

산지별 鹿茸류의 성분분석 연구(II)

—Ganglioside 및 유리 아미노산의 분석—

홍남두 · 원도희* · 김남재 · 장승엽* · 윤황균 · 김혜수*
경희의료원 약제부 · *국립보건원 약품부

Studies on the Analysis of Constituents of Deer Horn(II)

—Analysis of gangliosides and free amino acids—

Nam-Doo Hong, Do-Hee Won*, Nam-Jae Kim, Seung-Youb Chang*,
Whang-Geum Youn and Hae-Soo Kim*

Department of Pharmaceutics, Kyung-Hee University Medical Center, Seoul 130-702 and

*Department of Drugs, National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea

Abstract—Two kinds of gangliosides contained in deer horns were determined by integrating the peaks of TLC densitometry. Japanese deer horn originated from China showed the highest gangliosides among tested samples and the upper parts in deer horns showed higher gangliosides than the lower parts. In the case of graded samples, the best grade A showed the highest content and the worst grade E did the lowest content. Sixteen kinds of free amino acids were analyzed by auto amino acid analyzer. The lower region the deer horn was, the more the total content of free amino acids was and several kinds of amino acids were contained quite regularly.

Keywords—Deer horn · gangliosides · free amino acids

鹿茸은 보양, 강장의 대표적 생약으로¹⁻⁶⁾ 그 종류 및 산지가 매우 다양하나 이들의 품질을 평가할 수 있는 기준이 미흡한 실정이다, 이에 저자들은 현재 우리나라에서 유통되고 있는 鹿茸류의 산지가 다양하고, 사용부위에 따라서 약효의 차이가 있는 것으로 알려져 있어 품질확보와 규격설정을 위한 기초적 연구의 일환으로 전보⁷⁾에서 산지별 鹿茸류로부터 회분 및 금속의 함량을 분석하고 ganglioside를 분리하여 TLC pattern을 비교분석하여 보고한 바 있으며, 鹿茸류의 품질관리에 관한 연구의 일환으로 산지 및 부위별 ganglioside 함량과 유리 아미노산 함량을 분석하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실 험

시료, 시약 및 기기

시료—본 실험에 사용한 鹿茸류 시료는 전보와 동일한 鹿茸의 미세말을 사용하였다.⁷⁾

시약—Sodium citrate, sodium hydroxide, sodium acetate, benzyl alcohol, thiodiglycol, BRIJ-35, ninhydrin, amino acid mixer standard 등은 Wako Pure Chemical 제품의 아미노산 분석용 시약을, capric acid와 기타 시약은 시약 1급을 사용하였다. 또한, ganglioside 분리용 시약은 전보와 동일한 시약을 사용하였다.⁷⁾

기기—Auto amino acid analyzer(Model 835,

Hitachi Co.), dual wavelength TLC scanner (CS-930, Shimadzu Co.).

사용하였으며 검액과 표준액을 가지고 아미노산 자동분석기를 사용하여 Table I의 조건에서 측정하였다.

실험 방법

TLC에 의한 ganglioside의 정량

1) 검액의 조제, 鹿茸류로 부터의 ganglioside의 분리, ganglioside표품의 정제, thin layer chromatography등은 전보와 같다.⁷⁾

2) Ganglioside류의 검량선 작성

정제한 ganglioside류의 표품에 MeOH을 가하여 용해시킨 후 상기 1)의 TLC법에 준하여 실험을 행한 후 zig-zag TLC scanner로 파장 550nm에서 scanning하여 얻은 Rf 0.39와 Rf 0.42의 피크 적분치로 부터 검량선을 작성하였다.

3) 鹿茸류중의 ganglioside류의 정량

각 시료를 1)의 ganglioside분석용 시료조작에 따라 얻은 검액을 상기 2)와 동일한 방법에 따라 실험을 행하여 Rf 0.39와 Rf 0.42의 피크 적분치로 부터 鹿茸중의 ganglioside류를 정량하였다.

4) 회수율시험

梅花鹿 상대의 검액에 ganglioside류의 각 표준액을 첨가하여 상기 2)와 동일한 방법에 따라 실험을 행하여 회수율을 산출하였다.

유리아미노산 함량 측정

鹿茸류 각 분말시료 2.0g을 정밀히 달아 0.02 N HCl 25 ml을 넣어 초음파진탕기에서 3시간 추출 여과하여 여액에 0.02 N HCl 용액을 넣어 50 ml로 하여 아미노산 측정용 검액으로 하였다. 따라서, 아미노산 혼합표준용액(0.3 μmol/ml)을

Table I. Analytical conditions of amino acids

Item	Condition
Column	2.6×150 mm
Ion-exchange resin	Hitachi #2619
Analytical cycle time	70 min
Buffer flow rate	0.225 ml/min
Ninhydrin flow rate	0.3 ml/min
Buffer change steps	5 steps
Column temperature	53°C

실험 결과

Ganglioside 함량

검량선의 작성

소의 뇌에서 분리한 ganglioside 표준품(Sigma Co.) 중에서 Rf 0.39 및 Rf 0.42를 나타내는 ganglioside를 정제한 것을 표품으로 하여 zig-zag TLC scanner를 이용하여 각각의 표준품을 2.0~15.0 μg/ml의 영역에서 검량선을 작성한 결과 양호한 직선성을 얻었다. Rf 0.39 및 Rf 0.42의 검량선은 Fig. 1에 표시하였고 회귀방정식은 각각 $y=54330.1+9110.9x$ ($r=0.9908$), $y=25497+13740.9x$ ($r=0.9999$)이었다.

첨가회수시험

梅花鹿 상대의 시료에 각각 표준품 5.0, 10.0, 15.0 μg/ml씩을 첨가하여 회수율을 측정된 결과 Table II에 나타낸 바와 같이 Rf 0.39는 104.6~107.1%, Rf 0.42는 102.5~105.3%로 양호한 회수율을 얻을 수 있었다.

Table II. Reproducibility of gangliosides(Rf 0.39 and Rf 0.42) by zig-zag TLC scanner

Sample	Ganglioside(%)	
	Rf 0.39	Rf 0.42
1	104.6	102.5
2	106.7	105.3
3	107.1	101.2
Mean	106.1	103.0

시료의 분석

산지별, 부위별 및 등급별에 따른 시료를 본 방법을 이용하여 분석한 경우 모든 시료에서 정량이 가능하였으며 zig-zag TLC chromatogram scanning profile은 Fig. 2A와 Fig. 2B에 나타내었고 정량결과는 Table III 및 Table IV에 나타내었다.

산지별 시료에서 중국산 梅花鹿이 Rf 0.39 및 Rf 0.42의 ganglioside 함량이 각각 1637 μg/g,

1225 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았으며 녹각에서는 전혀 검출되지 않았다. Rf 0.39물질의 평균이 상대는 946 $\mu\text{g/g}$, 중대 245 $\mu\text{g/g}$, 하대 411 $\mu\text{g/g}$ 이며 Rf 0.42의 물질의 경우는 상대 861 $\mu\text{g/g}$, 중대 269 $\mu\text{g/g}$, 하대 323 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났으며 상대가 하

대보다도 현저히 높음을 알 수 있었다. 부위별 시료의 경우에는 첫번째 분리된 각의 상부인 region 4에서 2035 $\mu\text{g/g}$ 으로서 최고를 나타냈으며 다음은 본래 각의 상부인 region 1로 1532 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 또한, 등급별 ganglioside 함량을

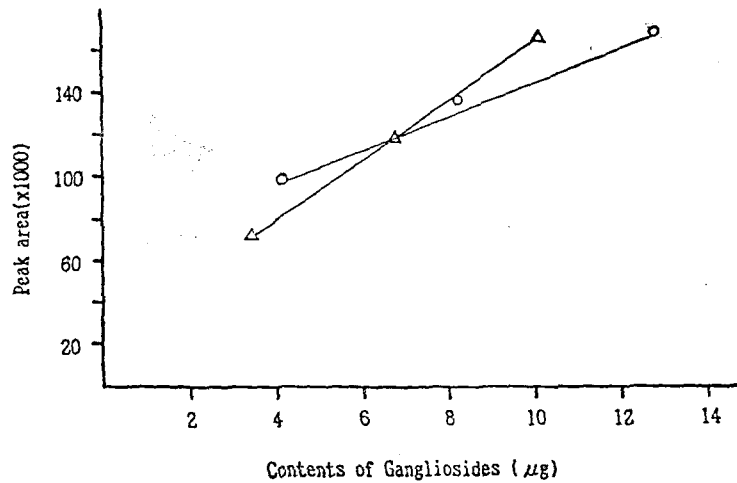


Fig. 1. Calibration curves of gangliosides of Rf 0.39 and Rf 0.42
 ○; gangliosides of Rf 0.39 ($y=54330.1+9110.9x$, $r=0.9908$)
 △; gangliosides of Rf 0.42 ($y=25497.3+13740.9x$, $r=0.9999$)

Table III. Ganglioside contents (Rf 0.39 and Rf 0.42) of various deer horn

Samples	Contents of ganglioside($\mu\text{g/g}$)			
	Rf 0.39	Rf 0.42	Total	
New Zealand deer horn	Upper part	1174	900	2074
	Middle part	374	344	718
	Lower part	727	376	1103
China deer horn (Red deer)	Upper part	233	190	423
	Middle part	68	99	167
China deer horn(Japanese deer)	Upper part	1637	1225	2862
	Lower part	411	348	759
Soviet deer horn	Upper part	740	979	1719
	Middle part	294	364	658
	Lower part	95	246	341
Alaska deer horn	Upper part	611	435	1046
Cervi Cornu	N	N	N	
Min.	N	N	N	
Max.	1637	1225	2862	
Mean	530	459	989	

N: not detected

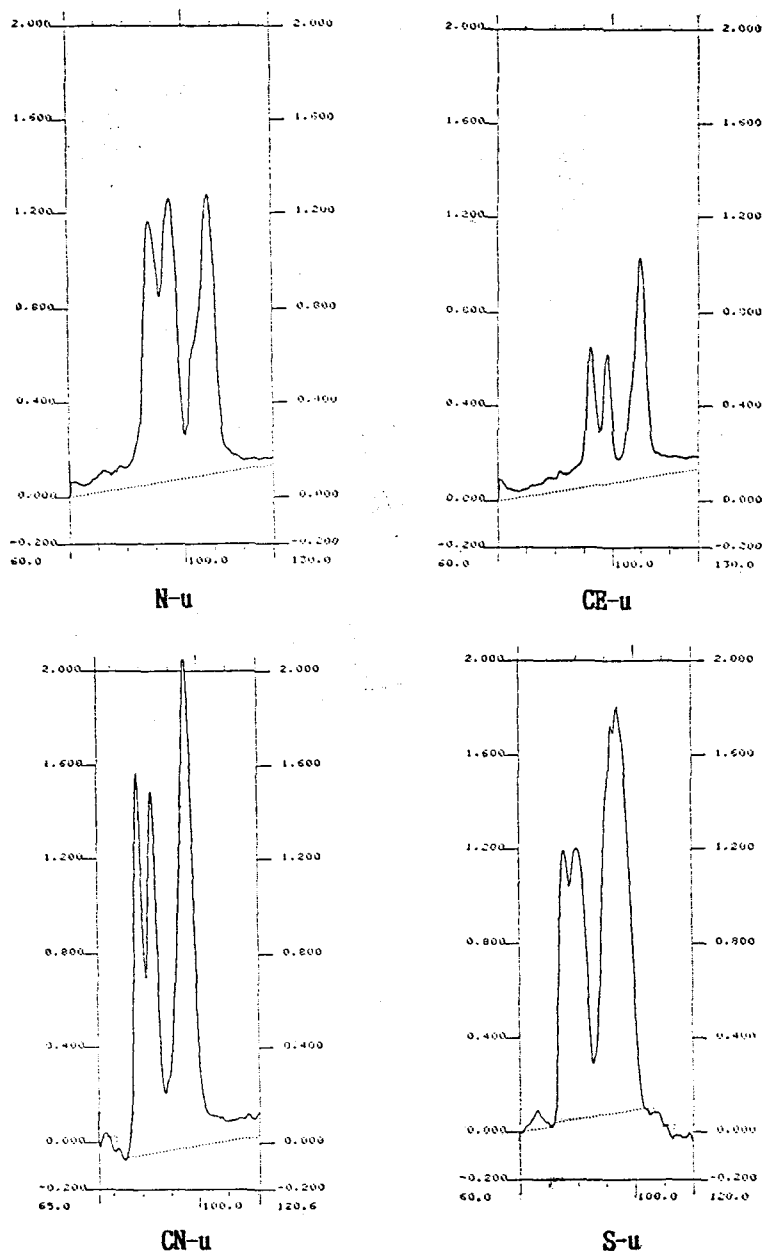


Fig. 2A. Scanning profiles of gangliosides in deer horns
 Abbreviations; N: New Zealand, CE: China(馬鹿), CN: China(梅花鹿),
 S: Soviet, U: upper parts
 Adsorbent: Kieselgel 60F₂₅₄ precoated TLC plate(Merck Co.)
 Developing solvent: CHCl₃-MeOH-0.02% CaCl₂(60 : 35 : 8)
 Visualization: heating at 105°C for 10min after spraying anisaldehyde-sulfuric acid
 solution.
 Scanning: dual wavelength TLC scanner.

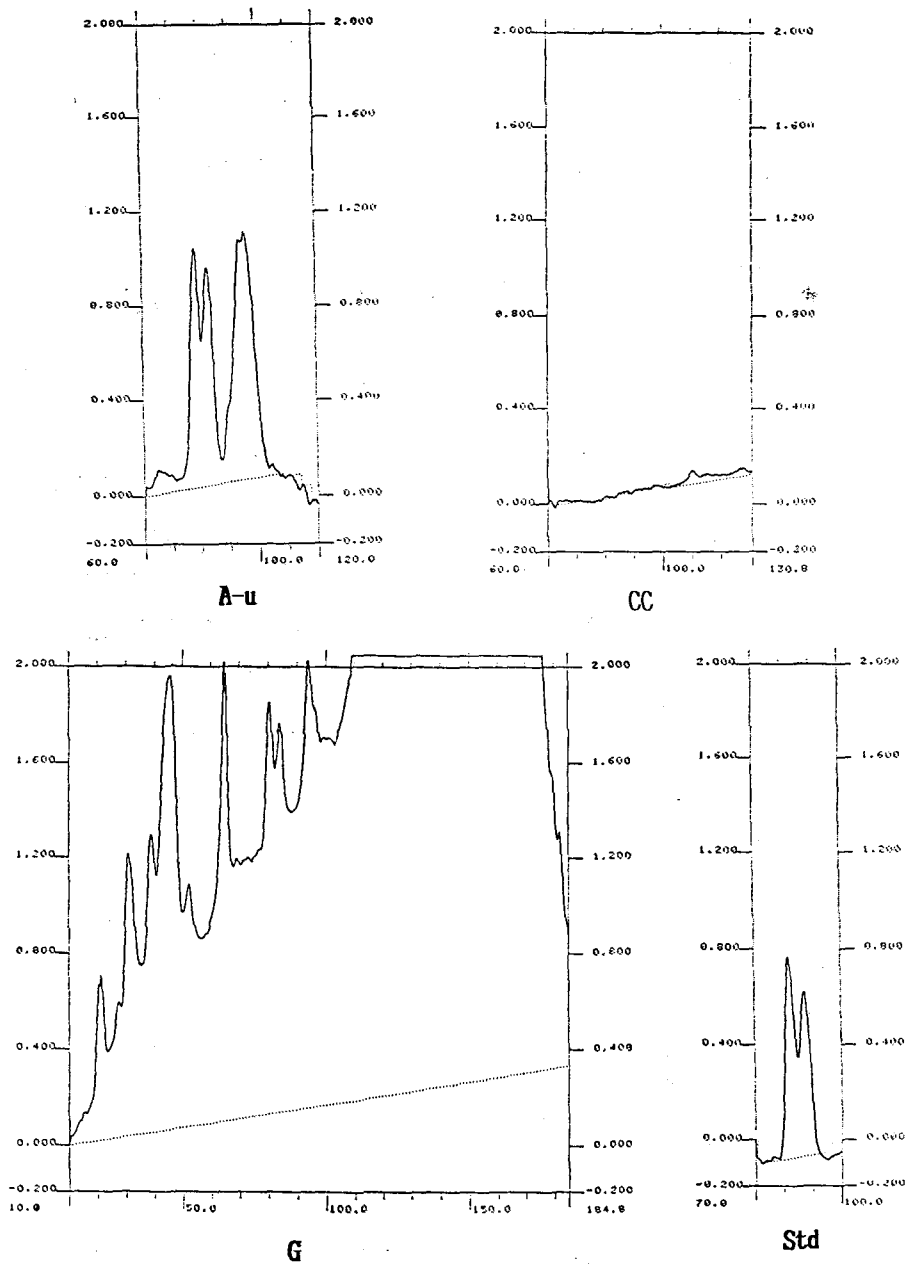


Fig. 2B. Scanning profiles of gangliosides in deer horns
 Abbreviations; A: Alaska, CC: Cervi Cornu
 G: Gangliosides Type II from bovine brain
 Std: Isolated Gangliosides (Rf 0.39 and Rf 0.42) from G
 Adsorbent, developing solvent, visualization and scanning: the same conditions with the Fig. 2A.

살펴보면 각질화가 되지않고 조적이 치밀하며 색상이 진한 적갈색 내지 담황색을 보이는 부분이 많은 시료 일수록 함량이 증대되어 가장 우

수한 등급인 시료 A의 경우 1514 $\mu\text{g/g}$ 이었고 가장 낮은 등급인 시료 E는 9 $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었다.

Table IV. Ganglioside(Rf 0.39 and Rf 0.42) contents of various regions from Red deer horn and various grades from Soviet deer horn

Samples	Contents of ganglioside($\mu\text{g/g}$)		
	Rf 0.39	Rf 0.42	Total
Regions ^{a)}			
1	1121	411	1532
2	61	248	309
3	N	98	98
4	1269	765	2034
5	856	711	1567
Mean	660	447	1107
Grades ^{b)}			
A	692	823	1515
B	440	399	839
C	326	303	629
D	27	61	88
E	N	9	9
Mean	157	319	476

N: not detected

a) : Regional samples

- 1 : The top region of the main deer horn.
- 2 : The middle region of the main deer horn.
- 3 : The lower region of the main deer horn.
- 4 : The top region of the first branched deer horn.
- 5 : The top region of the second branched deer horn.

b) : Graded samples

- A : Non-calcificated, soft and fine tissue.
- B : Hardly calcificated and slightly rough tissue.
- C : Slightly calcificated($\pm 10\%$) and rough tissue.
- D : More calcificated(20~30%) and hard tissue.
- E : Mostly calcificated(above 50%) and very hard tissue.

전보에 보고한 바 있는 Ca 함량과 ganglioside 총함량과의 상관관계는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 Ca 함량이 높은 시료일수록 ganglioside 총함량은 낮아지며 ganglioside 함량이 높을수록 Ca 함량은 낮아짐을 알 수 있었다.

유리아미노산 함량

鹿茸시료를 아미노산 자동분석기로 분석한 유리아미노산 함량을 Table V 및 Table VI에 나타내었다.

Lysine을 비롯하여 16종의 유리아미노산의 함량을 조사한 바 개개의 유리아미노산의 함량 및 총 유리아미노산 함량은 상대에서 하대로 갈수록 함량이 감소하며, 산지 별로는 중국산 馬鹿의 상대가 총 13.55 mg/g으로 가장 높았고 다음

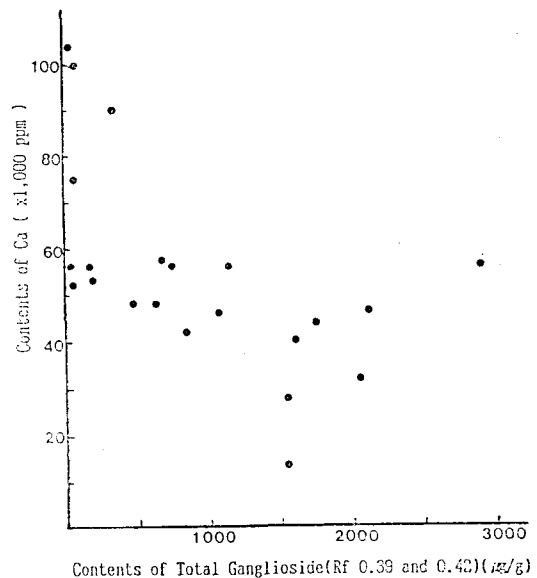


Fig. 3. Correlation between contents of Ca and ganglioside in deer horn

Table V. Contents of amino acids in various deer horns(mg/g)

Samples	New Zealand deer horn			Red deer horn		Japanese deer horn		Soviet deer horn			Alaska deer horn	Cervi Cornu
	U	M	L	U	M	U	L	U	M	L	U	
Lysine	0.55	0.28	0.27	1.32	0.54	0.39	0.15	0.40	0.20	0.15	0.67	0.04
Histidine	0.09	0.04	0.03	0.10	0.05	0.02	0.05	0.12	0.06	0.04	0.05	N
Arginine	0.15	0.13	N	0.02	0.01	0.02	0.02	0.05	0.10	0.10	0.37	N
Aspartic acid	0.34	0.02	0.04	0.73	0.32	0.02	N	0.14	0.02	0.06	0.30	N
Threonine	0.38	0.24	0.18	0.49	0.33	0.10	0.12	0.38	0.15	0.10	0.46	N

Serine	0.66	0.25	0.16	N	0.21	0.09	0.06	0.49	0.15	0.12	N	N
Glutamic acid	1.05	0.86	0.53	1.97	1.93	1.09	0.50	1.70	0.55	0.82	1.03	0.05
Proline	0.98	0.55	0.21	1.61	0.80	0.37	0.10	0.41	0.16	0.08	0.78	N
Glycine	1.47	1.05	0.56	0.52	2.42	0.80	0.70	1.05	0.52	0.37	2.11	0.03
Alanine	1.45	0.78	0.53	2.71	1.19	1.03	0.29	1.21	0.49	0.33	1.91	N
Valine	0.54	0.28	0.21	1.05	0.32	0.37	0.18	0.45	0.21	0.14	0.66	0.04
Methionine	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.05	0.07	0.04	0.03	0.03	0.02
Isoleucine	0.28	0.11	0.10	0.58	0.18	0.16	0.13	0.25	0.11	0.09	0.25	0.02
Leucine	0.61	0.30	0.26	1.32	0.37	0.42	0.18	0.64	0.33	0.18	0.75	0.02
Tyrosine	0.30	0.16	0.16	0.32	0.17	0.09	0.79	0.27	0.14	0.09	0.27	0.02
Phenylalanine	0.51	0.29	0.52	0.78	0.33	0.41	0.92	0.65	0.34	0.21	0.99	0.77
Total	9.38	5.35	3.78	13.55	9.19	5.40	4.24	8.28	3.57	2.41	10.63	1.01

U: upper part, M: middle part, L: lower part, N: not detected

Table VI. Amino acid contents of various regions from Red deer horn(mg/g)

Amino acid	Region				
	1	2	3	4	5
Lysine	0.29	0.30	0.08	0.66	0.28
Histidine	0.03	0.05	0.01	0.05	0.07
Arginine	0.02	0.06	N	0.17	0.16
Aspartic acid	0.22	0.26	N	0.71	0.20
Threonine	0.14	0.05	0.05	0.60	0.33
Serine	0.92	0.13	N	1.28	N
Glutamic acid	0.83	0.70	0.10	1.48	0.66
Proline	0.51	0.43	0.21	1.14	0.26
Glycine	0.34	0.38	0.24	1.82	0.46
Alanine	0.84	0.91	0.11	1.71	0.51
Valine	0.21	0.23	0.06	0.66	0.22
Methionine	0.07	0.03	0.01	0.06	0.03
Isoleucine	0.09	0.07	0.01	0.45	0.09
Leucine	0.16	0.18	0.03	0.82	0.25
Tyrosine	0.26	0.22	0.07	0.48	0.20
Phenylalanine	0.50	0.31	0.24	0.89	0.29
Total	5.43	4.31	1.22	12.98	4.01

N: not detected

1~5: regional samples

- 1: The top region of the main deer horn.
- 2: The middle region of the main deer horn.
- 3: The lower region of the main deer horn.
- 4: The top region of the first branched deer horn.
- 5: The top region of the second branched deer horn.

은 알래스카, 뉴질랜드산 상대의 순으로 나타났다. 녹각에서는 총 유리아미노산 함량은 1.01 mg/g으로 가장 낮았고 histidine, arginine, aspartic acid, threonine, serine, proline, alanine 등은 전혀 검출되지 않았다. 부위별 시료에서는 첫번째 분지된 각의 상부인 region 4가 가장 높은 함량을 나타내었으며 그 다음이 원가지의 상부인 region 1의 순이었다.

고찰 및 결론

Ganglioside는 glycolipid로서 sphingosine에 지방산이 결합한 ceramide를 기본으로 sialic acid, glucose, galactose 및 galactosamine등이 결합되어 있으며 주로 중추신경계의 회백질에 고농도로 분포하고 있다.⁸⁾ Ganglioside의 분석에 관한 연구로는 Ando 등⁹⁾, Robert 등¹⁰⁾, Miyazaki 등¹¹⁾, Whalen 등^{12,13)}에 의해서 HPLC, TLC, ion exchange high performance chromatography 등을 이용하여 정량적으로 분석 보고한 바 있다. 따라서 저자들은 鹿茸의 함유성분중에서 ganglioside를 지표물질로 하여 鹿茸의 산지별, 기원 동물, 부위별, 등급별로 鹿茸류중의 ganglioside 함량을 정량적으로 분석하므로써 鹿茸의 품질과의 상관성을 검토하였다.

녹용분말을 CHCl₃-MeOH(4:1)의 혼합액으로 추출하여 얻은 추출물로 부터 alumina column chromatography를 행하여 분리한 ganglioside를 Kieselgel 60F₂₅₄ precoated TLC plate에 전개서

켜 anisaldehyde-sulfuric acid 용액을 분무하고 105°C에서 10분간 가열하여 발색시킨 후 dual wavelength TLC scanner로써 피이크 적분법으로 정량하였다. Rf 0.39와 Rf 0.42의 물질에 대한 검량선을 작성하여 본 결과 양호한 직선성 ($r=0.9908$, $r=0.9999$)을 나타내었고 표준품 첨가회수시험에서도 양호한 회수율(102.5~107.1%)을 얻을 수 있었다.

鹿茸의 산지별 부위별 ganglioside의 함량분포는 상대가 하대보다도 현저히 높음을 알 수 있었고 녹각에서는 전혀 검출되지 않았다. 반면에 증대에서 하대보다도 낮은 함량을 보인 것은 뉴질랜드산 시료에 있어서 분지된 각을 하대로 분류하여 사용하여 매우 높은 함량을 나타낸 것에 기인하는 것으로 사료되며 이에 대해서는 계속 검토하고자 한다. 또한, 부위별 및 등급별 시료에서도 上部로 갈수록, 등급이 양호한 것 일수록 ganglioside의 함량은 증가하는 경향을 나타냄이 인정되었고 부위별 시료에서는 첫번째 분지된 각의 상부가 가장 높은 함량을 보였다.

鹿茸중의 ganglioside 분석에 관한 연구로는 전 등¹⁴⁾이 HPTLC에 의하여 鹿茸중 glycolipid로서 GD_{1a}와 GM₁을, 松浦¹⁵⁾는 GM₃의 존재를 예측, 보고한 바 있다. 저자들은 소의 뇌로부터 얻은 ganglioside 표준품(Sigma Co.)을 이용하여 분리한 Rf 0.39와 Rf 0.42를 갖는 각각 ganglioside를 표준품으로 하여 본 실험에 사용하였으나 앞으로 계속하여 이들 화합물의 성분을 규명동정하고자 하며, 구조가 동정된 ganglioside를 표준품으로 한 비교분석을 행하고자 한다.

전보⁷⁾에서 보고한 Ca 함량과 ganglioside 함량과를 비교분석한 바 역상관관계를 나타내었으며 Ca 함량이 높은 시료일수록 ganglioside 총합량은 낮아짐을 알 수 있었고 Ca 함량이 낮은 것일수록 등급이 양호하며 ganglioside 총합량은 증가함이 인정되었다. 일반적으로 품질이 양호한 鹿茸일수록 수용성 엑스, 알콜엑스 및 에틸엑스의 함량은 높고 회분의 함량은 적은 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 따라서, Ca 함량과 ganglioside 함량과의 상관관계를 비교분석하므로써 鹿茸의 품질 즉 등급 또는 상대, 증대, 하대등을 구분하는 데에 이용할 수 있을 것으로 생각되며 계속

연구검토하고자 한다.

鹿茸류중에 함유되어 있는 아미노산중에서 lysine을 비롯한 16종의 유리아미노산 개개 및 총합량은 각의 상부로 갈수록 함량이 증가되었으며 특히 lysine, glutamic acid, proline, alanine 등은 매우 일관성 있는 함량분포를 나타냄이 인정되었다. 산지별로는 중국산 鹿茸 상대가 가장 높았고 알래스카, 뉴질랜드산 상대의 순이었고 부위별 시료에서는 첫번째 분지된 각의 상부에서 가장 높은 함량을 보여 ganglioside 함량분포와 유사한 경향을 나타내었다.

이상의 결과로 미루어 보아 鹿茸중의 ganglioside 함량 및 유리아미노산의 함량을 분석검토하고, 鹿茸중의 회분량, Ca, Fe, Zn등 금속함량 및 ganglioside의 TLC pattern 분석등을 함으로써 鹿茸류의 품질관리에 활용될 수 있으리라 생각되며 이러한 요소들과 鹿茸류의 효능과의 상관성에 대한 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 사용한 실험재료는 사단법인 한국의약품수출입협회에서 제공한 것이며 기원동물의 사육기간, 채취시의 성장정도, 사육조건등이 충분히 고려되지 않았으므로 이에 대한 검토도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀—본 연구사업을 수행하는 데 있어서 연구비를 지원하여 준 사단법인 한국의약품수출입협회에 진심으로 감사드립니다.

(1992년 6월 5일 접수 : 11월 3일 수리)

참 고 문 헌

1. 이상인, 지형준 : 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해, 한국메디칼인덱스사, p.103 (1988).
2. 中國衛生府約典委員會 篇 : 中國約典, 北京, 人民衛生出版社, p.557 (1978).
3. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.1128 (1979).
4. 黃道淵 : 大方藥合編, 서울, 杏林出版社, p.289 (1979).
5. 李時珍 : 本草綱目, 大灣, 全省名大書局, p.1558 (1975).
6. 小學館 篇 : 中約大事典 (4), 東京, 小學館, p.2786 (1985).
7. 홍남두, 원도희, 김남재, 장승엽, 윤황금, 김혜수 : 생약학회지 22, 171 (1991).

8. Windholz, M.: *The Merck Index*(10th), U.S.A., Merck Co., p. 4231 (1983).
9. Ando, S., Isobe, M. and Nagai, Y.: *Biochim. Biophys. Acta* 424, 98 (1976).
10. Robert, W., Ledeen, W. and Robert, K.-Yu: *Methods in Enzymology* 83, 139 (1982).
11. Miyazaki, K., Kamura, N., Kishimoto, Y. and Lee, Y.: *Biochem. J.* 235, 755 (1986).
12. Whalen, M.M., Wild, G.C., Spall, W.D. and Sebring, R.J.: *Lipids* 21, 267 (1986).
13. Nakabayashi, H., Iwamori, M. and Nagai, Y.: *J. Biochem.* 96, 977 (1984).
14. 박은정, 김현수, 전길자: 대한화학회 학술대회 발표초록집, p. 30 (1991).
15. 한국생약학회, 국립보건원: 생약제제의 품질평가에 관한 워크샷, p. 81 (1991).