

합초(*Salicornia herbacea* L.)로부터 베타인 정량 - 연구노트 -

이창호[†] · 김인호 · 김영언 · 오세욱 · 이호준

한국식품연구원

Determination of Betaine from *Salicornia herbacea* L.

Chang-Ho Lee[†], In-Ho Kim, Young-Eon Kim, Se-Wook Oh and Ho-Jun Lee

Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do 463-746, Korea

Abstract

The betaine content of *Salicornia herbacea* L. was determined by reverse-phase high performance chromatography on a C₁₈ column. A 50% methanol extract was passed through a anion exchanger Ambelite IRA 400 (quaternary ammonium type, OH⁻) column and a strong cation exchanger Ambelite IR 120 (sulfonic acid type, H⁺) column to remove amino acids, zwitter ions which are interfere with betaine analysis. The betaine extract was derivatized with 18-crown-6-ether and 4-bromophenacyl bromide (PBPB) for UV-labelling. Betaine in *Salicornia herbacea* L. was analysed on a mobile phase contained 13 mM sodium heptane sulfonic acid and 5 mM Na₂SO₄ in deionized water by isocratic elution for 30 min. The recovery ratio of betaine from *Salicornia herbacea* L. extract was 83.6%. The mean betaine value for *Salicornia herbacea* L. determined by the described method is 4.85 mg/mL with a standard deviation of 0.127.

Key words: *Salicornia herbacea* L., betaine, HPLC, halophyte, osmolyte

서 론

합초(*Salicornia herbacea* L.)는 염전 주변이나 갯벌에서 자라는 염생식물로 명아주과(*Chenopodiaceae*)에 속하며 마디가 통통하게 튀어나온 풀이라 하여 통통마디라고 한다. 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등의 미네랄이 다른 식물에 비해 풍부하고, 필수 지방산인 리놀렌산도 전체 지방산중 약 50% 함유되어 있으며, 필수아미노산의 함량이 총아미노산 함량 대비 약 40%를 함유한 것으로 보고되고 있어(1,2) 건강 기능성 식품 소재로 매우 유용하다. 합초와 같은 염생식물(halophyte)의 경우 고농도의 염스트레스에 내성을 가지기 위해 betaine 과 같은 양쪽성 물질(zwitterionic compound)을 다량 함유하고 있으며 일부 내삼투압 특성을 가지는 세균에도 betaine이 osmolyte로 축적되어 고 삼투압 환경에 적응하는 것으로 알려져 있다(3,4). Betaine은 동식물계에 널리 분포하며 콜린의 생체내 최종 대사 산화물로 간에서 betaine-homocysteine methyltransferase(EC 2.1.1.5) 촉매하에 호모시스테인(homocysteine)으로부터 methionine의 생성을 위한 methyl group 공여체로 작용한다(5,6). 보고에 의하면 고농도의 혈중 호모시스테인은 혈관을 손상시키고 혈전을 형성시켜 동맥경화와 같은 질병을 일으키는 주요 위험 인자로 알려져 있어(7) 충분한 betaine의 공급은 혈중 호모시스테인의 농도를 저하시켜 혈관계 질환을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

이외에도 반복적인 betaine의 투여가 실험쥐의 간독성을 현저히 저하시키고(8), 사염화탄소에 의해 손상된 흰쥐의 간세포를 회복시킬 수 있다는 연구보고가 있다(9). 식물 및 동물 조직의 betaine에 대한 정량분석으로는 오래전부터 Dragendorff reagent(10)와 reineckate(11-13)를 이용한 방법 등이 있으나 재현성이 떨어지고 민감도가 낮은 문제가 있으며 그 외 capillary electrophoresis(14), pyrolysis-GC(15) 등을 이용한 방법이 시도되었으나 각각 민감도저하와 고비용 문제 등으로 인해 효율적인 분석 방법이 되지 못하였다. 최근 LC(16-20), LC-MS(21) 등을 이용한 정량분석이 일부 시도되었으나 quaternary ammonium compound인 betaine은 UV 흡수가 거의 없어 매우 낮은 파장의 측정범위를 가지며 vitamin 이나 amino acid와 공존할 경우 측정에 방해받을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 합초 추출물을 이온교환수지를 통과시켜 방해물질을 제거하고 4-bromophenacyl bromide(PBPB)로 betaine을 유도체화 하는 labeling method를 통하여 합초의 betaine 분석을 시도하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 합초(*Salicornia herbacea* L.)는 전남 해남 지역에서 채취하였으며 50°C에서 열풍건조한 다음 잎과

[†]Corresponding author. E-mail: chang@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9226, Fax: 82-31-780-9226

줄기 부분을 분쇄하여 분석용 시료로 사용하였다. Betaine 표준시약은 Sigma(St. Louis, Mo. USA)사 제품을, 기타 시약은 HPLC급을 사용하였고, 이온교환수지인 Amberlite IRA 400(OH)와 Amberlite IR 120(H)은 SUPELCO사 제품을 구입하여 사용하였다.

함초 추출물 제조

열풍건조한 함초분말 10 g(MC; 5.1%)을 50% methanol에 10%(w/v) 농도로 첨가한 후 homogenizer로 균질화한 다음 40°C shaking water bath에서 12시간 동안 추출하였다. 추출액을 3,000 g에서 15분간 원심분리한 후 상정액을 취해 10 mL가 되게 감압농축하였다.

이온교환수지 컬럼을 이용한 함초추출물 정제

강염기성 음이온 교환수지인 Amberlite IRA 400(OH)는 2 N NaOH와 1 : 2(v/v)의 비율로 혼합하여 2시간 동안 방치한 후 5 mL 일회용 주사기에 최종부피가 5 mL가 되도록 하여 컬럼(컬럼 I)으로 사용하였고, 강산성 양이온 교환수지인 Amberlite IR 120(H)는 2 N HCl과 1 : 2(v/v)의 비율로 혼합하여 2시간 동안 방치한 후 5 mL 일회용 주사기에 최종부피가 2.5 mL가 되도록 하여 컬럼(컬럼 II)으로 사용하였다. 함초 추출물 100 µL를 정확히 취하여 이를 이온교환수지컬럼 I, II에 차례로 연속 통과시킨 후 탈이온수 10 mL를 차례로 연속 통과시켜 세척하였고 4 N-NH₄OH 30 mL를 이온교환수지 컬럼 II에 통과시켜 betaine이 함유된 eluent를 회수하여 methanol 10 mL에 KOH 15 mg을 용해한 시액 300 µL를 가한 후 감압농축하였다.

Betaine 유도체화

이온교환수지 컬럼을 통과하여 감압농축한 건조 잔사에 acetonitrile 10 mL에 18-crown-6-ether 15 mg을 용해한 시액 200 µL와 acetonitrile 10 mL에 4-bromophenacyl bromide(PBPB) 20 mg을 용해한 시액 1.8 mL를 차례로 가한 후 40°C에서 30분간 반응시킨 후 냉각시켜 유도체화 한 다음 0.45 µm millipore filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

Betaine 분석조건

Betaine정량 분석을 위한 HPLC System은 JASCO(JASCO Co., Japan) HPLC pump(Model PU-980), autoinjector (Model AS-950-10) 및 UV/VIS detector(Model UV-975)로 구성되어 있으며, 컬럼은 Spherisorb 5 ODS2 column (250×4.6 mm i.d., 5 µm, Waters)을 사용하여 분석하였고, 이동상 용매는 13 mM sodium heptane sulfonic acid와 5 mM Na₂SO₄가 혼합된 용매를 1 N H₂SO₄용액으로 pH 3.7로 조정하여 사용하였으며 유속은 0.5 mL/min, 시료 주입량은 5 µL로 하여 200 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

함초와 같은 염생식물에 존재하는 betaine은 고농도의 염

환경에 적응하기 위한 osmoprotectant로써 작용하며 zwitterion 형태로 존재함으로써 수용액 상태에서 이온 및 다른 성분들의 방해로 인하여 분석에 많은 지장을 받게 된다. 따라서 함초 추출액에 존재하는 이온성 물질들을 제거하여 효과적으로 betaine 성분만을 농축, 정제하기 위하여 2단계 이온교환수지 컬럼을 사용하여 방해 물질들을 제거하였다(Fig. 1). 먼저 강염기성 음이온 컬럼인 Amberlite IRA 400(OH) resin 컬럼을 통과시켜 함초 추출액에 존재하는 아미노산 및 betaine 이외의 zwitterion 들을 흡착, 제거하며 2단계로 Amberlite IR 120(H⁺) resin 컬럼을 통과시켜 betaine의 carboxyl group이 resin과 강하게 결합하여 함초 추출물 가운데 betaine 성분만을 선택적으로 흡착, 농축시키고 이후 4 N-NH₄OH 용액으로 용출시켜 betaine 추출액을 제조하였다. Mar 등(19)에 의하면 4-bromophenacyl bromide(PBPB)은 carboxylic acid group를 가지는 물질과 결합하여 유도체를 형성하나 betaine과 구조가 매우 유사한 choline과는 유도체를 형성하지 않기 때문에 betaine의 정량 시 매우 용이하다는 연구보고가 있다. 본 연구에서는 PBPB를 이용하여 betaine을 유도체화한 UV-labelling을 통하여 betaine의 낮은 UV 흡수에 의한 검출 한계를 개선하고자 하였으며 HPLC에 의한 정량분석 시 분리능 개선을 확인하기 위하여 2단계 이온교환 수지를 통과시킨 betaine 추출액에 대하여 PBPB로 유도체화 시켜 UV-labelling 조작을 한 후의 크로마토그램과 UV-labelling을 하지 않은 크로마토그램을 비교하여 나타낸 것이다(Fig. 2). UV-labelling을 하지 않은 경우(Fig. 2, B) labelling한 경우와 비교하여 동일 농도의 시료에 의해 나타난 크로마토그램 상의 betaine의 피크 크기가 매우 작아 정량분석이 곤란하였다. Fig. 3은 betaine 정량분석을 위한 표준곡선을 나타낸 것이다. Betaine 용액 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL을 PBPB로 유도체화시킨 후 크로마토그램의 피크 면적을 측정하고 농도와 면적사이의 상관계수를 구하였다. 농도와 면

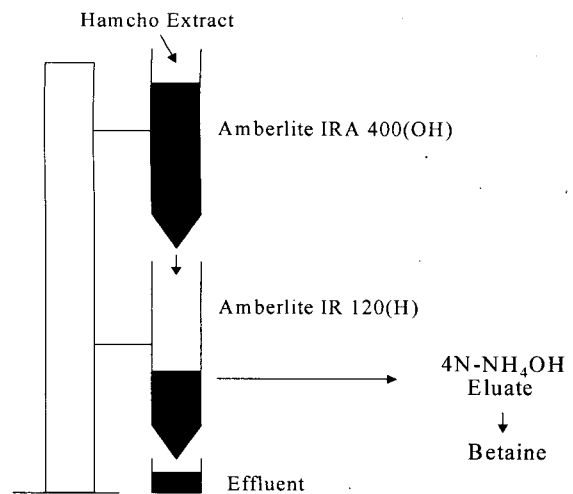


Fig. 1. Scheme for fractionation of extract by ion exchange chromatography.

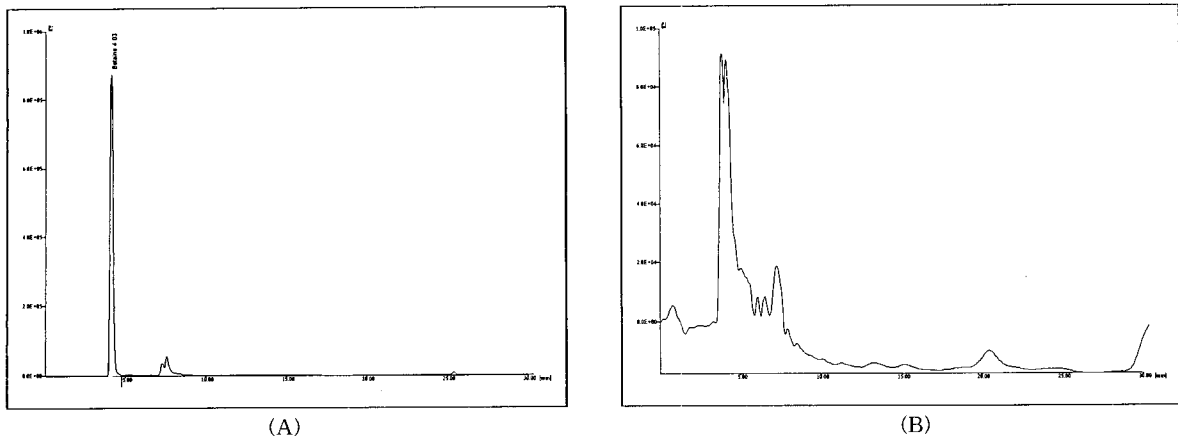


Fig. 2. Chromatographic profile of betaine from *Salicornia herbacea* L. extract. A: Derivatization, B: Non derivatization.

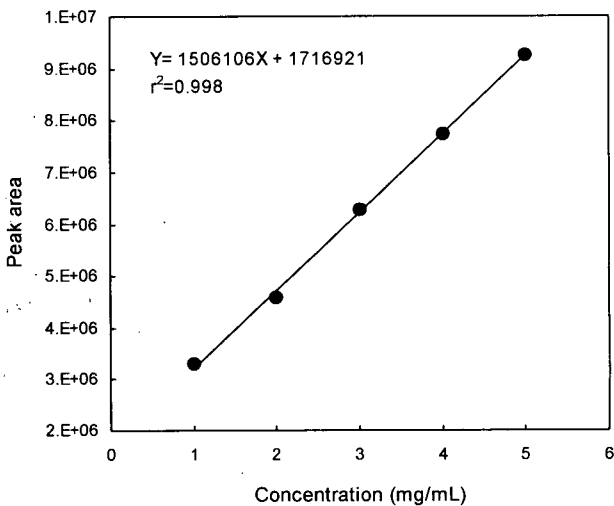


Fig. 3. Standard curve of betaine.

적 사이의 관계식은 $y=1506106 \times 1716921$ 로 나타났으며 상관계수 $r^2=0.998$ 로 나타났다. Table 1은 함초추출액에 대한 betaine 정량 및 회수율을 3회 반복하여 측정된 결과를 나타낸 것이다. 함초추출액을 2단계 이온교환수지 컬럼을 통과시켜 측정에 방해가 되는 불순물을 제거한 후 PBPB 시약으로

유도체화 하여 UV-labelling 조작을 한 후 HPLC로 측정된 결과 함초추출액 mL 당 4.85mg의 betaine이 함유되어 있는 것으로 나타났으며 이 때의 회수율은 88.7%로 나타났다.

요 약

해안가 및 폐염전 등에 서식하며 각종 미네랄, 아미노산 및 유용 생리활성 물질을 함유하고 있는 함초로부터 혈중 동맥경화 및 심장 질환 예방에 유효한 효능을 보일 것으로 예상되는 성분인 betaine을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 함초는 양쪽성 물질로 같이 존재하는 다른 이온성 물질들에 의해 방해를 받으며 UV 흡수가 매우 낮아 일반적인 정량방법으로는 분석이 매우 까다롭다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제를 해소하기 위하여 2단계 이온교환수지 컬럼을 이용하여 방해물질을 제거한 후 betaine을 4-bromophenacyl bromide (PBPB)로 유도체화시켜 UV-labelling 한 후 분석하였다. 이온교환수지를 통과한 함초추출물의 회수율은 83.6%이며 함초추출액 mL당 4.85mg의 betaine이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2004년 농림부 농림기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과에 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Min JG, Lee DS, Kim TJ, Park JH, Cho TY, Park DI. 2002. Chemical composition of *Salicornia herbacea* L. *J Food Sci Nutr* 7: 105-107.
2. Shimizu K. 2000. Effects of salt treatments on the production and chemical composition of salt wort (*Salicornia herbacea* L.), rhodesgrass and alfalfa. *Jpn J Trop Agr* 44: 61-67.
3. Park S. 1995. Effects of glycine betaine and related osmolytes on growth of osmotically stressed *Yersinia enterocolitica*. *Agri Chem Biochem* 38: 218-223.

Table 1. Recovery test and determination of betaine from *Salicornia herbacea* L. (mg/mL)

Sample	<i>S. herbacea</i> Extract	Betaine standard ¹⁾	Extract + betaine standard ²⁾	Recovery (%)
I	4.82	3.26	7.17	88.7
II	4.98	3.26	7.24	87.9
III	4.74	3.25	7.16	89.6
Average	4.85±0.13 ³⁾	3.26±0.01	7.19±0.05	88.70±0.01

¹⁾Betaine content of betaine standard solution (3 mg/mL) measured by HPLC.

²⁾Betaine content of *S. herbacea* extract added betaine standard measured by HPLC.

³⁾Average±SD (n=3).

4. Graham J, Wilkinson B. 1992. *Staphylococcus aureus* Osm⁻, oregulation: Roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *J Bacteriol* 174: 2711-2716.
5. Park EI, Renduchintala MS, Garrow TA. 1997. Diet-induced changes in hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity are mediated by changes in the steady-state level of its mRNA. *Nutri Biochem* 8: 541-545.
6. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. 1996. Betaine, ethanol, and the liver: A review. *Alcohol* 13: 395-398.
7. Motulsky AG. 1996. Nutritional ecogenetics: Homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 58: 17-20.
8. Kim SK, Kim YC. 1996. The effect of repeated betaine treatment on hepatotoxicity and cytochrome P-450 dependent drug metabolizing enzyme system. *Yakhak Hoeji* 40: 449-450.
9. Kim SY, Kim HP, Lee MK, Kim SH, Moon A, Han HM, Huh H, Kim YC. 1993. The effect of betaine on the CCl₄-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* 37: 499-503.
10. Stumpf DK. 1984. Quantitation and purification of quaternary ammonium compounds from halophyte tissue. *Plant Physiol* 75: 273-274.
11. Chang SH, Kim JS, Huh TS. 1971. Studies on the chemical components of fruits of *Forsythia koreana* NAKAI (II); Occurrence of betaine in the fruits of *Forsythia koreana*. *J Korean Chem Soc* 15: 1-3.
12. Rogers GR. 1970. Collaborative study of betaine in orange juice. *J AOAC* 53: 568-571.
13. Lewis WM. 1966. Chemical evaluation of orange juice in compounded soft drinks. *J Sci Food Agri* 17: 316-320.
14. Shimizu K, Ishikawa N, Tang J, Muranaka S, Cao W. 2003. Changes in the crude protein, ash and glycinebetaine concentrations and contents of *Salicornia herbacea* L. under salt treatment cultivation. *Jpn J Trop Agr* 47: 132-134.
15. Hitz WD, Hanson AD. 1980. Determination of glycine betaine by pyrolysis-gas chromatography in cereals and grasses. *Phytochem* 19: 2371-2374.
16. Janssens GPJ, De Rycke HD, Hesta M, De Wilde ROM. 1999. Analysis of carnitine, betaine, γ -butyrobetaine, and separate short-chain acylcarnitines in pigeon plasma, crop milk and tissues by HPLC coupled with UV-detection. *Biotechnol Techniq* 12: 231-234.
17. Bessieres MA, Gibon Y, Lefeuvre JC, Larher F. 1999. A single-step purification for glycine betaine determination in plant extracts by isocratic HPLC. *J Agric Food Chem* 47: 3718-3722.
18. Guy RD, Warne PG, Reid DM. 1984. Glycinebetaine content of halophytes: Improved analysis by liquid chromatography and interpretations of results. *Physiol Plant* 61: 195-202.
19. Mar MH, Ridkey TW, Garner SC, Zeisel SH. 1995. A method for the determination of betaine in tissues using high performance liquid chromatography. *Nutr Biochem* 6: 392-398.
20. Kikuchi N, Matsuno K, Miki T. 1993. Separation and determination of betaine in an oriental medicine by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 283: 338-343.
21. Shin YG, Cho KH, Kim JM, Park MK, Park JH. 1999. Determination of betaine in *Lycium chinense* fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatog A* 857: 331-335.

(2004년 8월 25일 접수; 2004년 10월 18일 채택)