J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 3, pp. 271~275 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

소의 혈액 및 근육 중 choline 농도 분석을 위한 효소측정법의 적용기법의 개발

김영일[1] · 정원철 · 손호영[2] · 김 석 · 허 연[3] · 이후장*
경상대학교 수의과대학 생명과학연구원, [1]건양대학교 제약공학과
[2]경상남도 양산시 농업기술센터, [3]사과나무 임상연구소

Application of Enzymatic method to Determine Choline Concentration in Bovine Blood and Muscle

Young-Il Kim[1], Won Chul Jung, Ho Yeong Shon[2], Suk Kim, Yoen Hur[3], and Hu Jang Lee*
Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
[1]Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea
[2]Agricultural Technology Center, Yangsan City Hall, Yangsan 626-701, Korea
[3]Apple Tree Laboratory, Seoul 152-870, Korea
(Received August 6, 2008/Revised August 23, 2008/Accepted September 10, 2008)

ABSTRACT – Choline is important an organic compound for normal membrane function, acetylcholine synthesis, lipid transport, and methyl metabolism. In biological tissues and foods, there are multiple choline compounds that contribute to choline content. There are so many analytical methods for choline determination, such as radioisotopic, high-performance liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. However, these existing methods are expensive, unmanageable, and time-consuming. In this study, we modified enzymatic method, which is applicable for the determination of choline in milk and infant formulas, and applied to bovine serum and muscle. The calibration curves were linear with higher correlation coefficients than 0.994 . Recoveries obtained by calibration curves from the spiked bovine serum and muscle samples varied between 70.6 and 85.2%. The method may be suitable for use as a routine method in the determination of choline for biological tissue and food samples.

Key words: Choline, Enzymatic method, Bovine serum, Bovine muscle

콜린은 비타민 B 복합체에 속하는 수용성의 필수 영양소이며, 세포벽을 구성하고 있는 인지질과 신경전달성 아세틸콜린 내에서 발견되는 유기화합물로서, 세포막의 구조 유지와 신호전달 역할, 아세틸콜린 합성을 통한 콜린성 신경전달, 그리고 메칠기의 주요한 공급원으로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다[1,2].

콜린 결핍이 일어나면, 인체에서는 간의 손상이 일어난다고 보고되고 있으며, 쥐에서는 간의 콜린과 콜린대사물의 농도가 감소하고, 간암의 발생 증가 및 발암성분에 대한 감수성의 증가와 상관성이 있는 것으로 보고되고 있다[3-5]. 과량의 콜린을 섭취할 경우, 생선 비린내가 나게 되는데, 이는 콜린이 체내에서 대사될 때, 생선 비린내를 내는 트리메틸아민을 과량으로 형성하게 되기 때문인 것으로 알려져 있다[6].

미국과학아카데미 산하 미국의학연구소의 식품영양위원회의 자료에 따르면, 성인에 있어서 콜린의 하루 적정 섭취량은 425-550 mg으로 설정되어 있다[7].

콜린 보충제는 '머리를 좋게 하는 약'으로 취급되고 있는데, 이는 신경전달성 아세틸콜린이 뇌에서 다양한 인식 시스템에 영향을 미치고 있기 때문인 것으로 보인다. 콜린은 신경전달성 아세틸콜린의 생산을 위한 화학적 전구물질로서, 콜린의 보충이 신경전달 물질인 아세틸콜린의 농도를 뇌 조직에서 현저히 증가시키고 콜린성 신경세포를 활성화시켜 학습 및 기억력 향상에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[8-10]. 또한, 콜린과 같은 아세틸콜린 전구물질은 galantamine과 함께 상승작용을 통하여 기억력을 증진시키고 알츠하이머병을 개선시키는 것으로 보고되고 있다[11,12].

콜린의 보충이 콜린성 신경세포의 활성을 통해 학습 및 기억력 향사에 효과가 있다는 보고를 근거로 최근, 시중

*Correspondence to: Hu Jang Lee, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
Tel: 055) 751-6642, Fax: 055) 751-5803
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

에서 시판되는 일부 유제품 속에 콜린 함유량을 증가시켜 뇌를 좋게 하는 기능성 식품으로 판매되고 있다.

콜린은 지질 대사작용에 중요한 역할을 담당하는 관계로, 간 지방을 감소시키기 위한 영양 공급원으로 사용되기도 하지만, 콜린이 과도한 체지방의 감소에 어떤 효과가 있다거나 콜린의 과량섭취가 지방 대사율을 증가시킨다는 명확한 증거는 없는 상태이다[13].

콜린의 가장 주요한 전달 형태인 phosphatidylcholine이 풍부한 식품들로는 난황, 닭고기, 송아지고기 그리고 칠면조 간 등이 있으며, 대부분의 식품들은 미량의 유리 콜린을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[14].

2004년에 미국농무성은 일반 식품들에 존재하는 콜린의 양에 대한 데이터베이스를 처음으로 공개하였다. 이 데이터베이스에 따르면, 유리 콜린, glycerophosphocholine, phosphocholine, phosphatidylcholine 그리고 sphingomyelin을 모두 합한 총 콜린의 양이 가장 많은 식품은 신선한 익히지 않은 달걀의 노른자로 나타났다.[14]

식품이나 생체 시료 중의 콜린에 대한 기기분석방법으로는, 방사성 동위원소를 이용한 liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography-radiometric detector (HPLC-RD), HPLC-electrochemical detector, 그리고 enzymatic method-flow injection analysis (enzymatic method-FIA) 등이 있다[15-18]. 그러나, 콜린에 대한 기기분석방법들은 대부분 고가의 장비를 필요로 하며, 일부는 방사성 동위원소 취급을 위한 특수시설들을 갖추어야 한다. 또한, 시료의 전처리에 있어서 많은 시간, 노력, 그리고 경비 등을 필요로 하며, 기기조작에 있어서도 숙련된 연구 인력을 필요로 한다.

따라서, 본 연구에서는 우유 및 이유식 중의 콜린의 농도을 측정하기 위해 사용되고 있는 효소측정법[19]을 응용하여, 소의 혈액 및 근육에 함유되어 있는 콜린의 신속검출을 위한 방법을 확립하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서 사용된 choline bitartrate, choline oxidase, phospholipase D, peroxidase, tris (hydromethyl) aminomenthane (Trizma), 그리고 4-aminoantipyrine 표준품은 Sigma-Aldrich Korea (Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 효소와 4-aminoantipyrine은 4°C 냉장 보관하여 시험에 사용하였다. 기타의 시약은 분석용으로 구입하여 실험에 사용하였다.

실험용액의 제조

(1) 1.0M HCl 용액-85 ml HCl을 1L의 부피플라스크에 넣고 증류수를 이용 하여 정량선까지 채운다.

(2) 50% NaOH 용액-50g NaOH를 100 ml 눈금실린더에 넣고 약 80 ml 증 류수를 이용하여 용해시킨 후, 정량선까지 증류수로 채운다.

(3) Stock choline 표준용액(choline hydroxide 2500 μg/ml)-100 ml 부피플라 스크에 523 mg choline bitartrate를 넣고, 증류수로 용해시킨 후, 정량선까 지 증류수를 채운다. 본 용액은 4°C 냉장 보관하였으며, 1주일에 한번씩 만들어 사용하였다.

(4) Working choline 표준용액(choline hydroxide 250 μg/ml)-stock choline 표준용액을 증류수로 10배 희석한다. 본 용액은 매일 만들어 사용하였다.

(5) 0.05M (pH 8.0) Tris (hydromethyl) aminomenthane (Trizma) buffer-250 ml의 증류수가 담긴 1L 부피플라스크에 6.057g tris (hydromethyl) aminomenthane을 용해시킨 후, 정량선까지 증류수를 채 운다. 본 완충액은 1M HCl을 이용하여 pH를 8.0으로 조정한다.

(6) 발색용액-100 ml 부피플라스크에, 0.67 mg phospholipase (100 units), 12 mg choline oxidase (120 units), 3.5 mg peroxidase(280 units), 15 mg 4-aminoantipyrine, 그리고 50 mg phenol을 넣고, 용해 시킨 후, 0.05M Trizma buffer를 이용하여 정량선까지 채운다. 발색용액은 매일 제조하여 사용하였다.

시료의 채취

본 실험에 사용된 소의 혈액 및 근육은 경상남도 김해시 소재 부경양돈농협공판장에서 도축 전 7일 동안 콜린을 급여하지 않은 도축우를 대상으로 EDTA가 처리된 vacuum container에 100 ml 혈액을 채취하였고, 근육시료 200 g을 채취하였다. 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리하여 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

콜린 농도의 측정

소의 혈액 및 근육 중 콜린 분석은 Woollard[19]의 우유 및 이유식에서의 효소측정법을 응용하여 적용하였다.

시료의 전처리 - 100 ml의 원심분리 시험관에 시료 5 g (5 ml)을 넣고, 30 ml 1M HCl을 가한 다음, 뚜껑을 닫고 잘 흔들어 혼합하였다. 원심분리 시험관을 70°C 수조에 3시간 동안 반응시킨 다음, 실온에서 식힌 후, 50% NaOH 용액을 이용하여 pH를 3.5-4로 조정한 용액을 50 ml 부피플라스크에 옮겨 증류수를 이용하여 정량선까지 채웠다. 거름종이를 이용하여 가수분해물질을 제거한 여과액을 4°C 냉암소에 3일 동안 보관한 후, 시험에 사용하였다.

냉암소에 3일 동안 보관한 여과액에 콜린 표준용액을 spike 하여 농도가 각각 25, 50, 100, 150, 200, 그리고 250 μg/ml이 되도록 용액을 만들었다.

콜린의 표준곡선의 작성 - 콜린 표준용액을 이용해 작

성한 곡선의 기울기를 구하기 위하여 10 ml 원심분리 시험관 6개에 각각 25, 50, 100, 150, 200, 그리고 250 μg/ml의 콜린 표준용액 0.1 ml를 가하고, 콜린 표준용액 대신 0.1 ml 증류수를 넣은 10 ml 시험관(reagent blank)을 더 준비하였다.

시료전처리 여과액에 콜린 표준용액을 spike하여 만든 용액을 각각 0.1 ml씩 농도 당 10ml 시험관 2개씩(tube 1, tube 2)에 넣었다. 6개의 tube 1(sample blank)에 3ml 증류수를 넣었고, 나머지 6개의 tube 2(sample test solution), 6개의 콜린 표준용액 tube, 그리고 reagent blank tube에 각각 3 ml 발색용액을 가하여 37°C 수조에서 15분 동안 반응시킨 후, 실온에서 15분 정도 식힌 다음, 각각의 반응액을 optical cell에 옮겨, 505 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

콜린 표준용액의 농도와 흡광도 간의 기울기(S)와 소 혈액 및 근육 시료의 총 흡광도(A, 시료의 흡광도(Asmp)-Sample blank 흡광도(Abl)-reagent blank 흡광도(Areag))를 구하여 다음과 같이 콜린 농도를 구하였다.

Choline (as choline hydroxide, mg/100g) = A/S

따라서 위의 식을 이용하여 소의 혈액 및 근육 중 콜린의 농도와 흡광도 간의 상관관계를 이용하여 콜린 표준곡선을 작성하였다. 모든 자료는 3반복하여 평균값을 구하여 사용하였다.

회수율 조사 - 시료에 대한 회수율을 조사하기 위하여 소의 혈청과 근육 시료에 50과 150 μg/ml 농도로 콜린 표준용액을 spike하여, 시료의 전처리 방법에 따라 처리한 후, 흡광도를 측정하여 콜린 농도를 구한 다음, 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{회수율}(\%) = \frac{\text{분석을 통해 구한 콜린의 농도}}{\text{시료에 첨가된 콜린의 농도}} \times 100$$

결과 및 고찰

표준곡선

콜린의 표준용액을 이용해 작성한 곡선의 기울기, S는 0.00306 ± 0.00009 (n = 12)이었으며, reagent blank의 흡광도, Areag의 값은 0.02 ± 0.0021이었다. 소의 혈액 및 근육에서의 sample blank의 흡광도, Abl의 값은 0.01 ± 0.001 (n = 10)로 같게 나타났다. 소의 혈액과 근육에서의 콜린의 농도와 콜린 표준용액으로 spike한 시료의 흡광도사이의 관계를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과, 소의 혈액과 근육에서의 r^2값은 각각 0.995와 0.0.994로 매우 양호한 직선성을 나타내었다(Fig 1).

Woollard[19]의 연구에서, 콜린의 표준용액을 이용하여 작성한 곡선의 기울기가 0.00322를 나타내어, 본 연구의 결과와 유사한 값을 보였다. 또한, Koc 등[16]이 liquid chromatographyl/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry (LC/ESI-IDMS)를 이용하여, 마우스의 간과, 랫드의 뇌와 혈액, 익힌 쇠고기와 닭고기, 당근, 그리고 양배추 등의 조직시료와 식품들에서 콜린농도를 분석하였는데, 표준곡선의 r^2값이 0.995를 나타내어, 본 연구에서의 소의 혈액과 근육의 표준곡선의 r^2값과 유사하게 나타났다.

회수율조사

콜린 표준용액을 소의 혈청(5 ml)과 근육(5 g)에 각각 50과 150 μg/ml가 되도록 첨가하여 회수율을 구한 결과는 Table 1에 나타내었다.

소의 혈청에서의 회수율은 50과 150 μg/ml의 각각의 농도에서 80.3과 85.2%를 보였다. 소의 근육에서의 회수율은 50과 150 μg/ml의 각각의 농도에서 70.6과 76.2%를 나타내었다. 소의 혈청에서의 회수율이 근육시료의 회수율

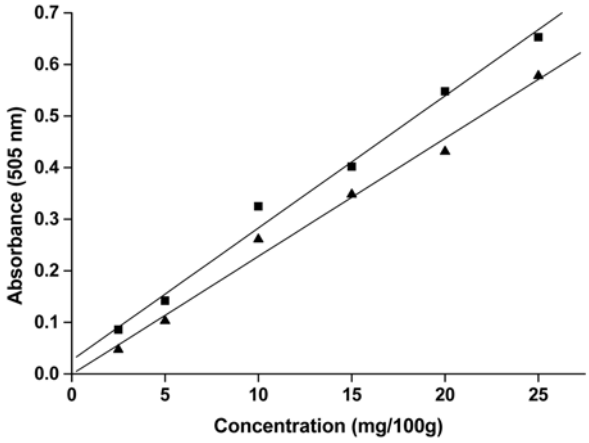

Fig 1. Calibration standard curves of choline as choline hydroxide in bovine serum(■) and muscle(▲). Choline concentration was expressed as choline hydroxide.

Table 1. Recoveries of choline from fortified bovine serum and muscle tissue samples

Samples	No. of Samples	Fortified concentration (μg/ml)	Recovery (%)	
			Range	Mean
Bovine serum	3	50	77.9-82.7	80.3
		150	82.6-87.5	85.2
Bovine muscle	3	50	67.7-72.8	70.6
		150	72.5-79.4	76.2

보다 다소 높게 나타났으며, 혈청과 근육 시료 모두에서 낮은 농도 보다는 높은 농도에서의 회수율이 높은 경향을 보였다.

Rader 등[20]은 Woollard[19]의 효소측정법을 식이보조제에 함유된 콜린의 함량을 측정하기 위하여 적용하였다. 이유식을 포함한 식이보조제들에서의 콜린의 회수율은 85-114%로 보고하였다. Zhang 등[21]은 가축의 사료첨가제에 콜린을 10과 50 mg/l의 농도로 spiking하여 ion-exchange liquid chromatography를 이용하여 회수율을 조사한 결과, 각각 106과 112%의 회수율을 보였다고 보고하였다. 또한, Koc 등[16]은 랫드의 간에 콜린을 spiking하여 LC/ESI-IDMS를 이용하여 회수율을 조사하여 91.6%의 회수율을 보였다고 보고하였다.

본 연구에서 콜린을 50과 150 μg/ml로 spiking한 소의 혈액과 근육에서의 회수율이 모든 70.6% 이상의 결과를 보여, 위 연구의 결과들과 비교하여 다소 낮은 회수율을 나타내었다.

위의 연구결과들과 비교하여, 회수율에 있어서 다소의 차이를 보이는 것은 대상 시료의 종류, 콜린의 첨가농도 그리고 추출 및 분석방법 등에 따라 회수율이 편차를 보이는 것으로 사료된다.

본 연구에서, 세포벽을 구성하고 있는 인지질과 신경전달성 아세틸콜린 내에서 발견되는 유기화합물인 콜린의 함량 분석을 위해, 우유 내 콜린함량을 분석하는데 사용된 효소측정법을 응용하여 소의 혈액 및 근육 내에서의 콜린함량을 분석할 수 있는 기법을 확립하였다. 이 기법은 많은 생체시료와 식품에 함유된 콜린 함량분석에 용이하게 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-314-E00193).

요 약

콜린은 정상적인 세포벽의 기능, 아세틸콜린의 합성, 지질의 운송, 그리고 매칠기의 공급원으로서 중요한 유기화합물이다. 생물학적인 조직과 식품들 중에 있는 콜린의 분석을 위해 많은 기기분석법들 사용되고 있다. 그러나 이러한 기기분석법들은 고가의 장비를 필요로 하며, 조작이 어렵고, 많은 시간을 필요로 한다.

본 연구에서는 우유 중의 콜린함량을 분석하는데 사용되는 효소측정법을 응용하여 신속하게 소의 혈액과 근육 내에 함유된 콜린을 측정할 수 있는 적용기법을 확립하였다. 소의 혈청과 근육에 콜린 표준용액을 spike하여 얻은 표준곡선들은 직선성을 나타내었으며, 0.994 이상의 상관계수를 보였다. 소의 혈청과 근육에서의 회수율은 70.6-85.2%를 보였다.

본 연구를 통하여 확립된 콜린분석법은 생체시료와 식품에 함유된 콜린 함량분석에 용이하게 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Best, C.H. and Huntsman, M.E.: The effects of components of lecithin upon deposition of fat in the liver. *J. Physiol*. **75**, 405-412 (1932).
2. 정한옥, 김초일, 이행신, 정영진: 한국인의 성별, 연령별, 지역별 콜린 섭취 추정량. 한국영양학회지, **38**, 320-326 (2005).
3. Burt, M.E., Hanin, I. and Brennan, M.F.: Choline deficiency associated with total parenteral nutrition. *Lancet* **2**, 638-639 (1980).
4. Tayek, J.A., Bistrian, B., Sheard, N.F., Zeisel, S.H. and Blackburn, G.L.: Abnormal liver function in malnourished patients receiving total parenteral nutrition: A prospective randomized study. *J. Am. Coll. Nutr*. **9**, 76-83 (1990).
5. Zeisel, S.H., Zola, T., daCosta, K. and Pomfret, E.A.: Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentration in rat liver. *Biochem. J*. **259**, 725-729 (1989).
6. Pardini, R.S. and Sapien, R.E.: Trimethylaminuria (fish odor syndrome) related to the choline concentration of infant formula. *Pediatr. Emerg. Care*. **19**, 101-103 (2003).
7. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board: Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, panthothenic acid, biotin and choline. National Academy Press, Washington, DC (1998).
8. Meck, S.H. and Williams, C.L.: Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory. *Neuroreport* **8**, 2821-2835 (1997).
9. Olariu, A., Tran, M.H., Yamada, K., Mizuno, M., Hefco, V. and Nabeshima, T.: Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J. Neural. Transm*. **108**, 1065-1079 (2001).
10. Moriyama, T., Uezu, K., Matsumoto, Y., Chung, S.Y., Uezu, E., Miyagi, S., Uza, M., Masuda, Y., Kokubu, T., Tanaka, T. and Yamamoto, S.: Effects of dietary phosphatidylcholine on memory in memory deficient mice with low brain acetylcholine concentration. *Life Sci*. **58**, PL111-118. (1996).
11. Modrego, P.J.: The effect of drugs for Alzheimer disease assessed by means of neuroradiological techniques. *Curr. Med. Chem*. **13**, 3417-3424 (2006).
12. Sweeney, J.E., Bachman, E.S. and Coyle, J.T.: Effects of different doses of galanthamine, a long-acting acetylcholinesterase inhibitor, on memory in mice. *Psychopharmacology* **102**, 191-200 (1990).

13. Piepenbrink, M.S. and Overton, T.R.: Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J. Dairy Sci*. **86**, 1722-1733 (2003).
14. Juliette, C.H., Juhi, R.W. and Joanne, M.H.: USDA database for the choline content of common food. USDA Nutrient Data Laboratory, Beltsville, pp. 1-26 (2004).
15. Lima, J.L., Delerue-Matos, C., Carmo, M. and Vaz, V.F.: Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection. *Analyst* **125**, 1281-1284 (2000).
16. Koc, H., Mar, M.H., Ranasinghe, A., Swenberg, J.A.and Zeisel, S.H.: Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Chem*. **74**, 4734-4740 (2002).
17. Kaneda, N., Asano, M. and Nagatsu, T.: Simple method for the simultaneous determination of acetylcholine, choline, noradrenaline, dopamine and serotonin in brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr*. **360**, 211-218 (1986).
18. Pomfret, E.A., daCosta, K.A., Schurman, L.L. and Zeisel, S.H.: Measurement of choline and choline metabolite concentrations using high-pressure liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem*. **180**, 85-90 (1989).
19. Woollard, D.C. and Indyk, H.E.: Determination of choline in milk and infant formulas by enzymatic analysis: collaborative study. *J. AOAC Int*. **83**, 131-138 (2000).
20. Rader, J.I., Weaver, C.M. and Trucksess, M.W.: Extension of AOAC official method 999.14 (choline in infant formula and milk) to the determination of choline in dietary supplements. *J. AOAC Int*. **87**, 1297-1304 (2004).
21. Zhang, J. and Zhu, Y.: Determination of betaine, choline and trimethylamine in feed additive by ion-exchange liquid chromatography/non-suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr. A* **1170**, 114-117 (2007).