

매실추출제품의 시안화합물 분석법에 관한 연구

김은정 · 이휘재* · 장진욱 · 김인영 · 김도형 · 김현아 · 이수민 · 장호원 ·
김상엽 · 장영미 · 임동길 · 이선희
부산지방식품의약품안전청

Analytical Determination of Cyanide in Maesil (*Prunus mume*) Extracts

Eun-Jung Kim, Hwee-Jae Lee*, Jin-Wook Jang, In-Young Kim, Do-Hyeong Kim, Hyun-Ah Kim,
Soo-Min Lee, Ho-Won Jang, Sang-Yub Kim, Young-Mi Jang, Dong-Kil Im, and Sun-Hee Lee
Busan Regional Korea Food & Drug Administration

Abstract Picrate, enzyme-picrate and instrumental analysis methods using IC (Ion Chromatography) and HPLC (High Performance Liquid Chromatography) were compared for their effectiveness in determining cyanide in extracts of Maesil, which is classified as a harmful substance. First, the picrate method showed the shortest analysis time (about 5 hr). The color of picrate paper changed at 0.01 mg/200 mL CN⁻. However, it was difficult to detect cyanide from amygdalin glucosides. Second, we performed a qualitative analysis for total cyanide (free cyanide and cyanide from amygdalin) by the enzyme-picrate method using β-glucosidase and a quantitative analysis by spectrophotometry. Finally, analysis of cyanide by IC and HPLC required the longest determining time (about 17 hr) as well as pretreatment for each free cyanide and amygdalin. These results suggest that enzyme-picrate is the most effective analysis method for the detection of cyanide in Maesil extracts.

Key words: Maesil (*Prunus mume*) extract, cyanide, picrate paper, β-glucosidase

서 론

매실은 장미과에 속하는 매화나무(*Prunus mume*)의 열매로, 원산지는 중국 동남부지방이며 한국, 중국 및 일본의 온난한 지역에 분포하고 있다(1). 매실은 강력한 알칼리성 식품으로 주로 차로 음용하거나, 술, 김치, 짬 등 각종 식품으로 개발하여 사용하고 있으며, 한방에서는 미숙과일(청매)을 약재로도 이용하고 있다(2,3). 최근 건강에 대한 관심이 늘어나면서 건강기능식품 시장이 확대됨에 따라 매실을 이용한 건강기능식품의 섭취 또한 가능하다. 건강기능식품 중 매실추출제품은 매실이 익지 않은 청매실 상태에서 수확하여 가공하는 것으로, 청매실에는 다량 섭취 시 유해한 시안배당체, 특히 아미그달린(Amygdalin, C₂₀H₂₇NO₁₁)이 상당량 함유되어 있다고 알려져 있다(4). 그러므로, 시안배당체의 제거에 의한 원료 및 제품의 안전성 확보가 중요하다고 하겠다.

시안배당체는 식물의 이차 대사산물에 속하며, 아미노산 유래의 식물구성 성분으로 현재 2,500종 이상의 식물에 존재하고 있다. 시안배당체의 가수분해산물인 시안화수소산(HCN)은 1802년 Scrade에 의해 bitter almond와 복숭아 잎에서 최초로 분리되었으며(5), 식물에 의한 시안화수소산의 방출은 bitter almond로부터

아미그달린을 규명한 Robiquet 및 Charlard에 의해 최초로 언급된 바 있다(5). 이 후 여러 학자에 의해 아미그달린이 β-glucosidase에 의하여 가수분해되어 prunasin과 mandelonitrile을 형성하고 다시 분해되어 당과 벤즈알데히드, 시안화수소산을 생성한다는 것이 밝혀졌으며(6), 기원식물의 품종 및 재배조건에 따라 그 함량의 차이가 크게 나타났다(7,8). 시안화수소산은 무색의 휘발성 액체로 특유한 냄새가 있으며, 인체 및 동물에 독성이 강하여 급성 중독과 만성 Konzo와 같은 CNS syndrome을 일으킨다고 알려져 있다(9).

한편, 시안배당체의 정량/정성 분석을 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 시안화수소와 같은 시안화합물의 의학적 중요성 때문에 대부분의 결과들은 시안배당체의 함량 보다는 시안화합물의 양으로 발표되고 있다(5). 건강기능식품공전에서는 시안화합물 분석법으로 피크린산지법을 적용하고 있으며 이 방법은 밀진된 플라스크 내에서 시료의 시안화합물이 휘발되면 피크린산지의 색이 밝은 적색으로 변하는 원리를 이용한 방법으로 시각적 판단에 의해 정성분석이 가능하다. 또한, 이전의 연구에서 Bradbury 등은 cassava를 이용한 제품에서 총 시안화합물의 함량을 β-glucosidase를 이용하여 피크린산지를 발색시킨 후 분광광도계를 이용하여 수치화함으로써 정량분석이 가능한 분석법을 보고하였다(10-14). 그러나, 효소를 이용한 피크린산지법은 cassava를 이용한 제품에 국한되어 있었으며, 매실에 대한 연구는 거의 전무하였다. 이밖에 시안화합물 분석법으로는 HPLC를 이용한 아미그달린과 시안화수소 분석법(15,16), IC를 이용한 시안화수소 분석법 등이 알려져 있다(17,18).

따라서, 본 연구에서는 매실추출제품의 시안화합물 분석에 있어 기존의 건강기능식품공전 시험법을 검토하고, β-glucosidase를

*Corresponding author: Hwee-Jae Lee, Imported Food Analysis Division, Busan Regional Korea Food & Drug Administration, Busan 608-829, Korea
Tel: 82-51-610-6203
Fax: 82-51-610-6199
E-mail: hweejae29@korea.kr
Received October 1, 2009; revised December 22, 2009; accepted January 19, 2010

Table 1. HPLC conditions for determination of cyanide and amygdalin

Parameters	Operation conditions		
	Cyanide/IC	Cyanide/HPLC	Amygdalin/HPLC
Instrument	Metrohm IC	HPLC (Shiseido SI-2)	HPLC (HP 1100)
Column	Capcellpak C ₁₈ Metrosep A supp1	GL science ODS C ₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)	Capcellpak C ₁₈ MG II (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	10% acetone	A: 30% methanol, B: 0.05 M HCl C: 0.002 M OPA, D: 0.002 M glycine	A: D. W., B: methanol
Flow rate	1.0 mL/min	A: 0.4 mL/min, B: 0.2 mL/min C: 0.5 mL/min, D: 0.3 mL/min	0.5 mL/min
Detector	Voltammetry detector	Fluorescence detector (Ex.: 334 nm, Em.: 386 nm)	PDA 214 nm
Temperature	Room temperature	40°C	40°C
Injection volume	250 μL	10 μL	10 μL

이용한 효소-피크린산지법과 HPLC와 IC를 이용한 시안화수소 및 아미그달린 분석법을 매실추출제품에 적용하여 비교함으로써 효과적 분석법을 제안하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

부산광역시 대형마트와 백화점에 유통 중인 건강기능식품 중 매실추출제품 3종을 구입하여 사용하였다. 시료는 제품 내 상태를 균일하게 유지하기 위하여 분쇄 혹은 혼합 등의 균질화 과정을 거친 후 전처리 과정에 적용하였다.

시약 및 표준물질

아미그달린 표준품 및 β-glucosidase(from almonds, 5KU)는 Sigma(St Louis, MO, USA), KCN은 Fluka사(USA)에서 구입하였다. 추출 및 분석에 사용되는 acetonitrile, methanol, acetone은 HPLC용으로 Merck Co.(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. Sodium hydroxide, sodium borate, glycine, O-phthaldehyde 등의 분석에서 사용된 모든 시약 및 용매는 특급 또는 그 이상의 수준으로 사용하였다.

피크린산지(紙)법

건강기능식품공전 시험법에 준해, 검체 20 g을 200 mL 삼각플라스크에 취하여 구연산 완충액 50 mL를 가한 후, 피크린산지를 매달은 코르크마개로 밀전하여 25-35°C에서 때때로 흔들어 혼합시키면서 3시간 방치하였다. 이후 주석산 2 g을 첨가하고 위의 코르크 마개를 즉시 밀전하고, 50-60°C에서 혼합하여 1시간 방치 후 피크린산지의 변색을 확인하였다.

효소-피크린산지법

시안화칼륨(1000 μg/mL CN⁻) 표준품을 인산완충액(pH 7.0)을 이용하여, 0, 2, 10, 20, 50 μg/mL의 표준용액을 제조하였다. 인산완충액 제조는 0.1 M potassium diphosphate(KH₂PO₄, M.W. 130.90)와 0.1 M dipotassium phosphate(K₂HPO₄, M.W. 174.18)를 섞어 pH 7.0으로 맞추어 수행하였다. 시료는 잘게 분쇄하여 10 g을 50 mL 부피플라스크에 넣고 인산완충액 35 mL로 녹인 후, pH 측정기를 이용하여 pH 7.0이 되도록 1 N NaOH로 보정하고 인산완충액으로 정용하여 시료용액으로 하였다. β-glucosidase 0.1 g을 정밀히 달아 10 mL 메스플라스크에 넣어 인산완충액으로 정

Table 2. Gradient condition of HPLC for amygdalin

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0	100	0
5	87	13
12	83	17
15	83	17
15.01	0	100
25	0	100
25.01	100	0
35	100	0

용하여 효소용액을 제조하였다. 6개의 시험관에 위의 표준용액 및 시료용액을 각각 500 μL를 첨가하고 각 시험관에 효소용액 50 μL를 추가로 첨가한 즉시 피크린산지를 매달고 밀봉하였다. 45°C에서 3시간 동안 효소반응을 시킨 후 피크린산지의 발색을 확인하였다. 반응 종료 즉시 피크린산지를 튜브에서 꺼내어 3 mL 증류수가 담긴 튜브로 옮겨 30분간 용출시킨 후 증류수를 blank로 하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 결과분석을 하였다.

아미그달린의 분리 및 HPLC 분석

아미그달린 표준품을 1000 μg/mL 농도가 되도록 증류수로 제조하여 표준원액으로 한 후 200 ng/mL로 희석하여 표준용액으로 하였다. 시료로부터 아미그달린의 분리는 대한약전의 방법을 이용하였다(17). 간단히 전처리법을 요약하면 다음과 같다. 충분히 균질화된 시료 1.0 g에 메탄올 100 mL를 넣고 1시간 추출 후 여과하였다. 잔류물을 메탄올 100 mL를 넣어 같은 방법으로 추출 여과하였다. 여액을 모두 합하여 이를 감압 농축하고 용매를 제거한 후, 잔류물을 증류수 50 mL에 용해하였다. 분액깔대기에 hexan 50 mL와 함께 넣어 흔들어 hexan층을 버렸고, 다시 에테르 50 mL를 첨가한 후 에테르층을 버렸다. 이어서 수용액층만을 여과하여 정확히 100 mL로 정용하여 시험용액으로 하였다. HPLC를 이용한 기기분석조건은 Table 1, 2와 같다. 또한, 정성분석을 위한 LC-MS/MS 조건은 Table 3에 나타났다.

시안화합물의 분리 및 IC/HPLC 분석

시안화칼륨(1000 μg/mL CN⁻) 표준품을 0.1 μg/mL의 농도로 증류수로 희석하여 표준원액으로 하였다. 표준원액을 희석하여 표

Table 3. LC-MS/MS conditions for determination of amygdalin

Instrument	Parameter	Condition	
Liquid chromatography (Waters, ACQUITY UPLC)	Column	ACQUITY UPLC TM BEH C ₁₈ (Waters, 2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)	
	Mobile phase	Solvent A: 0.1% Formic acid in distilled water Solvent B: 0.1% Formic acid in methanol	
	Flow rate	0.3 mL/min	
	Injection volume	5 μL	
	MS/MS (Waters, Micromass Quattro Premier XE)	Ionization mode	ESI+
		Capillary (kV)	4.0
Source temp. (°C)		150	
Desolvation		350	
Corn voltage (v)		30	
Precursor ion (m/z)		480	
	Monitor ion (m/z)	480 (precursor) 374, 347 (product)	

준용액이 각각 0.0125, 0.025, 0.050, 0.1 및 0.2 μg/mL가 되도록 조제하였다. 시료는 잘게 분쇄한 후 약 20 g을 정확히 측정하여 증류플라스크에 넣고 증류수 150 mL를 가하여 수증기 증류를 하여 유액 500 mL를 받았다. 이때 수기는 1% NaOH 25 mL를 가해 냉각기 끝이 잠기도록 하였다. 최종부피가 500 mL가 되도록 증류한 후, 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하여 HPLC/fluorescence detector와 IC를 이용하여 분석하였다. 기기분석조건은 Table 1과 같다.

분석법의 유효성 검증

기기를 이용한 분석법인 경우 ICH Guide Line Q2B에서 제시하는 방법을 근거로 하여 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 검출한계(Limit of detection, LOD, S/N=3) 및 정량한계(Limit of quantitation, LOQ, S/N=10) 등으로 검증하였다(19). 아미그달린 분석법 검증 시 회수율은 목적농도(10 μg/mL)를 100%로 하여 80, 100, 120%의 표준품을 시료에 첨가하여 3회 반복 실험의 평균치로 계산하였다. 또한, 시안화합물의 경우 역시 목적농도(0.05 μg/mL CN⁻)로 정하여 아미그달린과 같은 방법으로 회수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

피크린산지법

매실추출제품 중 유해물질인 시안화합물의 효과적인 분석을 위해 먼저 건강기능식품공전의 피크린산지법을 검토하였다. 구입한 3종류의 제품 분석결과, 피크린산지의 변색이 일어나지 않았다. 이러한 결과는 제품 내 시안화합물의 부재에 의한 것인지 혹은 시험법 자체의 검출한계가 높아 시안화합물의 감지가 어려워 변색이 되지 않은 것인지 하는 의문을 생기게 하였다. 따라서, 매실추출제품에 존재할 것으로 예상되는 시안배당체인 아미그달린



Fig. 1. Results of picrate method on the code of health/functional foods. 1; Sample A, 2; Sample A+0.01 mg KCN, 3; Sample A+0.1 mg KCN, 4; Sample A+250 mg amygdalin and 5; Sample A+250 mg amygdalin+0.01 mg KCN.

과 유리 형태의 CN⁻를 제공할 수 있는 시안화칼륨을 시료에 첨가하여 피크린산지법으로 분석하였다. 그 결과, 피크린산지의 변색이 일어나지 않은 시료에 시안화칼륨 0.01 mg과 0.1 mg을 첨가하였을 때, 농도 의존적으로 피크린산지의 변색이 일어났으며(Fig. 1), 배당체 형태의 아미그달린 250 mg을 첨가한 경우 피크린산지는 변색되지 않았다(Fig. 1). 또한, 시료, 아미그달린 250 mg 및 시안화칼륨 0.01 mg을 첨가한 결과 피크린산지가 적색으로 변색되었다(Fig. 1). 이러한 결과들로 미루어 볼 때, 피크린산지법은 유리 시안화합물은 검출하지만, 배당체 형태인 시안화합물 자체는 감지하기 어렵다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 제품 내에 존재하는 유리 시안화합물 및 시안배당체의 정확한 검출을 위해서 시험법의 개선이 필요한 것으로 판단되었다.

효소-피크린산지법

피크린산지법의 개선을 위해 문헌 조사한 결과, 이전의 연구에서 β-glucosidase를 이용한 피크린산지법을 통하여 cassava roots와 flour와 같은 제품 중 총 시안화합물 정량분석법을 정립하였

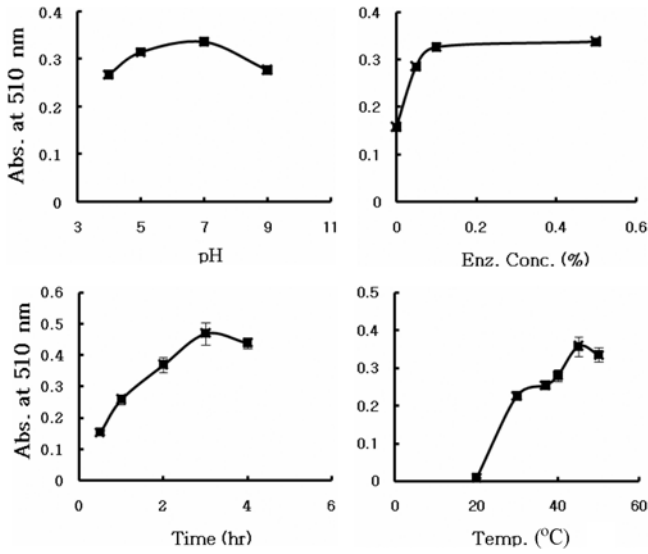


Fig. 2. The optimum condition of enzyme reaction on enzyme-picrate method.

음을 알 수 있었다(10-14). 따라서, 본 연구에서는 이전 보고들을 토대로 하여 β-glucosidase를 매실추출제품에 적용하였다. 먼저, β-glucosidase를 이용하기 위하여 효소활성을 최대로 나타낼 수 있는 최적조건을 찾았다. 반응조건은 pH, 효소농도, 시간 및 온도에 따라 발색 정도를 510 nm에서 흡광도를 측정하여 최대 흡광도를 나타내는 지점에서 정하였다(Fig. 2). 그 결과, pH 7에서 최종 반응액의 0.1%에 해당하는 효소량을 첨가한 후 45°C, 3시간 반응시 가장 높은 흡광도를 나타내었다. 또한, 매실추출제품을 시료로 하여 분석할 경우 시료에 함유되어 있는 유기산으로 인해 시험용액의 pH가 산성화되어 효소반응이 나타나지 않음을 알 수

있었고, 이를 보완하기 위해서 시료 분석시 시험용액의 pH 보정이 반드시 필요하였다. 한편, 표준품으로 사용한 KCN을 최종농도가 각각 0, 2, 10, 20, 50 µg/mL이 되도록 첨가하여 효소-피크린산지법을 수행한 결과, 농도-의존적 발색을 보였으며(Fig. 3a), 검량선 작성시 상관계수(R²)가 0.999 이상으로 나타났다(Fig. 3b). 또한, 아미그달린을 농도별로 첨가한 결과 역시 농도-의존적 발색을 보였다. 따라서, 효소-피크린산지법은 피크린산지의 변색 유무를 관찰함으로써 시료 내 존재하는 유리 시안화합물과 배당체로부터 유래되는 시안화합물을 포함한 총 시안화합물의 정성분석과 변색된 피크린산지를 증류수에 용출시켜 흡광도를 측정함으로써 정량분석이 가능함을 알 수 있었다.

크로마토그램을 이용한 시안화합물 분석

시료의 시안화합물을 분석하는 또 다른 방법으로 유리되어 있는 시안화합물을 IC 혹은 HPLC를 이용하여 정량하는 방법과 배당체 형태로 존재하는 아미그달린을 HPLC를 통해 정량하는 방법을 병행하는 것이 보고된 바 있다(17). 따라서, 본 연구에서는 이전의 연구를 토대로 매실추출제품에 시안화합물을 분석하기 위하여 IC와 HPLC를 이용한 분석법을 적용하고 검토하였다.

먼저 IC를 이용한 유리 시안화합물의 분석법을 검토하였다. 표준품을 각각 12.5, 25, 50, 100 및 200 µg/L의 농도로 제조하여 실험한 결과, 검량선의 상관계수(R²)는 0.998을 나타냈으며, 검출한계는 7 ng/mL, 정량한계는 12.5 ng/mL, 회수율은 71-92%를 보였다. 또한 반복실험간 정밀성을 확인하기 위하여, 표준용액을 6회 제조하여 측정한 결과 4.22 RSD(%)를 보였으며, 일자별로 3회 반복 실험한 결과 RSD(%)는 5.12로 나타났다(Table 4).

HPLC를 이용한 유리 시안화합물분석법은 *O*-phthalaldehyde와 CN⁻에 NH⁴⁺ 이온을 첨가하여 1-cyanoisindol이라는 OPA 유도체를 만든 후 형광검출기를 이용한 방법으로(20), 유도체를 만들기 위하여 0.002 M OPA와 0.002 M glycine을 이용하였다. 이동상으로

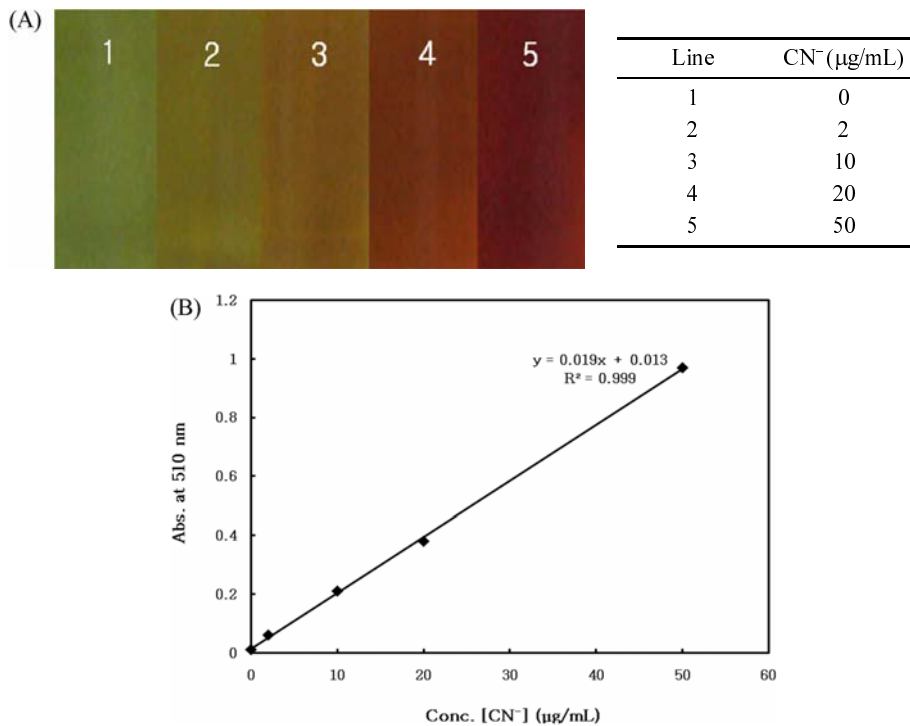


Fig. 3. Typical colored solution (a) and standard curves of absorbance at 510 nm vs cyanogens concentration (b) on enzyme-picrate method.

Table 4. Validation for analysis methods of cyanide and amygdalin

Characteristics	Cyanide		Amygdalin
	IC	HPLC/FLD(OPA)	
Linearity	R ² > 0.998	R ² > 0.999	R ² > 0.999
Limit of detection/quantitation	7 ng/mL, 12.5 ng/mL	20 ng/mL, 60 ng/mL	0.1 µg/mL, 1 µg/mL
Precision (n≥6) ^a	Repeatability (RSD (%))	4.22	3.10
	Inter-mediate precision (RSD (%))	5.12	3.09
Accuracy (% recovery, n=3)	71-92	94-100	107-108
System suitability (Area/RT, % RSD) ^a	5.15/0.43	3.77/0.04	0.20/0.36

^aEach result was the average of experiments on 0.05 µg/mL CN⁻ or 10 µg/mL amygdalin.

Table 5. Comparison of picrate, enzyme-picrate and IC/HPLC method in Maesil (*Prunus mume*) extracts

Method	Necessary time (hr)	Total cyanide		Qualitative analysis	Quantitative analysis	Sample (n=3)		
		Free cyanide	Cyanogenic glucosides			A	B	C
Picrate	5	+ ¹⁾	- ²⁾	P ³⁾	IP ⁴⁾	-	-	-
Enzyme-picrate	6	+	+	P	P	-	-	+
Cyanide	IC	+	-	P	P	-	-	-
	HPLC	+	-	P	P	-	-	-
Amygdalin	HPLC	-	+	P	P	-	-	-

¹⁾+: detected, ²⁾-: not detected, ³⁾P: possible and ⁴⁾IP: impossible.

30% 메탄올, 유도체화를 돕기 위하여 0.05 N HCl을 사용하였다. 최적의 분석조건을 위하여, 크로마토그램의 peak intensity가 가장 높아지도록 유도체 시약과 이동상의 유속을 조절하였다. 그 결과, 이동상은 0.4 mL/min, OPA는 0.5 mL/min, glycine은 0.3 mL/min 및 HCl은 0.2 mL/min에서 peak intensity가 높게 나타났다 (Table 1). 또한, post column 유도체 반응기의 온도별 peak intensity를 조사한 결과 123°C에서 가장 높게 나타났으며, 5 m 유도체관을 이용하였다. 이상의 분석조건에서, 각각 12.5, 25, 50, 100 및 200 µg/L의 농도로 표준품을 제조하여 분석한 결과 검량선의 R²는 0.999의 높은 값을 보였으며, 검출한계는 20 ng/mL, 정량한계는 60 ng/mL, 회수율은 94-100%를 보였다. 반복실험간 정밀성을 확인하기 위하여 표준용액을 6회 제조하여 측정된 결과, 3.10 RSD(%)를 보였으며 일자별로 3회 반복 실험한 결과 RSD(%)는 3.09로 나타났다 (Table 4).

한편, HPLC를 이용한 아미그달린 분석법은 5, 10, 25, 50 및 100 mg/L의 농도로 표준품을 제조하여 실험한 결과, 검량선의 R²는 0.999 이상의 높은 값을 보였으며, 검출한계는 0.1 µg/mL, 정량한계는 1 µg/mL, 회수율은 94-100%를 보였다. 반복실험간 정밀성을 확인하기 위하여, 표준용액을 6회 제조하여 측정된 결과 0.16 RSD(%)를 보였으며, 일자별로 3회 반복 실험한 결과 RSD(%)는 0.14로 나타났다 (Table 4).

성분의 확인

정성분석을 위하여 LC-MS/MS (+) mode로 아미그달린을 분석한 결과 (Table 3), m/z 480([M+Na]⁺), 374([M+Na]⁺), 347([M+Na]⁺)의 이온이 검출되었고, 이는 이전의 Ge 등(21)의 연구결과와 부합되었다.

시험법 비교

본 연구에서 매실추출제품 중 시안화합물의 효과적 분석을 위

하여 이상의 3가지 시험법을 검토하였다 (Table 5). 각 시험법에 대한 소요시간은 시약 및 용액 제조에 1시간, 기기 안정화 및 분석에 4시간을 산정하여 비교하였다. 그 결과, 피크린산지법은 시간이 가장 적게 소요 되었으나 (약 5시간), 배당체 형태로 존재하는 시안화합물은 검출하지 못하였다. 또한, 시각적 판단에 의한 정성분석은 가능하였으나, 정량분석이 불가능한 단점이 있었다. IC/HPLC를 이용한 기기분석의 경우, 유리 형태와 배당체 형태의 시안화합물 모두 검출이 가능하였고, 정량 및 정성분석이 가능하였다. 기기분석법의 경우, 표준용액의 검량선 상관계수(R²)는 모두 0.99 이상을 나타냈으며, 시안 화합물의 검출한계는 IC를 이용한 분석법에서 낮게 나타났다. 반면, 6회 반복 실험한 반복성 (Repeatability)과 일자별 3회 반복 실험한 정밀성 (Inter-mediate precision)의 RSD(%)는 IC 분석법보다 HPLC 분석법에서 낮게 나타났다. 이러한 결과들은 시안화합물을 분석함에 있어 IC 및 HPLC를 이용하여 상호보완적으로 수행하는 것이 효과적임을 나타낸다. 그러나, 제품 중 유리 형태의 시안화합물과 시안배당체인 아미그달린을 분석하기 위하여 각각의 전처리 과정이 필요했고, 이로 인해 소요시간이 상대적으로 많이 필요한 단점이 있었다 (약 17시간).

반면, 효소-피크린산지법의 경우 기존의 피크린산지법과 비교하여 1시간 정도의 시간이 더 필요했으나 (약 6시간), 제품에 존재하는 유리 시안화합물과 시안배당체 유래의 시안화합물의 정성분석이 가능한 장점이 있었다. 뿐만 아니라, 흡광도를 이용한 정량분석도 가능하였고, 표준용액의 검량선 상관계수(R²)는 기기 분석법과 유사한 0.999 이상을 나타내어 유의성 있는 직선성을 보였다. 이들 분석법을 실제 시료분석에 적용한 결과, 본 연구에서 구입한 3종류의 매실추출제품의 경우, 대부분의 시험법에서 시안화합물이 검출되지 않았으나, C제품의 경우 효소-피크린산지법에서 발색되었다. 이러한 결과는 시료의 전처리 과정의 간소화 및 효소반응의 특성인 기질-특이성에 의해 검출한계가 낮아져 나

타난 것으로 사료된다.

따라서, 매실추출제품 중 시안화합물의 분석법으로 제품 내 유리되어 있는 시안화합물과 시안배당체로부터 유래된 시안화합물을 단순한 전처리 방법으로 단시간에 검출 가능한 효소-피크린산지법이 가장 효과적이라 판단된다.

그러나, 피크린산이 크레이티닌과 적색 복합체를 형성한다는 Jaffe 반응이 알려져 있다. 이는 제품 내 존재하는 이온의 간섭현상으로 발색되는 경우가 있을 가능성을 시사하는 것으로, 부적합 제품의 경우 HPLC 및 IC를 이용한 기기분석을 이용한 확인시험이 병행되어야 할 것이다. 이후, 다양한 매실추출제품 제형에 대한 모니터링을 포함한 부가 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

건강기능식품공전에서 유해물질로 분류되어 관리되고 있는 매실추출제품 중 시안화합물의 효과적인 분석을 위하여 피크린산지법, 효소-피크린산지법, IC 및 HPLC를 이용한 기기분석법을 검증하고 비교하였다. 먼저, 피크린산지법은 가장 분석소요시간이 짧았으며, 0.01 mg/200 mL CN에서 피크린산지의 변색이 관찰되었으나, 배당체 형태의 아미그달린으로부터 유래되는 시안화합물을 검출하는 것에 한계가 있었다. 반면, β -glucosidase를 이용한 효소-피크린산지법은 아미그달린으로부터 유래되는 시안화합물을 포함한 총 시안화합물의 정성분석 및 분광광도계를 이용한 정량분석이 가능하였다. 마지막으로, IC 및 HPLC를 이용한 시안화합물 분석법은 유리되어 있는 시안화합물과 아미그달린을 분석하기 위해 각각 서로 다른 전처리 과정을 거쳐야 하며, 분석시간 또한 가장 많이 소요되었다. 이러한 결과들을 미루어 볼 때, 매실추출제품에 존재하는 시안화합물 분석법으로는 효소-피크린산지법이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

문 헌

- Hwang JY, Ham JW, Nam SH. The antioxidant activity of maesil (*Prunus mume*). Korean J. Food Sci. Technol. 36: 461-464 (2004)
- Jung DH, You JY. Fermented Foods of Vegetables. Gangilsa, Seoul, Korea. pp. 130-134 (1997)
- Kim JH, Xiao PG. Traditional Drugs of the East. Younglimsa, Jeonju, Korea. pp. 88-90 (1989)
- Korea Food & Drug Administration. Functional material on health/functional food. Available from: <http://hfoodi.kfda.go.kr/am/menu.jsp?code1=00100040>. Accessed Aug. 10, 2009.
- Vetter J. Plant cyanogenic glycosides. Toxicon 38: 11-36 (2000)
- Kim DH. Food Chemistry. Tamgudang, Seoul, Korea. pp. 45-53 (1995)
- Abd EI-Aal MH, Hamza MA, Rahma EH. *In vitro* digestibility, physicochemical and functional properties of apricot kernel proteins. Food Chem. 19: 197-211 (1986)
- Tuncel G, Nout MJR, Brimer L, Goktan D. Toxicological, nutritional and microbiological evaluation of tempe fermentation with *Rhizopus oligosporus* of bitter and sweet apricot seeds. Int. J. Food Microbiol. 11: 337-344 (1990)
- Tylleskar T, Rosling H, Banea M, Bikangi N, Cooke RD, Poulter NH. Cassava cyanogens and konzo, an upper motoneuron disease found found in Africa. Lancet 339: 208-211 (1992)
- Bradbury MG, Egan SV, Bradbury JH. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. J. Sci. Food Agr. 79: 593-601 (1999)
- Bradbury JH. Development of a sensitive picrate method to determine total cyanide and acetone cyanohydrins contents of gari from cassava. Food Chem. 113: 1329-1333 (2009)
- Haque MR, Bradbury JH. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. Food Chem. 77: 107-114 (2002)
- Drochioiu G, Arsene C, Murariu M, Oniscu C. Analysis of cyanogens with resorcinol and picrate. Food Chem. Toxicol. 46: 3540-3545 (2008)
- Egan SV, Yeoh HH, Bradbury JH. Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour. J. Sci. Food Agr. 76: 39-48 (1998)
- Sumiyoshi K, Yagi T, Nakamura H. Determination of cyanide by high-performance liquid chromatography using postcolumn derivatization with *O*-phthalaldehyde. J. Chromatogr. A 690: 77-82 (1995)
- Miralles E, Prat D, Compano R, Granados M. Assessment of different fluorimetric reaction for cyanide determination in flow systems. Analyst 122: 553-558 (1997)
- Hong JH, Lee DH, Han SB, Lee DH, Lee KB, Park JS, Chung HW, Lee SY, Park SG, Park ER, Hong KH, Han JW, Kim MC, Song IS. The establishment of analytical method, and monitoring of toxins in food materials. The Annual Report of KFDA 8: 442-452 (2004)
- Christison TT, Rohrer JS. Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. J. Chromatogr. A 1155: 31-39 (2007)
- ICH, ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology. CPMP/ICH/381/95 European Medicines Agency (1995)
- Sano A, Takezawa M, Takitani S. Fluorometric determination of cyanide with *O*-phthalaldehyde and taurine. Anal. Sci. 2: 491-492 (1986)
- Ge BY, Chen HX, Han FM, Chen T. Identification of amygdalin and its major metabolites in rat urine by LC-MS/MS. J. Chromatogr. B 857: 281-286 (2007)