

RP-HPLC법에 의한 무우의 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate의 정량

김미리·이혜수*

충남대학교 식품영양학과, *서울대학교 식품영양학과

Quantitative Determination of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate in Radish Root by RP-HPLC

Mee Ree Kim and Hei Soo Rhee*

Department of Food & Nutrition, College of Science, Chungnam National University, Daejeon

* Department of Food & Nutrition, College of Home Economics Seoul National University, Seoul

Abstract

RP-HPLC (Reverse phase-high performance liquid chromatography) assay which was introduced to measure quantitatively the amount of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate in the radish root, proved to be convenient, accurate and reproducible, showing a good linearity between 10 n moles/ml and 120 n moles/ml ($r = 0.9997$).

The results of this assay showed that while the isothiocyanate was hydrolyzed slowly in the basic medium, it decomposed rapidly in the acidic aqueous medium. On the other hand, the isothiocyanate was relatively stable in the organic solvent (65% acetonitrile).

Also, it was found that intact root of Korean radish contain 210-420 μ moles/100g, based on the measurement with radish homogenate (pH 8.5, 1 min).

서 론

무우(Raphanus sativus L)는 우리 나라에서 배추 다음으로 많이 재배되고 소비되는 채소로서 독특한 매운 맛을 지닌 것으로 잘 알려져 있다. 이 매운 맛은 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(MTBI)에 의해 기인된 것으로 Friis 등⁽¹⁾의 여러 연구팀^(2,3)에 의해 보고된 바 있다. 그러나 이러한 연구들은 MTBI의 분리와 정성적인 확인에 국한하였고, Kjaer 등⁽⁴⁾이 단무지에서 이 성분의 상대적 함량의 측정을 보고한 바도 있으나 정량적인 분석은 제대로 이루어 지지 않았다. 이어서 김등⁽⁵⁾은 무우로부터 MTBI를 추출시 추출방법에 따라 회수율이 달라지며, 특히 이 성분이 수용액에서 불안정한 것임을 시사한 바 있다.

최근 Diana 등⁽⁶⁾은 무우에 함유된 MTBI의 정량분석을 위해 효소처리 후 생성된 MTBI의 함량을 가스분석기에 의해 정량적으로 평가한 바 있으나 회수율에 있어서 문제점이 있음을 언급하였다.

따라서 본 실험에서는 MTBI의 간편하고 정확한 정량분석법을 확립하고자 RP-HPLC 분석법에 의한 MTBI의 함량측정의 최적 조건을 설정하였고, 표준점

량곡선을 통해 이 정량분석법을 평가하였다.

재료 및 방법

실험 재료

주재료인 무우(Taeback)는 대전시내 시장에서 구입하여 사용하였고, 3-benzoyl pyridine은 Aldrich에서, acetonitrile은 Tedia에서 각각 구입하였고, 증류수는 이온교환수지처리와 재증류를 통한 후 여과(0.45 μ m, Millipore)시켜 사용하였고 기타 시약은 GR grade이었다. MTBI는 김등⁽⁷⁾에 의해 보고된 정제법에 의해 분리정제한 후 231nm($\lambda_{max} = 7,500$)에서의 UV 흡광도에 의거 함량을 측정하였다.

실험 방법

표준품과 무우시료의 제조: MTBI 표준물질은 10, 20, 40, 80, 120 n mole/ml acetonitrile 농도로 제조하였고 내부표준물질⁽⁸⁾인 3-benzoyl pyridine은 11.7n mole/ml acetonitrile가 되도록 함유시켰다. 검량곡선의 평가를 위해서 사용된 무우는 가열한 무우 homogenate로서, 즉 무우 속에 함유된 MTBI의 제거를 위해 무우 30g에 증류수 2배를 넣고 homogen-

ization 시켜 20분간 방치한 후 10분간 끓여 본래 존재하던 MTBI를 제거시켜 제조된 시료였다. 한편, 생무우 시료중에 함유된 MTBI의 측정을 위해서는 생무우 homogenate 즉, 무우 30g을 0.1M borate 완충액(pH 8.5) 60ml에서 homogenization 시킨 후 상온에서 1분간 방치시켜 제조된 시료를 사용하였다.

RP-HPLC법에 의한 성분분석 및 표준검량곡선 작성: 성분분석은 김등⁷⁾의 방법에 따라서 C₁₈ column (particle size, 5 μ m, 20 \times 0.8cm, Waters Assoc., Gilford, MA)을 사용하였고, 이동상 용매로는 acetonitrile: water (65:35) 혼합 용액이었고, flow rate는 1.5 ml/min이었다. 분석시 사용된 일반적인 주입량은 50 μ l이었으며 column에서 분리된 각 성분은 absorbance detector(Waters Assoc., Model-440)로 254nm, 0.05AUFS에서 검출하였고, peak 면적은 자동적분기(Waters Assoc.)로 계산하였다. 시료처리하는 일반적으로 150 μ l 시료에 350 μ l의 acetonitrile를 넣고 3-benzoyl pyridine 9 μ l를 함유시킨 후 그 중 50 μ l를 기기에 주입하였다.

Stability test: 수용액 속에서의 안정성을 알아보기 위해 일정량의 MTBI를 pH 6 및 8.5의 완충액에 각각 넣고서 상온에서 시간경과(0분, 1분, 3분, 10분, 20분)에 따라 남아있는 MTBI의 양을 표준검량곡선에 의거 백분율로 표시 평가하였다. 한편, 유기용매의 경우는 65% acetonitrile를 사용하였다.

pH에 따른 UV spectrum의 변화: 일정량의 MTBI를 여러 pH의 완충액 즉, 0.1M borate buffer(pH 7.85, 7.0, 6.0), 0.1M acetate buffer(pH 4.5, 3.0)에 넣고 일정시간(1분, 3분, 10분, 20분) 방치 후에 UV spectrum을 관찰하였다.

정량분석결과 평가(정밀성, 정확성, 회수율): 가열한 무우 homogenate에 일정량의 isothiocyanate를 넣고 이중 150 μ l를 취해 350 μ l의 acetonitrile과 혼합하고 3-benzoyl pyridine 9 μ l를 넣은후 그중 50 μ l를 기기에 주입, peak area ratio를 구하여 이론치와 실험치를 비교 분석하여 정밀성, 정확성, 회수율을 평가하였다.

생무우 함량측정: 생무우 homogenate의 150 μ l를 350 μ l의 acetonitrile과 혼합한 후 3-benzoyl pyridine 9 μ l를 가한 후 기기에 주입하여 함량을 측정하였는데 이때 사용된 생무우 homogenate는 homogenation 후 약 1분 후의 시료이었고 별도로 1분, 3분, 5분, 10분 후에도 측정하였다.

결과 및 고찰

MTBI를 internal standard인 3-benzoyl pyridine과 함께 RP-HPLC를 통해 얻은 결과는 Fig.1과 같다. 각 성분은 단일 peak로 분리되었으며 이들의 retention time은 3-benzoyl pyridine이 4.3분, 그리고 MTBI가 6.1분이었다. 이들 peak의 분리에 있어서 실제의 시료 중에는 방해물질이 존재하지 않았기 때문에 분리결과가 좋았다. 한편 internal standard인 3-benzoyl pyridine을 사용하여 MTBI의 표준검량곡선을 작성한 결과(Fig.2), 10~120 n moles/ml에서 좋은 직선관계를 나타내었고 이때의 상관계수(r)=0.9997이었다. 따라서 이 검량곡선에 의거해서 MTBI의 함량의 정량적인 분석을 수행하였다. 먼저 MTBI의 수용액 및 유기용매에서의 안정성을 조사한 결과, Fig.3에서와 같이 유기용매(65% acetonitrile)를 함유한 용액에서는 안정한 반면에, 수용액에서는 pH에 따라서 안정도가 매우 달랐다.

즉, 알칼리용액(pH 8.5)에서 1분내에는 거의 분해되지 않았고 10분 및 20분 방치 후에 10% 및 20%의 분해도를 보인 반면에, 산성용액에서는 비교적 빠른 분해를 나타내어 20분 후에는 75% 이상의 분해를 보여 주었다. 이러한 결과는 Fig. 4에서와 같이 MTBI의 자

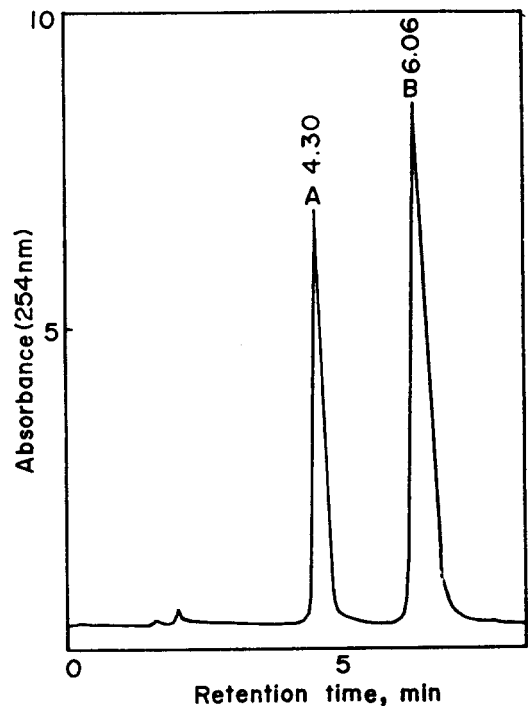


Fig. 1. RP-HPLC chromatogram
A: 3-benzoylpyridine
B: 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate

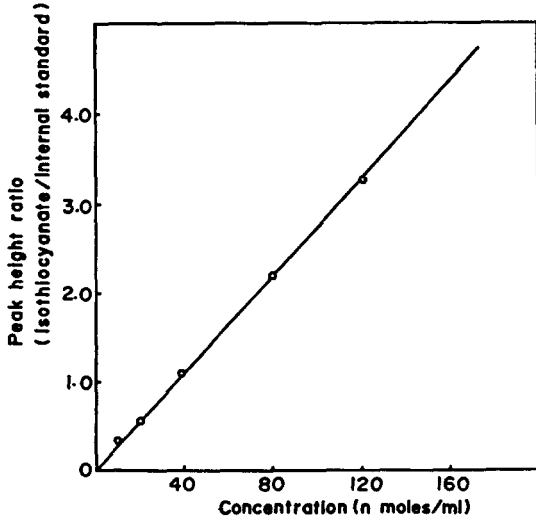


Fig. 2. Calibration Curve

외선흡수곡선이 pH에 따라서 변하는 결과와 일치하였다.

즉 MTBI가 수용액에서 시간이 경과됨에 따라 최대 흡수파장이 231nm에서 265nm로 전환하였는데, 이러한 변화를 231nm에서의 자외선 흡수 감소정도(△○, D.)로 표시하였을때, 산성용액에서는 △○, D.가 컸으며, pH8.5이상에서는 매우 작게 나타났다 (Fig.4. inset 참조) 따라서 MTBI는 산성용액에서 분해가 잘 일어나며 알카리성용액에서는 거의 분해되지 않는것으로 사료되었다.

별도의 실험에서, 265nm에서 최대흡수도를 갖는 이 분해산물을 HPLC로 확인한 결과 MTBI보다 극성이

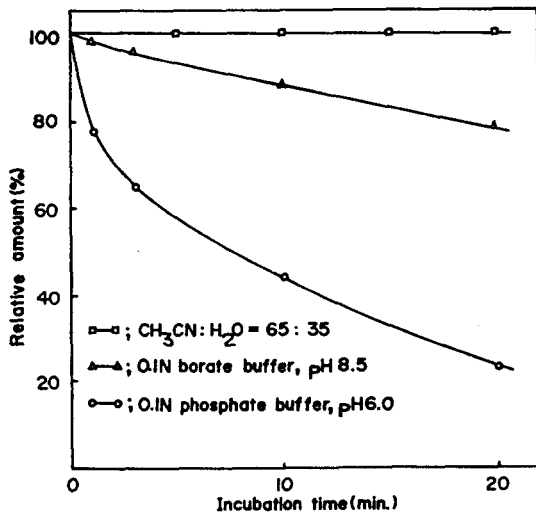


Fig. 3. Stability of 4-methylthio-3-butenyl Isothiocyanate

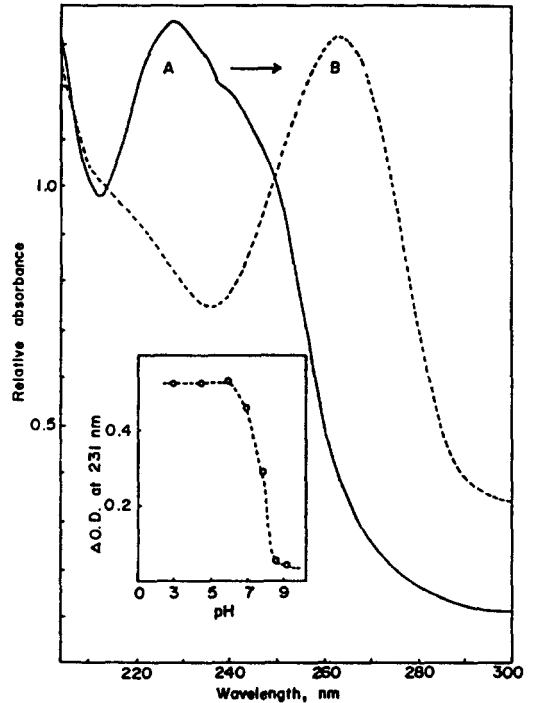


Fig. 4. Effect of pH on the UV spectrum change of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate; A: at start, B: after 20 min incubation in acetate buffer, pH 5.0. Inset: Plot of O. D. at 231 nm of MTBI versus pH after 20 min reaction

더 큰 것으로 나타났다.

이상의 결과는 MTBI의 thioenol ether기가 산성에서 불안정하다는 보고⁽¹⁾를 뒷바침 해준다. 한편 pH8.5의 완충액에서 1분내에는 안정하다는 결과와 65% acetonitrile 유기용매에서 안정하였다는 결과를 함께 고려하였을때, MTBI의 회수율을 최대로 하기 위한 무우시료 처리의 최적조건은 다음과 같다. 즉, pH8.5에서 1분 이내에 무우를 homogenation 한 후 acetonitrile를 첨가하여 65% acetonitrile 용액이 되도록 하여 MTBI를 안정화시킨 후에 정량하는 것이 이상적인 것임을 알 수 있었다.

상기 조건하에서 무우시료 중의 MTBI를 제거시킨 가열한 무우 homogenate에 분리정제한 MTBI의 일 정량을 첨가하여 분석한 결과는 Table 1, 2.에서와 같다. Intra-assay(동일시험관내 시료분석)와 Inter-assay(시험관별 시료분석)⁽⁹⁾에서 각각 5%이내의 오차를 보였으며, 무우 homogenate에 첨가된 MTBI의 회수율은 거의 99%로서 재현성이 매우 좋았으므로, 이 RP-HPLC 정량법⁹의 유용성을 알 수 있었다.

한국산 무우 중의 MTBI의 측정을 위해서 무우를

Table 1. Intra-assay Variation

Theoretical conc. (n moles/ml)	Experimental conc. (n moles/ml)	Experimental conc. Mean ± SD	Coefficient of Variation %
18	18.5	18.9 ± 0.43	2.28
	19.3		
	19.3		
	18.4		
34	36.6	36.1 ± 0.35	0.97
	36.1		
	35.8		
	35.7		
72	70.9	71.0 ± 0.50	0.70
	71.8		
	71.0		
	70.4		
140	142.5	141.5 ± 1.15	0.81
	139.6		
	142.3		
	141.5		

미세분쇄후 측정된 MTBI의 함량은 1분에 최대에 달하였고 그후 시간경과에 따라 서서히 감소하였다.

이러한 결과는 무우 homogenate 즉, 무우의 조직을 파괴시켰을 때 효소에 의해서 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate로부터 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(MTBI)의 생성이 단시간 내에 거의 완전히 이루어지는 것으로 보여지며 이러한 결과는 Friis 등⁽¹⁾의 보고와도 유사한 것이다. 이러한 분석법에 의해 한국산 시중 무우 중에 있는 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate로부터 생성되는 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate의 함량은 210~420 μ moles/100g에 해당하는 것

Table 2. Inter-assay Variation

Theoretical conc. (n moles/ml)	Experimental conc. (n moles/ml)	Experimental conc. Mean ± SD	Coefficient of Variation %
30	28.5	29.1 ± 0.55	1.89
	29.1		
	29.6		
52	51.7	50.1 ± 1.55	3.09
	50.6		
	48.0		
88	92.4	89.6 ± 2.25	2.50
	89.5		
	86.9		
130	136.8	133.1 ± 2.69	2.00
	130.5		
	132.0		

로 Diana 등⁽⁶⁾의 결과보다 다소 높게 나왔다. 이러한 차이는 Diana 등⁽⁶⁾의 실험과정 중에서의 시료처리에 의한 MTBI의 일부 분해에 의한 것으로 사료된다.

아울러 무우잎에도 대략 20 μ moles/100g에 해당하는 함량의 MTBI가 검출되었다.

따라서 이 정량법은 여러 가지 채소류 중 MTBI의 함유여부, 확인이나 가공처리된 무우 중의 함량측정등에도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

RP-HPLC 방법에 의해 무우 속에 존재하는 MTBI의 함량을 정량적으로 측정 해 본 결과 10 nmoles/ml 와 120 nmoles/ml 사이에서 좋은 직선적인 상관관계($r=0.9997$)를 나타내었으며, 편리하고 정확(오차 5%내외)하며 재현성(recovery 99%)이 높았다.

또, MTBI는 알카리용액 중에서는 서서히 분해되었으나 산성용액 중에서는 매우 빠르게 분해되었으며, 이 결과는 231nm 에서 UV 흡광도가 서서히 감소하는 결과와도 일치하였다.

한편, MTBI는 유기용매(65% acetonitrile)에서 비교적 안정하였다.

또한, 한국산 생무우 중에 함유된 MTBI는 최적추출조건을 pH8.5에서 1분내에 분석하였을때 210~420 μ moles/100g 정도이었다.

문 헌

1. Friis, P. and Kjaer, A.: *Acta Chem. Scand.*, **20**, 698 (1966)
2. Kjaer, A., Madsen, J.L., Maeda, Y. and Uda, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(9), 1715 (1978)
3. Brandsma, L., Vermeer, P., Kooijman, J.G.A., Boelens, H. and Maessen, J.T.M.: *RECUEIL*, **91**, 729 (1972)
4. Kjaer, A., Madsen, J., Maeda, Y., Ozawa, Y. and Uda, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(11), 1989 (1978)
5. Kim, M.R. and Lee, H.S.: *Korean J. Soc. Food Sci.*, **1**(1), 33 (1985)
6. Diana, G.C., Daxenbichler, M.E., VanEtten, C.H., Hill, C.B. and Williams, P.H.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110**(5), 634 (1985)
7. Kim, M.R. and Lee, H.S.: *Korean J. Soc. Food Sci.*, **2**(2), (1986)
8. Utley, D.: *J. Chrom.*, **265**, 311 (1983)
9. Ellin, R.I., Zvirblis, P. and Wilson, M.R.: *J. Chrom.*, **228**, 235 (1982)