 가져올 수 있으며 peak의 tailing이나 broadening 현상이 나타나고 이러한 현상이 더 강해지면 detector에서의 반응이 감소되거나 완전히 peak가 없어지는 경우가 생겨 분석의 재현성이나 정확도가 저하되는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 따라서 이의 예방을 위하여 기본 분석 buffer 결정 후 여러 가지 첨가제들을 첨가하여 분석을 수행하는 것이 일반적이며 그 중 하나가 친수성이 강한 유기용매 첨가제를 사용하여 capillary 내막과 분석하는 물질들 간의 소수성 상호작용을 저하시키는 것이다.<sup>14)</sup> 본 실험에서는 ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을 기본 buffer에 각각 30% 농도로 첨가하여 분석하였다. 실험결과 methanol 사용 시 분리도가 비교적 양호한 것으로 나타났으며, 2-methoxy ethanol 첨가 시는 peak가 거의 나타나지 않았고 ethylene glycol과 2-

propanol은 peak의 용출시간이 늦어지면서 분석 25분 이내에 peak들이 많이 나타나지 않았다(Fig. 1).

CE 분석 시 buffer에 양성, 비이온화 및 기타의 detergent의 첨가는 분석 중 전류의 흐름을 증가시키거나 단백질의 분리 개선 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 본 실험에서도 이를 위하여 methanol을 organic modifier로 결정한 뒤 다시 detergent 첨가에 따른 효과를 비교하였다. Detergent들은 capillary 내막과 분석하는 물질들간의 상호작용 감소, capillary 내막의 하전 정도의 변화, 분석되는 물질들의 용해도의 변화 등을 통하여 최적의 분석이 이루어질 수 있도록 하는 작용을 수행한다.<sup>2)</sup> 따라서 유기용매 첨가제인 methanol을 20% 첨가한 0.1 M P-buffer에 6종의 detergent를 각각 26 mM 농도로 첨가하여 peak pattern의 변화를 관찰하였다. HSA, IDA, SB3-8 및 SB-12 사용 시 모두 baseline은 안정적이었으나 SB3-8과 SB-12의 경우 용출시간이 늦어지는 경향을 나타내었다. 또한 Brij35

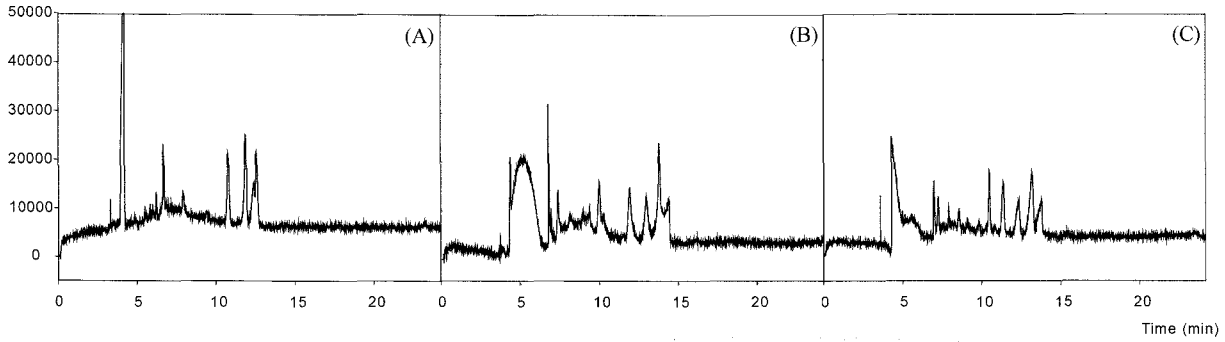


Fig. 4. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of domestic *ligusticum* root using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, plus 15 mM iminodiacetic acid +20% methanol (A), +30% methanol (B) and +40% methanol (C).

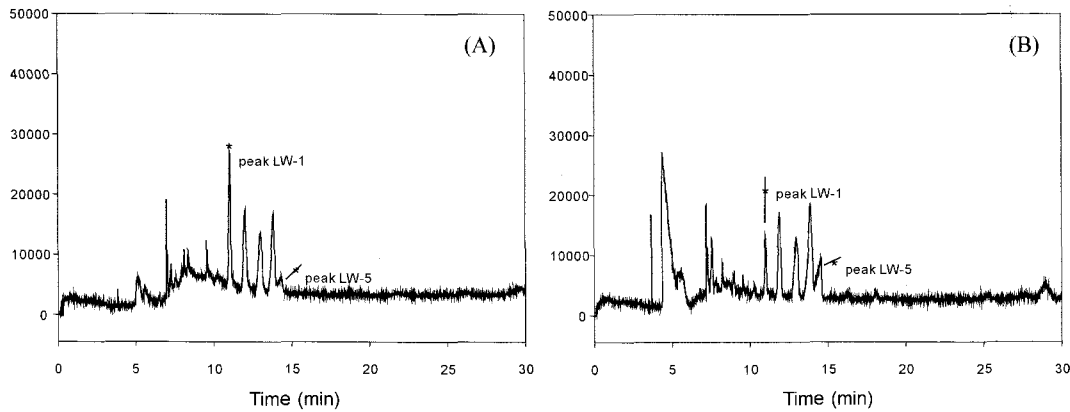


Fig. 5. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of *ligusticum* root with domestic (A, injection time: 5 sec) and foreign (B, injection time: 2 sec) origin. Separation buffer was 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, containing 40 mM iminodiacetic acid with 40% methanol.

는 baseline이 안정적이지 못하고 용출시간 또한 가장 늦어졌으며 CHAPS는 baseline이 매우 불안정한 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 baseline과 용출시간이 모두 적절한 HSA와 IDA를 검토한 결과 peak의 분리도 면에서 IDA가 HSA에 비해 약간 더 좋은 것으로 나타나 IDA를 buffer에 첨가하는 detergent로 결정하였다.

분석 buffer에 첨가하는 유기용매와 detergent의 종류 결정 후 다시 각각의 최적 농도를 결정하고자 하였다. 0.1 M P-buffer에 methanol의 농도를 20%로 고정 한 후 IDA의 농도를 15 mM, 26 mM, 40 mM로 달리하여 분석한 결과 IDA의 첨가량이 많을수록 용출시간이 늦어지면서 peak들이 퍼지는 현상이 나타났다(Fig. 3). 또한 P-buffer에 IDA의 양은 15 mM로 고정 한 후 methanol의 농도를 20, 30 및 40%로 변화시켜 첨가하여 분석한 결과 첨가하는 methanol의 양이 많을수록 용출시간이 늦어지는 것을 알 수 있었으나 40% 첨가 시에도 15분 이내에 모든 peak들이 다 용출되었고 peak의 분리도 또한 적합한 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서 천궁의 CE 분석을 위한 최적의 buffer 조성은 0.1 M P-buffer에 40% methanol과 15 mM IDA를 첨가하는 것으로 결정하였다.

**천궁 원산지 판별에의 적용.** 도출된 결과에 따라 분석 buffer로 0.1 M P-buffer(pH 2.5)에 40% methanol과 15 mM IDA를 첨가한 buffer를 이용하여 분석 protocol에 따라 분석을 수행하였다. 즉, 시료 injection 전에 증류수를 4분간 흘려주고

분석 buffer로 10분간 평형화시킨 후 시료를 injection 하였다. 이때 최적의 분석을 위해 국산 및 수입산의 injection time을 조정하여 국산 시료는 5초, 수입산은 2초간 pressure injection 하였다. 분석 완료 후 다시 0.1 M phosphoric acid와 1 N sodium hydroxide로 각각 capillary를 세척하여 다음 분석시료에 대한 영향을 줄이고자 하였다. 이상의 조건으로 유통되는 국산 및 수입산 천궁시료를 분석한 결과 전체적인 peak pattern은 비슷한 것으로 나타났다. 그러나 용출된 peak중 11분과 14분 경에 나타나는 peak LW-1과 LW-5의 구성비율이 국산과 수입산에서 차이를 보였다. 즉, 국산의 경우 peak LW-1과 LW-5의 비율 차이가 큰 반면, 수입인 경우 두 peak간의 차이가 작게 나타났으며(Fig. 5) 이러한 현상은 국산 및 수입산 모두에서 1개의 시료에 대하여 3회 반복 실험 시 동일한 결과를 나타내었다. 따라서 이 두 peak간의 구성비율을 비교하여 국산과 수입산의 원산지 판별이 가능하며 이를 이용하였으며 이를 유통되는 국산 및 수입산 천궁 113점의 원산지를 판별에 적용한 결과 국산이 총 62점 중 40점이 국산으로 판별되어 약 65%의 판별율을 나타내었고, 수입산은 총 51점 중 32점이 수입산으로 판별되어 약 63%의 판별율을 나타내었다.

결론적으로 본 실험결과 CE를 이용하여 천궁의 분석조건을 확립할 수 있었으며, 이를 시중 유통시료에 적용 시 어느 정도까지는 원산지 판별이 가능하며 현장에서 다른 분석법들과 함께 사용하여 판별율을 높이는데 활용할 수 있을 것으로 기대되

었다. 그러나, 판별율이 60%대로 비교적 낮아 보다 많은 시료에의 적용실험과 peak pattern의 차이를 분석 평가할 수 있는 해석법의 도출을 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드리며 시료 수집 및 전처리해 주신 국립농산물품질관리원 시험연구소 김수정 팀장님께 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Cancalon, P. F. (1995) Capillary electrophoresis: A new tool in food analysis. *J. AOAC Int.* **78**, 12-15.
2. Wehr, T., Rodriguez-Diaz, R. and Liu, C. M. (1997) Capillary electrophoresis of proteins. *Adv. Chromatogr.* **37**, 237-361.
3. Chen, F-T. A. (1991) Rapid protein analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **559**, 445-453.
4. Bietz, J. A. and Schmalzried, E. (1992) Capillary electrophoresis of wheat proteins: optimization and use for varietal identification (Abstr.). *Cereal Foods World* **37**, 555.
5. Bietz, J. A. and Schmalzried, E. (1993) Improved wheat varietal identification by acidic capillary electrophoresis (Abstr.). *Cereal Foods World* **38**, 615.
6. Lookhart, G.L. and Bean, S.R. (1995) Rapid differentiation of oat cultivars and rice cultivars by capillary zone electrophoresis. *Cereal Chem.* **72**, 312-316.
7. Lookhart, G.L. and Bean, S.R. (1996) Improvements in cereal protein separations by capillary electrophoresis: resolution and reproducibility. *Cereal Chem.* **73**, 81-87.
8. Righetti, P. G., Oliviere, E. and Viotti, A. (1998) Identification of maize lines via capillary electrophoresis of zeins in isoelectric, acidic buffers. *Electrophoresis* **19**, 1738-1741.
9. Lookhart, G. L., Bean, S. R. and Jones, B. L. (1999) Separation and characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) hordeins by free zone capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 1605-1612.
10. Bean, S. R., Lookhart, G. L. and Bietz, J. A. (2000) Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 318-327.
11. Rhyu, M. R., Kim, E. Y., Ahn, M. O. and Kim, S. S. (1998) Discrimination of domestic rice cultivars by capillary electrophoresis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 1252-1258.
12. Rhyu, M. R., Kim, E. Y., Kim, S. S. and Chang, Y. S. (2001) Regional differences of four major rice cultivars in Korea by capillary electrophoresis. *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 299-304.
13. Rhyu, M. R., Kim, E. Y. and Kim, S. S. (2002) Identification of cultivate sites for job's-tears (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) using capillary electrophoresis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**, 787-791.
14. Campos, C. C. and Simpson, C. F. (1992) Capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. Sci.* **30**, 53-58.

**Discrimination of Geographical Origin for *Ligusticum* Root (*Ligusticum wallichii*) by Capillary Electrophoresis**  
Jung-Hyun Kim, Eun-Young Kim, Kyung-Sook Chung and Mee-Ra Rhyu\* (Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea)

**Abstract:** Optimal extraction, separation and capillary rinsing conditions for capillary electrophoresis (CE) were established to discriminate the geographical origin of ligusticum root (*Ligusticum wallichii*) using 113 samples (domestic sample n = 62, foreign sample n = 51). *Ligusticum* root was extracted with 30% ethanol and separated on a uncoated fused-silica (50  $\mu\text{m} \times 27$  cm) capillary. Conditions for optimal analysis include: temperature, 40°C; voltage, 10 kV; and pressure injection time, domestic and foreign samples were 5 sec and 2 sec, respectively. The optimal separation buffer was 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 15 mM iminodiacetic acid with 40% methanol. Under the optimal conditions established for CE, the ratio of specific peak area (peak LW-1) to other peak area (peak LW-5) was effective in discrimination geographical origin of *ligusticum* root. The mean accuracy for correct discrimination of geographical origin of domestic and foreign *ligusticum* roots were 65% and 63%, respectively.

Key words: capillary electrophoresis, geographical origin, *Ligusticum* root, conditions for optimal analysis

\*Corresponding author