

= 단 신 =

Capillary electrophoresis를 이용한 한국산 및 중국산 고사리의 원산지 판별방법 개발

김은영 · 김정현 · 정경숙 · 류미라*

한국식품개발연구원

(2003. 10. 16 접수, 2004. 1. 16 승인)

Development of the Discrimination Methods for Geographical Origin of Bracken(*Pteridium aquilinum*) by Capillary Electrophoresis

Eun Young Kim, Jung Hyun Kim, Kyung Sook Chung and Mee Ra Rhyu*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

(Received Oct. 16, 2003, Accepted Jan. 16, 2004)

Abstract : The discrimination of bracken (Korean vs. Chinese) has been attempted using capillary electrophoresis (CE). Bracken (*Pteridium aquilinum*) was extracted with 30% methanol and separated on a uncoated fused-silica (50 μm \times 27 cm) capillary. Conditions for optimal analysis include: temperature, 40 $^{\circ}\text{C}$; voltage, 8 kV; and pressure injection time, 5 sec. The optimal separation buffer was 0.3 M borate buffer (pH 8.5) containing 40 mM CHAPS with 30% ethylene glycol. Under the optimal conditions established for CE, the ratio of specific peak area (peak PA-1) to other peak area (peak PA-2) was effective in discrimination of Korean and Chinese bracken. The mean accuracy for discrimination of Korean and Chinese brackens were 80% and 86%, respectively.

Key words : bracken, capillary electrophoresis, conditions for optimal analysis, discrimination

1. 서 론

농산물은 산지나 재배 조건에 따라 품질의 차이가 크고 특히 우리 나라는 일반적으로 수입산 제품들이 국산보다 가격이 저렴하여 의도적으로 산지를 속이는 경우가 많다. 따라서 날로 증가하는 부정 유통 수입산 농산물의 단속 및 WTO 체제에 의한 농산물의 산지표시 강화와 제도화에 부응하기 위한 과학적 분석 방법 개발이 시급히 요구되고 있다. 농산물의 품종이나 원산지는 외형적 특성만으로는 판별이 어려워 곡류를 중심으로 전기영동, HPLC 등의 단백질 분석법을 통한 연구가 진행

되어 왔으나 이러한 분석법들은 분석에 필요한 시간이거나 비용이 많이 드는 등 현장 적용에는 어려움이 있다.

Capillary electrophoresis(CE)는 1980년 초에 이르러 알려지기 시작한 후 급속도로 활용이 발전한 새로운 분석법으로 기존의 분석법에 비해 분석시간이 짧고 분해능이 뛰어나며 분석에 필요한 시간 및 시료의 양을 최소화 할 수 있고 양적분석이 가능한 방법이다.¹ CE는 전하를 띤 이온이 반대의 전극으로 이동하는 전기적인 이동과 capillary 내벽의 표면전하로 인해 생기는 액체의 흐름에 따른 electrosmotic 이동에 의해 분리되는 방법²으로 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis)나 HPLC로 분리 가능한 물질들에 모두 적용할 수 있을 뿐만 아니라 전처리가 까다로운 시료도 쉽게 분석 할 수 있는 장점을 지니고 있다.³ CE는 Bietz와 Schmalzried⁴가

★ Corresponding author

Phone: +82+(0)31-780-9268 Fax: +82+(0)31-709-9876

E-mail: mrrhyu@kfri.re.kr

밀의 gliadin을 분석하여 품종판별을 시도한 것을 시작으로 귀리,⁵ 쌀,⁶ 옥수수⁷ 및 보리⁸ 등의 곡류 분석에 주로 적용되어 왔다. 우리 나라에서는 본 연구팀에 의해 국내산 쌀의 품종판별⁹ 및 차이식별¹⁰에 이용 가능성이 제시되었으며 농산물의 원산지판별에 적용가능성 검토를 위하여 울무¹¹에 이용되어 약 80%의 판별율을 나타낼 수 있는 방법으로 보고되었다. 고사리는 다년생의 양치식물로 우리나라 전국 각지에서 자생하며 오래 전부터 즐겨왔던 대표적인 산나물이나, 최근 들어 소비 감소 및 값이 비교적 저렴한 수입 중국산 증가에 밀려 국내 생산이 줄어들고 있으며, 시중 유통되는 양의 약 90%가 중국산으로 알려져 있으며 원산지의 판별이 거의 불가능한 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 농산물의 원산지판별방법으로 CE의 적용가능성 검토를 위한 연구의 일환으로 기존의 연구결과^{5, 7, 11}를 참고로 하여 CE를 이용한 고사리 단백질 성분들의 분석조건을 확립하고 유통시료에 대한 적용 및 원산지판별 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 실험

2.1 시료 및 추출조건 확립

시료는 2001년 국내산 60점, 중국산 80점의 고사리 분말을 국립농산물 검사소로부터 제공받아 사용하였다. 시료에 10 배량(w/v)의 추출용매를 가하여 실온에서 1시간 추출 후 4 °C에서 10분간 원심분리(10,000×g)한 상등액을 분석에 사용하였다. 추출액은 분석할 때까지 실온 보관하였고, 0.45 및 0.22 μm micro filter로 순차적으로 여과하여 사용하였으며, 추출 후 15시간 이내에 분석하는 것을 원칙으로 하였다.

2.2 사용 기기 및 capillary cleaning

CE는 Beckman P/ACE 5500 system(Beckman, Fullerton, CA, USA)을 사용하였고 uncoated fused-silica (50 μm i.d. × 27 cm, 20 cm inlet to detector) capillary를 이용하였다. 분석 중 전압은 8 kV, capillary의 온도는 40 °C가 유지되도록 하였으며 200 nm에서 흡광도를 측정하였다.

새로운 capillary 사용 시 또는 필요에 따라 capillary를 세척하였다. 즉, 1 N NaOH, 1 M phosphoric acid 및 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5, P-buffer)를 각각 20분, 60분 및 20분씩 흘려준 후 분석 buffer로 60분간 평형화시켰다. 또한 CE를 1~2시간 이상 정지 후 사용 시는 0.1 M phosphoric acid와 1 N NaOH를 각각 15분씩, 다시

P-buffer를 10분간 흘려준 후 분석하였다.

2.3 분석 buffer 선정

최적 분석 buffer 선정 시 기본 buffer는 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5)와 0.3 M borate buffer (pH 8.5, B-buffer)를 이용하여 검토하였고, 기본 buffer에 유기용매 및 계면활성제 첨가에 따른 분리도 개선효과를 조사하였다. 유기용매 첨가제는 acetonitrile, ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을, 계면활성제는 양성계면활성제인 CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-di-methylammonio]-1-propanesulfate), lauryl 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, 비이온성 계면활성제인 Brij35 (propylene glycol 23 lauryl ether)와 hexane sulfonic acid (HSA) 및 iminodiacetic acid (IDA)를 사용하였다. Buffer는 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA, USA)로부터, 각 계면활성제는 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 유기용매는 HPLC급을 사용하였다.

2.4 분석 protocols

분석 중 capillary내 시료의 잔존 예방 및 최적 분석 조건 유지를 위하여 시료 주입 전 증류수와 1 N NaOH를 각각 10분, 5분씩 흘려준 후 분석 buffer로 8분간 평형화시키고, 5초간 pressure injection 하였다. 분석시간은 30분으로 capillary 세척 및 평형화 과정을 합하여 하나의 시료 분석에 총 53분이 소요되었다.

2.5. 원산지 판별

시중에 유통되는 국산 및 수입산 시료를 구입하여 확립한 분석법에 따라 분석을 수행하고 전체 분석시료에 대하여 정확히 판별된 시료의 비율을 이용하여 판별율을 계산하여 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 추출조건 확립

최적의 추출조건 확립을 위하여 시료에 10 배량(w/v)의 30% methanol, 30% ethanol, 30% 2-propanol 및 methanol:0.1 M P-buffer (3:7)를 각각 가하고 추출하여 얻은 상등액을 실온에서 24시간 동안 방치한 결과 침전이나 현탁이 생기는 경우는 바로 분석에 적용이 불가능하여 제거하였다. 또한, 기본 buffer로 분석하여 물질 peak가 나타

날 가능성 여부를 검토한 결과 30% methanol추출이 가장 적절하였다.

3.2 분석 buffer의 최적화

본 실험은 일정 성분의 정량적 분석보다는 현장에서 원산지 판별에 대한 적용 가능성을 살펴보기 위하여 수행하였으므로 전기적인 하전의 차이로 분석이 용이한 시료 내의 단백질 성분들에 대한 정보를 peak로 얻고 이의 양상을 이용하여 원산지를 판별하고자 하였다. 따라서 분석의 정확도를 높이기 위하여 시료 중 단백질 성분들의 분석이 정확히 이루어지도록 다른 시료 주입 전에 NaOH를 흘려주어 capillary 내막의 silicic acid를 충분히 이온화한 후 실험을 수행하였다. 분석 시 capillary 내막의 silanol group의 이온화 정도에 따른 분석 물질들의 이동 및 peak 용출의 적정성을 알아보기 위하여 낮은 pH 범위에 해당하는 P-buffer와 pH가 비교적 높은 B-buffer를 비교한 결과 B-buffer 사용 시 분리도가 뛰어나며 전체적인 peak의 재현성이 높아 이를 기본 buffer로 결정하였다. CIE를 이용하여 미지의 물질 분석 시 가장 큰 문제점 중 하나는 capillary 내막의 이온화된 silanols과 분석하는 물질간의 상호작용이다. 이러한 상호작용에 의해 capillary내의 전하와 전기적 이동에 변화가 일어나며 peak의 tailing,

broadening 현상이 나타나고 이것이 더 강해지면 검출기에서의 감응이 감소되거나 완전히 peak가 없어지는 등 분석의 재현성이나 정확도가 저하되는 것으로 알려져 있다.² 이러한 현상의 예방을 위해 buffer에 여러 가지 첨가제를 가하여 분석을 수행하는 것이 일반적이며¹², 일차적으로 capillary 내막과 분석 물질간의 소수성 상호작용의 저하를 위하여 친수성이 강한 유기용매 첨가제를 사용하였다. 기본 buffer에 20% acetonitrile, methanol, 2-propanol, 2-methoxy ethanol 및 ethylene glycol을 첨가하여 분석 시 2-propanol과 2-methoxy ethanol은 peak가 거의 나타나지 않았고, acetonitrile은 분리도가 좋지 않았으며 methanol과 ethylene glycol 사용 시 비교적 분리도가 양호하였으나 (Fig. 1), methanol은 반복 분석 시 재현성이 나타나지 않아 제외하였다. 또한 ethylene glycol을 첨가하여 분석 시 용출시간 10분 이내에 대부분의 peak가 나타나 각 peak의 정확한 분리가 어려워 첨가하는 양을 변화시켰다.

Ethylene glycol을 20%에서 50%까지 증가시킨 결과 30% ethylene glycol 첨가 시 용출시간 5분에서 10분 사이 peak들의 분리도가 개선되었으나 유기용매 첨가제의 양을 더 증가 시는 용출시간이 길어지면서 오히려 peak들이 뭉치는 경향을 나타내어 (Fig. 2), 최적의 유기용매첨가제의 양은 30%로 결정하였다.

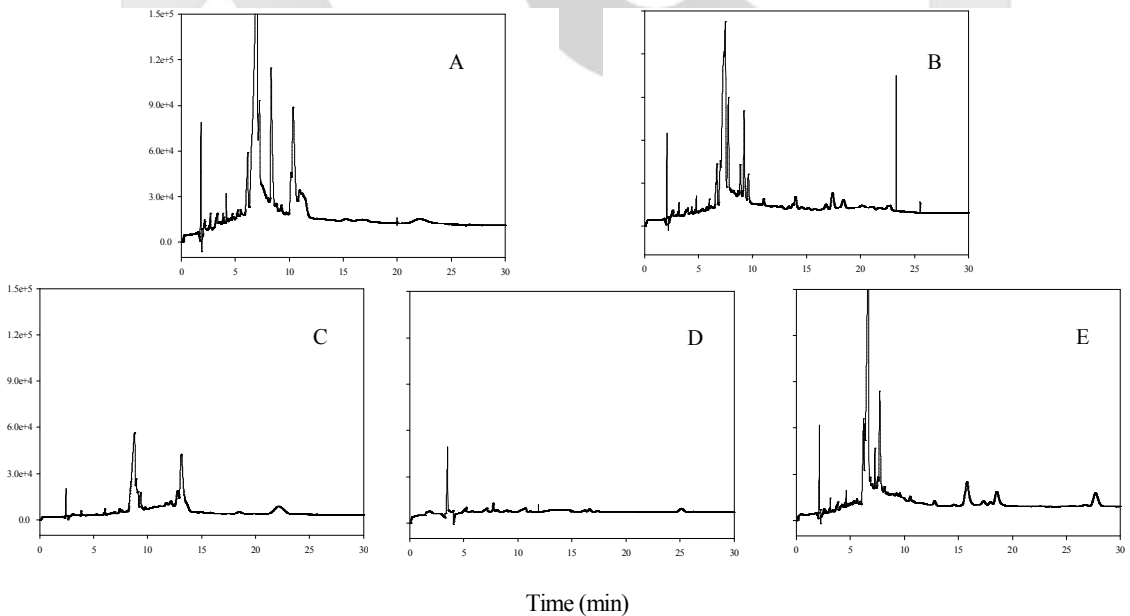


Fig. 1. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of Korean bracken separated with 0.3 M borate buffer (pH 8.5) plus an organic modifier: 20% acetonitrile(A), 20% methanol(B), 20% 2-methoxy ethanol(C), 20% 2-propanol(D) or 20% ethylene glycol(E).

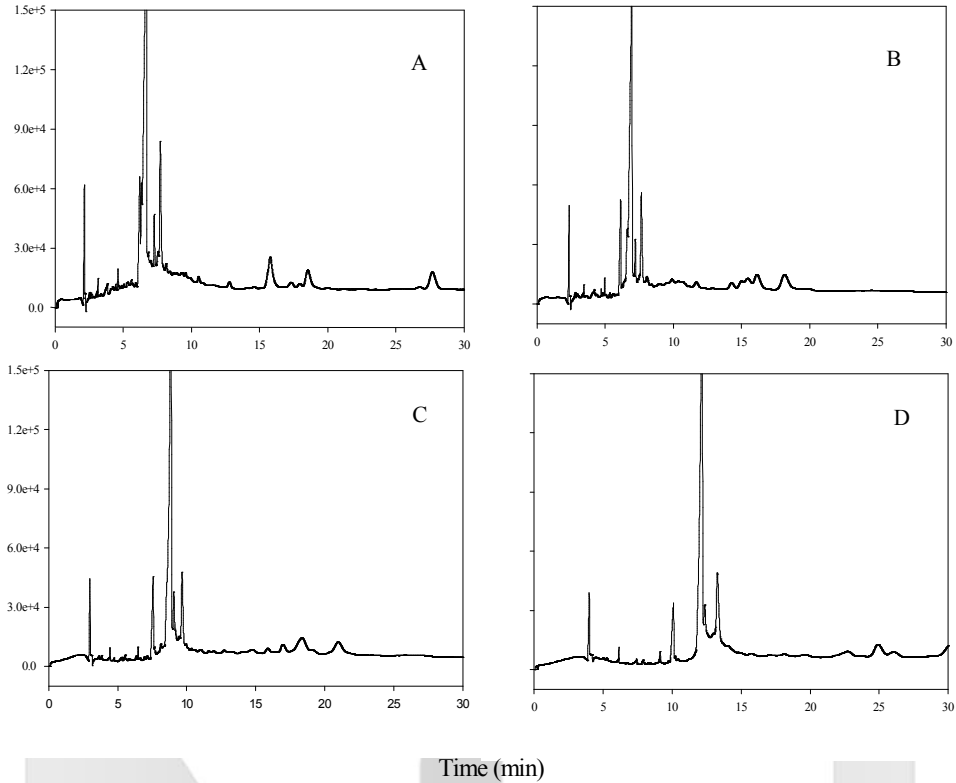


Fig. 2. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of Korean bracken using the following three buffer system: 0.1 M phosphate buffer(P) + 20% ethylene glycol(A), P + 30% ethylene glycol(B), P + 40 % ethylene glycol(C) or P + 50% ethylene glycol.

분석 buffer에 계면활성제들을 첨가하면 분석 중 전류의 흐름을 변화시켜 단백질 등의 분리 개선 효과를 나타내는 것으로 알려져있다.² 계면활성제의 효과 검토를 위해 30% ethylene glycol/0.3 M B-buffer에 6종의 계면활성제를 26 mM 농도로 첨가, 분석한 결과 실험에 사용한 모든 계면활성제에서 baseline 안정성은 변화가 없었고 IDA를 제외하고는 peak 용출시간이 증가하였다 (Fig. 3). SB-12, SB3-8, HSA 및 Brij 35는 peak의 용출시간이 길어지면서 peak 들이 뭉쳐 용출되는 peak의 수가 감소하였고, IDA는 각 peak들의 정확한 분리가 어려울 정도로 peak이 초반에 한꺼번에 용출되었으며, CHAPS는 용출시간은 증가하나 분리되는 peak 수에 변화 없이 각 peak의 분리가 용이할 것으로 나타나 분석 buffer에 첨가하는 계면활성제를 CHAPS로 결정하였다.

CHAPS의 농도를 26, 40, 50 mM로 달리하여 분석 시 농도가 높을수록 peak의 용출시간이 길어져 50 mM 첨가 시는 전체 용출시간이 늦어지면서 13분에서 18분

사이에 작은 peak들이 퍼져 적합하지 못하였으나 40 mM 첨가 시는 peak의 재현성 및 용출시간 모두에서 가장 적절한 것으로 나타났다(Fig. 4).

3.3 유통시료에 대한 적용

결정된 분석조건을 국산과 중국산 고사리에 적용한 결과 전체적인 peak pattern은 유사하였으나 그 구성비에서 일부 차이를 나타내었다 (Fig. 5). 즉, 약 8분 경에 용출되는 peak PA-1과 약 12분 경에 용출되는 peak PA-2의 비율이 국산은 1:7로 peak PA-2가 큰 데 반해, 중국산은 4:1로 peak PA-1이 더 큰 것을 알 수 있었다.

이 두 peak간 면적 비의 차이를 이용하여 시중에 유통되는 국산 고사리 60점과 중국산 80점을 각각 3회 이상씩 분석한 결과 국산은 48점을 정확히 국산으로 판별하여 약 80%의 판별율을 나타내었고 중국산은 69점을 정확하게 판별하여 약 86%의 판별율을 나타내었다.

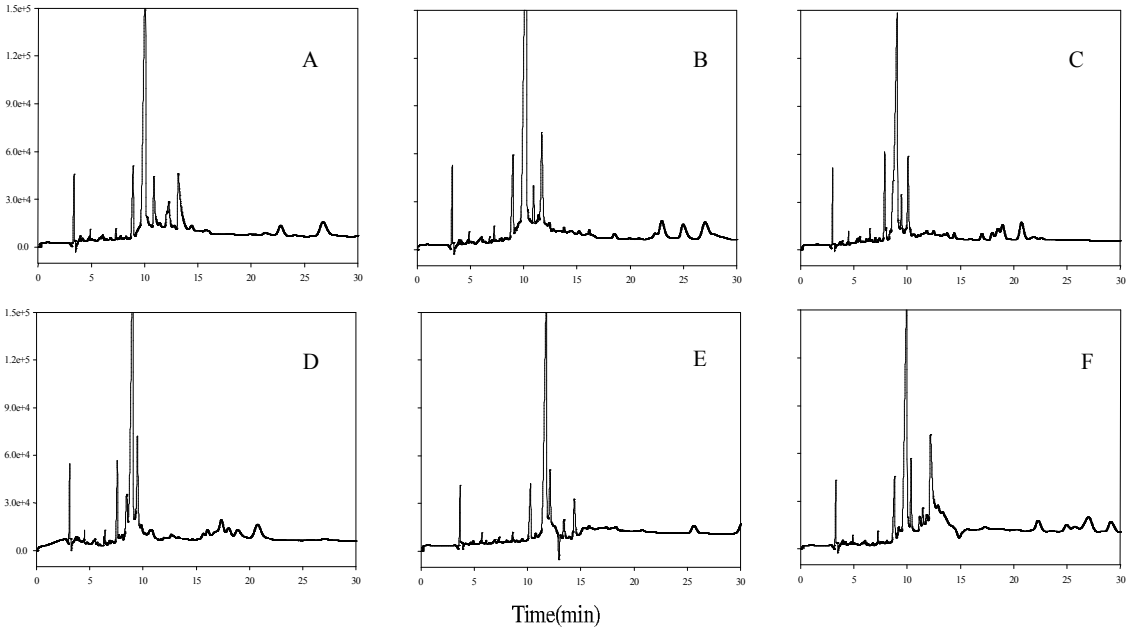


Fig. 3. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of Korean bracken using the following separation buffer: 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5) plus 30% ethylene glycol(P-EG) + 26 mM laurylsulfobetain(A), P-EG + 26 mM octyl-sulfobetain(B), P-EG + 26 mM hexane sulfonic acid(C), P-EG + 26 mM iminodiacetic acid(D), P-EG + 26 mM Brij35(E) or P-EG + 26 mM CHAPS.

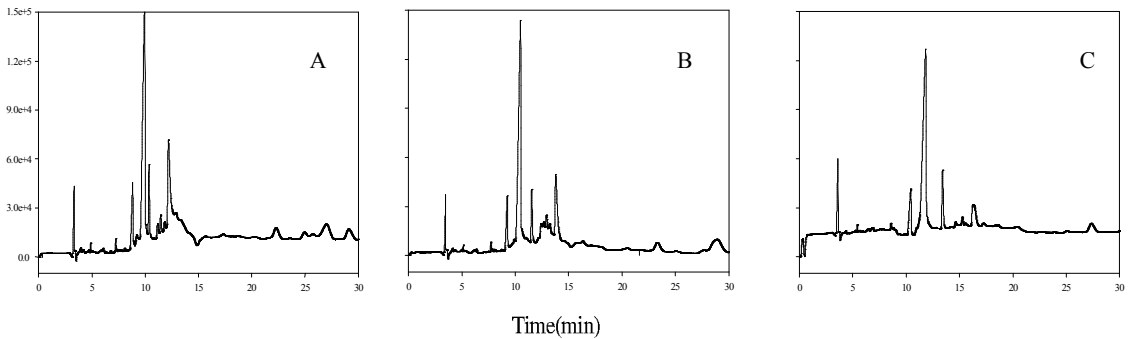


Fig. 4. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of Korean bracken using the following three buffer system: 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5) plus 30% ethylene glycol(P-EG) + 26 mM CHAPS(A), P-EG + 40 mM CHAPS(B), P-EG + 50 mM CHAPS.

CE를 이용한 농산물의 원산지 판별 시 판별율은 대부분 약 80% 정도로 나타나고 있으며,¹¹ 고사리 역시 이에 준 하는 판별율을 나타내어 결과적으로 CE를 농산물의 원산지 판별에 어느 정도까지 적용이 가능할 것으로 여겨졌다. 또한 앞으로 peak PA-1 과 peak PA-2 의 성분 규명에 관한 연구가 더 필요할 것으로 사료되었다.

4. 결 론

본 연구 결과 CE를 이용한 고사리의 최적 분석 조건을 확립할 수 있었다. 즉, 시료추출 시는 30% methanol을 사용하고 분석에는 0.3 M borate buffer(pH 8.5)에 30% ethylene glycol과 40 mM의 CHAPS를 첨가한 buffer를 사

용하는 것이 가장 적합하였다. 상기의 조건으로 시중에 유통되는 국산 및 중국산 시료를 분석 시 국산은 약 80%, 중국산은 약 86%의 판별율을 나타내어 이제까지 CE를 이용한 다른 연구결과들과 유사한 결과를 나타내었으며, CE를 농산물의 원산지 판별에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

시료 수집 및 전처리에 협조해주신 국립농산물품질관리원 시험연구소 김수정 팀장님께 감사드립니다.

참고 문헌

1. P.F. Cancalon, *J. AOAC Int*, **78**(1), 12-15(1995).
2. T. Wehr, R. Rodriguez-Diaz and C.M. Liu, *Adv. Chromatogr*, **37**(2), 237-361(1997).
3. F-T.A. Chen, *J. Chromatogr*, **559**(1-2), 445-453 (1991).
4. J.A. Bietz and E. Schmalzried, *Cereal Foods World*, **37**(3), 555(1992).
5. G.L. Lookhart and S.R. Bean, *Cereal Chem*, **72**(3), 312-316(1995).
6. G.L. Lookhart and S.R. Bean, *Cereal Chem*, **73**(1), 81-87(1996).
7. P.G. Righetti, E. Oliviere and A. Viotti, *Electrophoresis*, **19**(7), 1738-1741(1998).
8. G.L. Lookhart, S.R. Bean and B.L. Jones, *Electrophoresis*, **20**(7), 1605-1612(1999).
9. M.R. Rhyu, E.Y. Kim, M.O. Ahn and S.S. Kim, *Kor. J. Food Sci. Technol*, **30**(6), 1252-1258(1998).
10. M.R. Rhyu, E.Y. Kim, S.S. Kim and Y.S. Chang, *Food Sci. Biotechnol*, **10**(3), 299-304 (2001).
11. M.R. Rhyu, E.Y. Kim and S.S. Kim, *Kor. J. Food Sci. Technol*, **34**(5), 787-791(2002).
12. C.C. Campos and C.F. Simpson, *J. Chromatogr. Sci*, **30**(1), 53-58(1992).

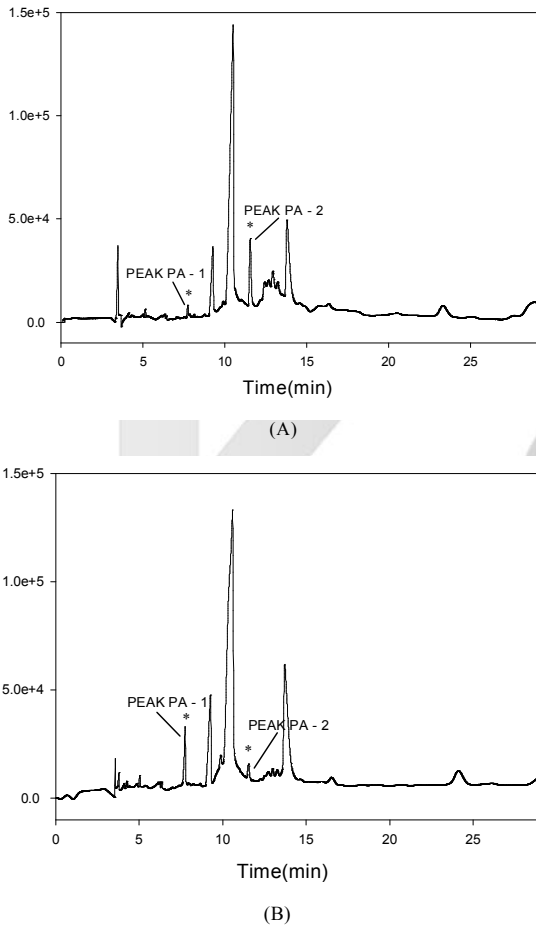


Fig. 5. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of bracken with Korean(A) and Chinese(B). Separation buffers were 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5) containing 40 mM CHAPS, plus 30% ethylene glycol.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 지원으로 수행된 연구결과와 일부로 이에 감사드리며