

# Rocket salad (*Eruca sativa*) 중 glucosinolate 동정 및 정량

김초록<sup>1</sup> · 임영실<sup>1</sup> · 이상원<sup>2</sup> · 김선주<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 생물환경화학과, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 인삼약초가공팀

## Identification and quantification of glucosinolates in rocket salad (*Eruca sativa*)

Cho-Rok Kim<sup>1</sup>, Young-Sil Lim<sup>1</sup>, Sang-Won Lee<sup>2</sup>, Sun-Ju Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Bio-Environment Chemistry, Chungnam National University, 99 Daehak-Ro, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Herbal Crop Research Team, International Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do 369-873, Korea

Received on 14 March 2011, revised on 4 April 2011, accepted on 20 June 2011

**Abstract** : Glucosinolate (GSL) contents were investigated (i) at 1~7 days after sowing (DAS) in seed sprouts and (ii) at 3~7 weeks after sowing for the time-course. Moreover, (iii) They were compared with five different cultivars of rocket salad (*Eruca sativa*). Seventeen GSLs were separated by HPLC analysis, and 10 GSLs among them were identified as glucoraphanin, sinigrin, glucoalyssin, diglucothiobeinin, glucobrassicinapin, glucoerucin, glucobrassicin, dimeric, 4-mercaptobutyl GSL, 4-methoxy glucobrassicin, gluconasturtin by using LC-APCI-MS analysis, but 7 compounds were not identified. (i) The total GSL content in seed sprouts initially increased up to 3 DAS and then decreased according to their seedling growth. In particular, glucoraphanin known as a strong anti-cancer reagent was found the highest level (5.05  $\mu\text{mol/g}$  dry wt.) at 3 DAS. The most abundant GSL was glucoerucin ranged from 26.0~49.6  $\mu\text{mol/g}$  dry wt. (ii) In the time-course, the total GSL contents increased dramatically from 3-week (5.91  $\mu\text{mol/g}$  dry wt.) to 7-week after sowing (32.2  $\mu\text{mol/g}$  dry wt.). The major GSLs were glucoraphanin, glucoerucin and 4-methoxy glucobrassicin. (iii) By comparing GSL contents with five different cultivars, the total GSL contents increased from 4-week to 6-week after sowing, regardless of cultivar. In 4-week-old, the order with the total GSL content was “Rucola” > “Rocket Herbs”  $\geq$  “Odyssey” > “Takii” > “Herb”, but in 6-week-old it is changed as “Takii” > “Herb” > “Odyssey” > “Rucola” > “Rocket Herbs” even there was almost no significantly difference between them.

**Key words** : *Eruca sativa*, Glucosinolate, HPLC analysis, LC-MS, Rocket salad

## I. 서론

글루코시놀레이트(glucosinolate, GSL)는 황과 질소를 함유하고 있는 2차 대사산물로 결사슬 R기(Fig. 1, (a))에 따라 120종류 이상이 알려져 있으며(Fahey 등, 2001), 주로 로켓샐러드(rocket salad), 브로콜리, 방울다다기양배추(brussels sprouts), 양배추, 콜리플라워, 케일(kale) 과 같은 배추과(Brassicaceae) 채소에서 발견된다. GSL은 7 종류의 아미노산(alanine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan)에 의해 생합성 되

고(Halkier와 Du, 1997), 이들은 다시 전구체인 아미노산의 종류에 따라 methionine에서 유래한 aliphatic GSL, phenylalanine에서 유래한 aromatic GSL, tryptophan에서 유래한 indolylic GSL 계열로 분류된다(Fahey 등, 2001).

GSL와 thioglucosidases(myrosinases)는 식물체내 gluco-sinolate-myrosinase system의 주요 구성성분으로 초식동물이나 병원체에 대하여 효과적인 방어기작의 작용을 한다(Bones과 Rossiter, 1996). Glucosinolate-myrosinase system은 서로 다른 구획으로 나누어져 있으며, GSL은 식물세포의 액포에, myrosinase는 대부분의 식물 조직내에 흩어져 있는 ‘myrosin’ 세포안에 존재한다(Halkier과 Du, 1997; Wittstock과 Halkier, 2002). GSL자체는 비독성이

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6738

E-mail address: kimsunju@cnu.ac.kr

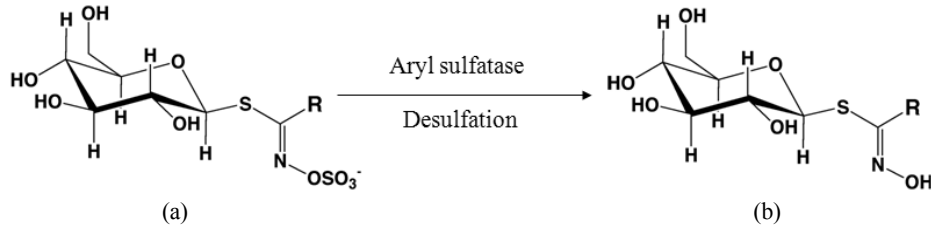


Fig. 1. Enzymatic desulfation of glucosinolate. (a), glucosinolate; (b), desulfated natural glucosinolate (Kim et al., 2004).

지만, 병원균이나 곤충에 의한 외부 침입에 의하여 식물체 조직이 상처를 받으면 이 가수분해 효소인 myrosinase가 GSL과 직접 접촉함으로써 isothiocyanate(생리활성 물질), nitrile(독성화합물), thiocyanate와 glucose로 분해된다. 이들 분해산물 중에서 isothiocyanates는 강한 향균, 향미, 살충작용과 같이 식물체의 생체방어반응에 관여하고, 인간에게는 간암, 폐암, 위암과 같은 암 예방에 효과가 있다(Zhang과 Talalay, 1994; Talalay과 Zhang, 1996; Li 등, 2010). 특히 sulforaphane(the isothiocyanate of glucoraphanin)과 indole-3-carbinol(the isothiocyanate of glucobrassicin)은 항암예방효과가 뛰어나다(Zhang 등, 1992). 또한 sulforaphane은 종양의 크기와 발생을 감소시키고, 종양의 발생을 지연시켜준다(Zhang과 Talalay, 1994; Fahey 등, 1997). 이러한 항암효과에 관한 연구는 1990년대 후반 이후 미국을 중심으로 많은 연구 결과가 많이 보고되고 있으며, 기능성 식품으로서 배추과 채소(특히 브로콜리)의 가치가 재평가 되고 있다(Fahey 등, 1997).

Rocket salad(*Eruca sativa* Mill.)는 지중해가 원산지로서 이탈리아에서는 “rucola” 독일에서는 “ackerrauke”, 일본에서는 “kibanasuzushiro”로 알려진 배추과(Brassicaceae) 채소이다. Rocket salad 종(species)에는 *Eruca sativa* L.(rucola or rocket), *Diplotaxis eruroides* L.(wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* L.(wild or sand rocket), *Bunias orientalis* L.(Turkish rocket) 등 350여종이 있으며, 주로 재배하여 엽채류로 사용되는 것은 *Eruca sativa* L.(rucola or rocket) 이다(Bennett 등, 2006). 특히 rocket salad는 잎의 강한 향과 매운맛이 요리의 입맛을 돋아주므로 유럽에서는 샐러드와 소스에 많이 사용되고 있으며, 이탈리아 요리에서는 스파게티, 파스타, 피자 등에 다양한 식재료로 사용되고 있다. 또한 일본에서는 생육기간이 짧고 (40~60 일) 맵고 강한 참깨와 유사한 향미 때문에 rocket salad의 경제적 가치가 커지고 있으며, 인도와 파키스탄에서는 rocket salad의 씨앗은 오일(oil)의 유용한 자원으로 사용

되어져 왔다(Jirovetz 등, 2002; Yadava 등, 1998). Rocket salad의 잎은 줄기를 따라 엷갈려 나오며 모양은 타원형으로 길고 위로 올라갈수록 좁아진다. 꽃은 작으며 흰색 혹은 옅은 밀짚색을 띠는 4장의 꽃잎으로 이루어져 있고 솟아오른 줄기 위에서 핀다. 잎에서는 고추냉이처럼 맵고 강한 독특한 향이 나는데 이것은 GSL과 그 분해산물(isothiocyanates)과 관련이 깊고, 특히 매운 맛은 4-mercaptobutyl GSL과 관련이 깊다(Bennett 등, 2002).

지금까지 연구한 결과에 의하면 rocket salad에는 glucoraphanin, diglucothiobeinin, glucoerucin, glucobrassicin, dimeric 4-mercaptobutyl-GSL, 4-methoxyglucobrassicin 등 7종류의 GSL가 주요한 성분으로 알려져 있다. 그 중에서 앞에서 분리된 diglucothiobeinin과 dimeric 4-mercaptobutyl GSL는 두 개의 glucose와 S-S결합으로 연결된 특별한 구조를 가지고 있다(Bennett 등, 2002; Kim 등, 2004). 그리고 고농도(7.5 mM 이상)의 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)에 내성이 강한 것으로 알려져 있으며, 그와 관련된 물질로 glucorucolamine(4-(cystein-S-yl)butyl-GSL)이 분리·동정되었다(Kim 등, 2007). 씨앗의 주요성분은 glucoerucin(4-methylthiobutyl-GSL)이며, 약간의 glucoraphanin(4-methylsulfinylbutyl-GSL)이 존재한다(Daxenbichle 등, 1991; Iori 등, 1999; Kim과 Ishii, 2006).

식물체의 GSL 함량은 유전적, 식물학적, 영양상태, 기후조건과 재배방법 등의 환경요인에 따라 차이가 난다(Fenwick 등, 1989). 따라서 본 연구에서는 포장에 직파한 rocket salad의 (i) 새싹채소(seed sprouts), (ii) 생육단계별 경시변화(time-course), (iii) 품종간 비교를 통하여 GSL의 정성·정량하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

HPLC-garde 아세토니트릴(CH<sub>3</sub>CN)과 methanol(MeOH)

은 J.T Baker(USA) 것을, sodium acetate( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )는 Hayashi Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan) 것을 사용하였다. Desulfo효소인 aryl sulfatase(type H-1, EC 3.1.6.1), 외부표준물질(external standard)인 sinigrin (2-propenyl GSL), 컬럼 충전물인 DEAE-Sephadex A-25는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

## 2. 새싹채소(seed sprouts) 재배

새싹채소용 “Rucola” 씨앗 1 g( $n=3$ )을 평량하여 5 ml test tube에 넣고 2시간 동안 수돗물을 흡수시킨 후, 수돗물을 흡수시킨 스펀지를 포트( $7.6 \times 7.6 \times 12.5$  cm)에 깐 다음에 씨앗을 골고루 뿌리고 incubator( $24^\circ\text{C}$ )에서 7일간 재배하였다. 파종한 다음 날부터 매일 시료(처음에는 씨앗을 포함한 식물체)를 채취하여 길이와 무게를 잴 후 알루미늄 호일에 싸서  $-70^\circ\text{C}$  냉동고에 보관하였다(Table 1). 또한 씨앗의 GSL분석을 위하여 씨앗 2 g( $n=2$ )을 평량하여  $100^\circ\text{C}$  건조기에서 3시간 동안 건조(GSL 분해효소인 myrosinase를 불활성화)시킨 다음에 분쇄하였다.

## 3. 포장 재배

“Odyssey”[(주) 사카타 종묘]를 충남대학교 농업생명과학대학 농장 포장에 직파하여 7주간(9월 18일~11월 6일) 재배하였다. 파종하기 전에 기비로 제2종 복합비료[(N: P: K = 22: 12: 12, 남해화학(주)]를 적당하게 뿌려 주었다. 분석용 시료는 파종 후 3주부터 7주까지 매주(총 5회) 채취하였다. 또한 매일 같은 시간(오후 3시 30분)에 광량(조도

과 온도를 측정하였다[평균 광량,  $370 \mu\text{mol/s/m}^2$ (20,000 lux/54); 온도,  $23^\circ\text{C}$ ].

## 4. 품종간 비교

“Odyssey”[(주) 사카타 종묘], “Rucola”(상품명: Rocket Herb)[(주) 토호크 종묘], “Takii”(상품명: Rocket) [타키이 종묘 (주)], “Herb”(상품명: 허브향신채소) [(주) 아타리아 농원], “Rocket Herbs”[운원스 종묘]의 총 5 종류 씨앗을 동일 포장에 직파하여 6주간(9월 25일~11월 6일) 재배하였다. 시비방법은 경시변화용 동일하게 기비를 주었다. 분석용 시료는 파종 후 4주와 6주 후에 2회 채취하였다.

경시변화(time-course)와 품종 간 비교를 위하여 포장에서 재배한 식물체 시료는 일정한 시간(15시30분)에 채취하였으며, 채취한 시료는 수돗물-증류수 순으로 깨끗이 씻고 물기를 제거한 다음 무게를 재고(평균 함유율 87%), 알루미늄 호일에 싸서  $-70^\circ\text{C}$  냉동고에 보관하였다.  $-70^\circ\text{C}$  냉동고에 보관했던 시료들은 동결건조기로 건조시킨 다음에 막자와 막자사발을 이용하여 고운 분말로 만든 후 분석 전까지 데시케이터에 보관하였다.

## 5. 조 glucosinolate 추출 및 desulfo-glucosinolate 변환

2.0 ml-Eppendorf tube에 분말시료(100 mg)를 평량하여 1.5 ml boiling 70%(v/v) methanol(endogenous myrosinase activity의 불활성화)를 넣고, 머무름 시간(RT, retention time)을 알기 위해 내부표준물질(internal standard)로 sinigrin 100  $\mu\text{l}$ (5 mg/50 ml)을 넣었다. 그리고

Table 1. Growth of seed sprouts (“Rucola”).

Days after sowing (day)	Height (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)
1	0.35	5.45	0.90	83.37
2	1.80	9.32	0.88	90.51
3	2.33	10.92	0.87	91.99
4	3.14	15.54	0.85	94.50
5	3.41	13.84*	0.72	94.81
6	3.84	15.20	0.74	95.15
7	4.10	16.92	0.70	95.84

\*Approximately 10% of seed sprouts were omitted because of pathogen corruption.

진동혼합(vortex) 한 다음 물증탕(70°C)에서 5분간 조 (crude)GSL를 추출하여 원심분리(12,000 g, 10 min, 4°C) 한 후에 상층액은 수거하고, 잔여물은 동일한 과정으로 3회 더 추출하여 각 상층액을 합하였다.

Mini-column 충전용 DEAE-Sephadex A-25(30 g)는 3차 증류수에 녹여 분액여두에 넣은 다음 약 1.5배(v/v)의 초순수를 넣고 거의 빠져나간 다음에 sodium acetate(102 g/1.5 L)를 넣어 H<sup>+</sup> 형태로 활성화 시켰다. 1,000 µl pipet tip 끝을 탈지면으로 막은 mini-column에 상기의 활성화된 DEAE-Sephadex A-25(40 mg dry wt.)를 넣은 후 GSL 조추출물(crude extract)을 pasteur pipette으로 로딩하였다. 또한 5 ml sinigrin(5 mg/50 ml)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 mini-column을 통과시켜 desulfo-sinigrin(분자량 279)을 만들어 외부표준물질(external standard)로 하였다. 추출물이 다 빠져나가면 mini-column 아래 부분을 파라핀 필름(paraffin film)으로 막고 aryl sulfatase 용액(115 mg/5 ml, desulfation) 75 µl을 넣고 (주의: 수평으로 로딩) 컬럼 윗부분을 파라핀 필름으로 막고 실험실 상온에서 정치(16~18시간) 하였다(Fig. 1 (b)). 다음 날 2.0 ml-Eppendorf tube에 desulfo-glucosinolate를 초순수로(0.5 ml × 4) 용출시킨 다음, 0.45 µm hydrophilic PTFE millipore filter(직경 13 mm)로 필터한 후 HPLC용 vial병에 넣고 HPLC분석 전까지 냉장/냉동 보관하였다.

## 6. HPLC 분석

GSL 분석은 Inertsil ODS-2 cartridge 가드 컬럼 E(10 × 2 mm i.d., particle size 5 µm)와 Inertsil ODS-3 column (150 × 3.0 mm i.d., particle size 3 µm)(GL Science, Tokyo, Japan)을 장착한 1200 series HPLC apparatus (Agilent Technologies, CA, USA)를 사용해서 분석하였다. 컬럼 온도는 40°C, 유량(flow rate)은 0.20 ml/min, 검출파장(detection wavelength)은 227 nm로 설정하였다. Desulfo-GSL 용액은 자동주입기를 사용하여 10.0 µl를 주입하였다. 이동상 용액은 초순수(solvent A)와 100% 아세트니트릴(solvent B)를 사용하였으며 solvent B를 18분까지는 1%에서 24%로 증가시키고 32분까지는 그 농도를 유지시키다가 32.01분까지는 24%에서 7%로 감소시킨 후 40분까지는 그 농도를 유지시켰다(modified from Kim 등, 2006). 각 GSL 성분의 정량은 외부표준물질인 sinigrin의

HPLC peak 면적(area)과 각 성분의 면적을 비교하여 그 값을 구한 다음 response factor(ISO 9167-1, 1992)(명시되지 않은 것은 1.0으로 함)를 곱하여 계산하였다.

## 7. LC-APCI-MS 분석

각 GSL 성분의 동정을 위하여 TSQ Quantum Ultra LC-APCI-MS System(Thermo Fisher Scientific, San Jose CA)를 사용하여 positive ion mode([M+H]<sup>+</sup>)로 그 분자량을 측정하였다(APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization). 사용된 컬럼은 상기의 6. HPLC 분석과 동일한 것을 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C, 유량은 0.5 ml/min으로 설정하였으며, 시료 주입량은 20.0 µl이었다. 이동상 용액은 초순수(solvent A)와 0.1% formic acid를 포함한 95% 아세트니트릴 용액(v/v, solvent B)를 사용하였다. 구배용매조성은 처음에 solvent B를 1%로 시작하여 3분까지는 그 농도를 유지시키고, 3분에서 28분까지 40%로 증가시켰다. 그리고 32분까지 3분 동안 그 농도(40%)를 유지시키고, 32.01분에서는 1%로 급격히 감소시킨 다음 40분까지 이 농도를 유지시켰다(총 40분). Scan spectra의 범위는 m/z 100-800로 설정하였고 scan time은 1.0 s이었다.

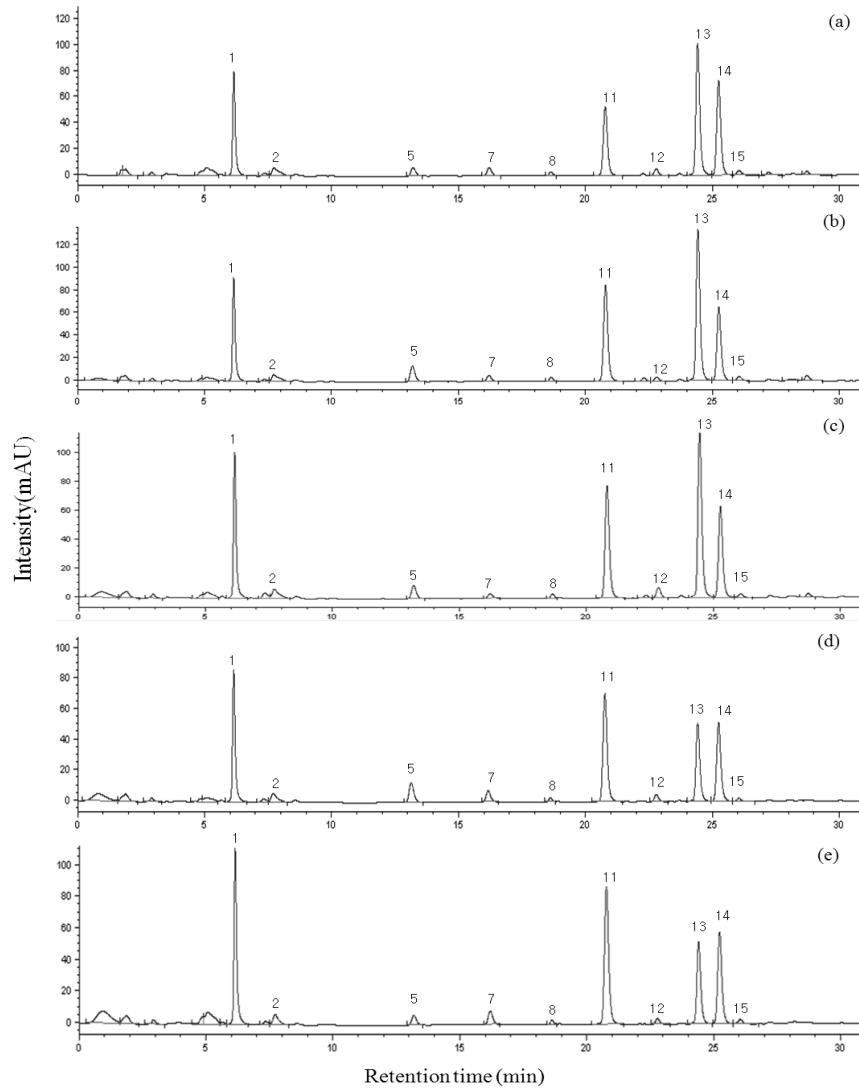
## 8. 통계분석

각각의 시료는 3반복으로 분석하였으며, 분석 결과는 Microsoft Office Excel 2007로 그 평균값과 표준편차(SD, standard deviation)를 구하였다.

# III. 결과 및 고찰

## 1. HPLC profiles

Rocket salad를 HPLC로 분석한 결과, 새싹채소에서는 15종류의 GSL가(HPLC 크로마토그램 생략), 포장에서 재배한 식물체에서는 12종류의 GSL가 검출되었다(Fig. 2). *Diplotaxis*와 *Eruca* 잎의 분석에서 21종류의 GSL를 동정하였지만(D'Antuono 등, 2008), rocket salad(*Eruca sativa*)에서는 총 17종류가 분리되어 그 중에서 LC-APCI-MS분석과 Broccoli sprouts(LC-APCI-MS분석 포함)의 HPLC 머무름 시간 비교를 통하여 10종류의 GSL를 동정하였으



**Fig. 2.** HPLC chromatograms of desulfo-glucosinolate (GSL) isolated from rocket salad cultivated in the field: (a), “Odyssey”; (b), “Rucola”; (c), “Takii”; (d), “Herb”; (e), “Rocket herb”. Peak numbers refer to the GSL listed in Table 2. 1, glucoraphanin; 2, sinigrin, used as an internal standard; 5, diglucothiobetin; 7, glucobrassicinapin; 8, unknown; 11, glucoerucin; 12, glucobrassicin; 13, dimeric 4-mercaptobutyl GSL; 14, 4-methoxy glucobrassicin; 15, gluconasturtin. Peak no. 4, 6, 8, 9, 10, 16 and 17 were unknown with very low levels.

며, 나머지 7종류는 적은 양이면서 이온화 신호가 낮아 MS분석에 의한 분자량 측정이 어려워 동정할 수 없었다(Table 2).

## 2. 식물체내 GSL 정량

### 가. 새싹채소(seed sprouts)

씨앗에서 10종류의 GSL는 분리·동정되었는데, 주성분은 glucoerucin으로 총 GSL함량의 93-94%를 차지하였으며, 다음으로 glucoraphanin(3.7-4.4%)이었다. 그렇지만 두 가지 주성분의 총 GSL함량에 대한 비율은 새싹채소용 씨앗이 재배된 지역 또는 재배종의 차이점과 밀접한 관련

이 있는 것으로 보이므로 특정 성분을 위한 재배시에는 씨앗의 선택이 중요하다고 여겨진다(Bennett 등, 2007). Kim과 Ishii(2006)는 씨앗에서 상기의 두 성분만을 보고하였고, 또한 Cataldi 등(2007)은 rocket salad 씨앗의 ESI-MS분석( $[M-H]^-$ )으로, Bennett 등(2007)은 rocket salad와 wild rocket의 새싹채소에서 LC-APCI-MS를 통하여 상기 두 GSL 외에 glucobrassicin를 주성분으로 동정하였다. 그렇지만 본 연구에서는 LC-APCI-MS분석( $[M+H]^+$ )의 결과해석과 브로콜리 새싹채소의 HPLC 크로마토그램 및 MS 스펙트럼과의 비교분석을 통하여 소량이었지만 No. 2, 3, 7, 15(Table 2 참조) 등 4종류의 GSL를 추가적으로

**Table 2.** Glucosinolates (GSLs) identified in leaves of rocket salad (*Eruca sativa*).

No. <sup>1)</sup>	RT (min) <sup>2)</sup>	Trivial name (semisystematic name)	Structure of side chain (R)-groups <sup>3)</sup>	Molecular weight <sup>4)</sup>	Response factor <sup>5)</sup>
1	6.14	Glucoraphanin (4-methylsulfinylbutyl GSL)	CH <sub>3</sub> -SO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	357	1.07
2	7.72	Sinigrin(2-propenylGSL) <sup>6)</sup>	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub> -	279	1.00
3	8.53	Gucoalyssin (5-methylsulfinylpentyl GSL)	CH <sub>3</sub> -SO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	371	1.07
4	12.92	Unknown <sup>7)</sup>		-	1.00*
5	13.20	Diglucothiobainin (4-(β-D-glucopyranosyldisulfanyl)butyl GSL)	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> -S-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	521	1.00*
6	14.81	Unknown		-	1.00*
7	16.19	Glucobrassicinapin (4-pentenyl GSL)	CH <sub>2</sub> =CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	307	1.15
8	18.65	Unknown		-	1.00*
9	19.03	Unknown		-	1.00*
10	19.46	Unknown		-	1.00*
11	20.77	Glucoerucin (4-methylthiobutyl GSL)	CH <sub>3</sub> -S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	341	1.00*
12	22.77	Glucobrassicin (3-indolylmethyl GSL)	Indole-3-CH <sub>2</sub> -	368	0.29
13	24.41	Dimeric 4-mercaptobutyl GSL	{-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -S-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -}	652	1.00*
14	25.23	4-Methoxyglucobrassicin (4-methoxy-3-indolylmethyl GSL)	Indole-4-OCH <sub>3</sub> -	398	0.25
15	26.04	Gluconasturtin (2-phenylethyl GSL)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	343	0.95
16	27.19	Unknown		-	1.00*
17	28.71	Unknown		-	1.00*

<sup>1)</sup>Elution order of GSL from HPLC chromatogram (see Fig. 2).

<sup>2)</sup>Retention time of HPLC chromatogram.

<sup>3)</sup>See Fig. 1.

<sup>4)</sup>As desulfo-glucosinolates.

<sup>5)</sup>The international organization for standardization (ISO9167-1,1992).\*Not yet decided by the ISO.

<sup>6)</sup>External standard.

<sup>7)</sup>In this study, seven unknown compounds have not yet been identified.

동정할 수 있었다. 또한 D'Antuono 등(2008)은 새싹채소 용 rocket salad의 총 GSL 함량은 핵산을 처리하여 오일 (oil)를 제거한 씨앗에서 124 μmol/g dry wt.으로 가장 높았다(Table 3). 이 실험값은 Kim 등(2006)이 핵산을 처리하여 오일을 제거한 씨앗의 함량(125 μmol/g dry wt.)과 매우 유사하였다. 또한 새싹채소 성장기간에 따라 총 GSL 함량은 표준편차(SD)가 너무 커서(특히 파종 후 2일) 통계학적으로는 유의차이가 없는 것도 있지만 파종 후 3일까지 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보였으며, 39.3~59.0 μmol/g dry wt. 범위를 나타내었다. 주요한 성분 중에서 파종 후 3일에 glucoraphanin(5.05 μmol/g dry wt.)과 glucoerucin(49.6 μmol/g dry wt.) 함량이 매우 높았으며, 특히 이러한 결과는 브로콜리 새싹채소에서 항암예방 효과가 뛰어나다고 알려진 glucoraphanin 함량이 파종 후 3일 후에 가장 높았던 것과 유사하였다(Fahey 등, 1997).

특히 indole GSL 계열인 4-methoxy glucobrassicin이 파종 후 3일(1.20 μmol/g dry wt.)부터 점차적으로 증가하면서 7일에서 가장 높은 값(7.01 μmol/g dry wt.)을 나타내었는데, 이 결과는 다른 연구자들의 자료결과와 전혀 다르므로 좀 더 검토할 필요가 있다고 보인다.

#### 나. 포장재배

포장에 직파하여 7주 동안 재배한 rocket salad 잎의 총 GSL 함량은 파종 후 3주에서 5.91 μmol/g dry wt.이 식물체 성장과 함께 점차 증가하여 파종 후 7주에서는 32.2 μmol/g dry wt.로 5배 이상 증가하였다(Table 4). 특히 주성분인 glucoerucin과 glucoraphanin이 많은 증가를 보였으며, 씨앗에서는 전혀 검출되지 않았던 dimeric 4-mercaptobutyl GSL이 식물체의 성장과 함께 눈에 띄게 증가하였다. 이 화합물은 rocket salad의 향기와 매운 맛을 내는 4-merc

**Table 3.** Glucosinolate content( $\mu\text{mol/g dry wt.}$ ) in seed sprouts of “Rucola”.

No. <sup>1)</sup>	Compounds	Seeds		Days after sowing						
		Without hexane	With hexane <sup>2)</sup>	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
1	Glucoraphanin	3.25±0.39	4.53±0.92	2.31±0.10	3.97±1.18	5.05±0.71	4.11±0.85	3.57±0.54	4.36±1.33	3.77±0.69
2	Sinigrin	ND	0.27±0.07	ND	0.29±0.13	0.35±0.22	0.42±0.07	0.53±0.12	0.43±0.35	0.87±0.29
3	Gucoalyssin	0.21±0.03	0.23±0.05*	0.18±0.00	0.36±0.05	0.48±0.05	0.42±0.04	0.36±0.02	0.34±0.07	0.38±0.04
4	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND	0.17±0.06	0.25±0.09	0.21±0.08	0.21±0.10
5	Diglucothiobeinin	ND	ND	ND	ND	ND	0.14±0.02*	ND	0.23±0.05	0.29±0.03
6	Unknown	ND	ND	0.14±0.01	0.18±0.01	0.15±0.04	0.12±0.00	0.10±0.01	0.12±0.04*	0.16±0.06
7	Glucobrassicinapin	0.32±0.02	0.42±0.05	0.17±0.02	0.31±0.09	0.49±0.12	0.66±0.29	0.67±0.21	0.78±0.26	0.62±0.15
8	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	Unknown	0.27±0.18	0.43±0.04	0.09±0.02*	0.23±0.14*	0.20±0.04	0.13±0.00	ND	0.15±0.09*	ND
10	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08±0.01*	ND	0.21±0.14
11	Glucoerucin	69.6±16.9	117±5.54	36.2±6.78	44.0±28.98	49.6±4.75	37.62±1.48	31.9±7.62	32.57±1.06	26.0±1.45
12	Glucobrassicin	ND	0.04±0.01	ND	0.02±0.00	0.05±0.02	0.07±0.01	0.08±0.01	0.08±0.02	0.07±0.00*
13	Dimeric 4-mercaptobutyl GSL	ND	ND	ND	0.21±0.02*	0.73±0.28	0.71±0.13	0.38±0.30	0.37±0.33	0.32±0.32*
14	4-Methoxyglucobrassicin	0.19±0.20	0.19±0.17	0.09±0.03	0.63±0.09	1.20±0.36	2.31±0.30	3.61±0.48	4.74±1.49	7.01±1.06
15	Gluconasturtin	0.34±0.09	0.56±0.13	0.12±0.04	0.21±0.09	0.30±0.12	0.23±0.02	0.23±0.03	0.26±0.08	0.34±0.04
16	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	Unknown	0.36±0.01	0.74±0.29	0.13±0.02*	0.19±0.10*	0.37±0.08	0.26±0.01	0.43±0.14	0.44±0.13	0.53±0.15
Total		74.5±18.0	124±6.22	39.3±6.99	50.4±30.6	59.0±3.52	47.3±2.04	42.2±8.27	45.0±3.62	40.5±2.76

<sup>1)</sup>Numbers from Table 2.<sup>2)</sup>Seeds after removing oil with hexane.<sup>3)</sup>ND: not detected.\**n*=2 because one sample was not detected.**Table 4.** Time-course of glucosinolate content( $\mu\text{mol/g dry wt.}$ ) in leaves of “Odyssey”

No. <sup>1)</sup>	Compounds	Weeks after sowing				
		3W	4W	5W	6W	7W
1	Glucoraphanin	0.85±0.30	1.63±0.38	4.03±0.87	6.54±2.03	8.86±3.04
2	Sinigrin	0.33±0.10	0.39±0.18	0.39±0.11	0.33±0.03	0.79±0.38
3	Gucoalyssin	ND <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND
4	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
5	Diglucothiobeinin	0.17±0.08	0.32±0.14	0.76±0.16	0.82±0.54	1.48±0.34
6	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
7	Glucobrassicinapin	0.26±0.02*	ND	0.36±0.16	0.19±0.09	0.26±0.11
8	Unknown	ND	0.11±0.06*	0.19±0.05	0.16±0.09	0.24±0.02
9	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
10	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
11	Glucoerucin	0.78±0.39	1.84±0.34	4.87±1.52	7.16±0.49	11.02±2.84
12	Glucobrassicin	0.04±0.01	0.04±0.01	0.06±0.02	0.03±0.01*	0.05±0.02
13	Dimeric 4-mercaptobutyl GSL	2.79±1.28	3.00±0.92	6.93±1.37	6.16±4.88	7.62±1.34
14	4-Methoxyglucobrassicin	0.51±0.14	0.70±0.20	0.71±0.15	0.64±0.18	0.98±0.09
15	Gluconasturtin	0.13±0.03*	0.13±0.02*	0.23±0.05	0.21±0.04	0.27±0.04
16	Unknown	ND	ND	0.14±0.00*	0.13±0.04	0.25±0.16
17	Unknown	0.22±0.04*	0.22±0.10	0.35±0.10	0.29±0.17	0.37±0.13
Total		5.91±2.41	8.30±2.18	18.9±3.60	22.7±4.56	32.2±5.28

<sup>1)</sup>Numbers from Table 2.<sup>2)</sup>ND: not detected.\**n*=2 because one sample was not detected.

aprotobutyl GSL이 GSL 추출과정에서 S-S결합을 통하여 생성되는 것으로 알려져 있는 데, 수확할 때 성숙한 rocket salad에서 강한 향기와 매운 맛을 내는 것과 깊은 관련이 있는 것으로 보인다(Bennett 등, 2002). 파종 후 7주된 잎의 총 GSL 함량은 32  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 으로 Kim 등(2006)의 Hoagland 양액재배(9월 24일 파종, 11월 12일 수확) 실험(파종 후 5주 수확)과 비교(11  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )하면 파종 후 5주에서는 18.9  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 로 약 1.7배 높은 값이었다. 이러한 결과는 재배시기는 유사하였지만 재배환경이 제어되지 않는 포장에서 기후조건과 재배방법 등의 환경의 영향을 강하게 받았을 것으로 생각된다. 재배기간을 통틀어 주성분 GSL 함량은 glucoerucin > glucoraphanin > dimeric 4-mercaptobutyl GSL 순서로 많았으며, 파종 후 7주에서 diglucothiobeinin 함량이 1.48  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 를 기록한 것을 제외한 나머지 성분의 GSL 함량은 모두 1  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 를 넘지 못 하였다. 각 GSL 성분들도 총 GSL 함량과 같이 식물체 성장과 함께 매우 증가하였다.

#### 다. 품종간 비교

재배종 간 비교를 위하여 5종류의 rocket salad를 포장에 직파하여 파종 후 4주와 6주에 잎을 수확하여 GSL를 분석하였다(Table 5). 그 결과, 파종 후 4주에 수확 잎의 총 GSL 함량은 9.76~13.7  $\mu\text{mol/g dry wt.}$  범위, 파종 후 6주에 수확 한 것은 24.6~35.8  $\mu\text{mol/g dry wt.}$  범위를 나타내었고, 식물체가 성장할수록 실험에 사용된 재배종 모두 총 GSL 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 재배종별 총 GSL 함량을 보면, 파종 후 4주에서는 “Rucola” > “Rocket Herbs”  $\geq$  “Odyssey” > “Takii” > “Herb” 순이었지만, 6주에서는 순서변화가 생겨 “Takii” > “Herb” > “Odyssey” > “Rucola” > “Rocket Herbs” 순으로 낮은 값을 나타내는 것으로 보아 재배종간 GSL 대사 차이가 있음을 간접적으로 보여주었다(단, 통계적 차이는 거의 없음). 또한 “Takii”와 “Herb” 잎의 총 GSL 함량은 파종 후 4주 보다 6주에 3배 이상 증가하였다. 주성분의 함량은 glucoerucin > glucoraphanin > dimeric 4-mercaptobutyl GSL 순으로 상기 Table 4의 결과와 유사하였다. 특히 파종 후 6주에서 diglucothiobeinin 함량은 1.40~1.91  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 로 모든 재배종에서 매우 증가하였다. D'Antuono 등(2008)과 Bennett 등(2006)이 다양한 rocket 잎의 GSL 분석을 통하여 각 GSL 성분들의 함량뿐만 아니라 구성성분 종류도 매

우 다양하게 구성되어 있음을 밝혔듯이 향후 GSL성분들의 효능과 관련하여 다양한 유전자원을 검토할 때 총 GSL 함량도 중요하지만 각 GSL 성분들의 특성을 조사하는 것이 더욱 중요할 것으로 생각된다.

## IV. 결론

Rocket salad(*Eruca sativa*)에서 (i) 새싹채소 재배, (ii) 성장단계에 따른 함량 변화(포장재배)와 (iii) 5종류의 품종 간 비교(파종 후 4, 6주)를 통하여 glucosinolates(GSLs) 함량 변화를 조사하였다. GSL의 분리 및 동정은 HPLC와 LC-APCI-MS분석( $[M+H]^+$ )을 통하여 수행하였으며, 새싹채소에서는 15종류, 포장재배한 것에서는 12종류의 GSL를 분리하고, 10종류(glucoraphanin, sinigrin, glucoalyssin, diglucothiobeinin, glucobrassicinapin, glucoerucin, glucobrassicin, dimeric 4-mercaptobutyl GSL, 4-methoxy glucobrassicin, gluconasturtin)의 GSL를 동정(나머지 7종류는 미확인)하였다. (i) 새싹채소의 총 GSL 함량은 파종 후 1일(39.3  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )에서 3일(59.0  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )까지 증가하였고, 그 이후에는 계속적으로 감소하여 파종 후 7일에서는 가장 낮은 값(40.5  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )을 나타내었다. 새싹채소 재배기간 동안 주요한 GSL성분 및 함량은 glucoerucin > glucoraphanin > 4-methoxy glucobrassicin 순서로 많았다. (ii) 성장단계별 총 GSL함량은 파종 후 3주(5.91  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )부터 점진적으로 증가하여 7주에서는 가장 높은 값(32.2  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )을 나타내었다. 주요한 GSL성분의 함량은 재배기간을 통틀어 glucoerucin > dimeric 4-mercaptobutyl GSL  $\geq$  glucoraphanin 순서이었다. (iii) 5종류의 품종 간 비교에 의한 총 GSL함량은 파종 후 4주에서는 “Rucola” > “Rocket Herbs”  $\geq$  “Odyssey” > “Takii” > “Herb” 순이었지만, 6주에서는 “Takii” > “Herb” > “Odyssey” > “Rucola” > “Rocket Herbs”의 순으로 나타났으며, 파종 후 6주의 “Takii”는 35.8  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 으로 4주(10.7  $\mu\text{mol/g dry wt.}$ )보다 3배 이상 증가하여 가장 높은 증가율을 나타내었다. 파종 후 4주와 6주 모두 주요한 GSL성분은 glucoraphanin, glucoerucin, dimeric 4-mercaptobutyl GSL이었다.



**Table 5.** Glucosinolate content( $\mu\text{mol/g}$  dry wt.) for comparing five kind varieties in leaves of rocket salad.

No. <sup>1)</sup>	Compounds	Varieties				
		“Odyssey”	“Rucola”	“Takii”	“Herb”	“Rocket Herbs”
(A) Harvested at 4 weeks after sowing						
1	Glucoraphanin	2.22±0.33	2.62±0.98	2.52±0.55	2.60±0.36	3.11±0.79
2	Sinigrin	0.50±0.04	0.47±0.17	0.46±0.05	0.43±0.13	0.41±0.05
3	Gucoalyssin	ND <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND
4	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
5	Diglucothiobeinin	0.36±0.08	0.74±0.40	0.33±0.12	0.63±0.22	0.28±0.02
6	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
7	Glucobrassicinapin	0.32±0.07	0.31±0.02*	0.19±0.03	0.35±0.15	0.30±0.12
8	Unknown	0.12±0.00	0.18±0.02*	0.09±0.03	0.11±0.03	0.11±0.02
9	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
10	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
11	Glucorucin	2.49±0.13	3.48±1.49	2.71±0.79	2.83±0.34	3.58±0.88
12	Glucobrassicin	0.07±0.01	0.05±0.01	0.09±0.01	0.07±0.02	0.05±0.02
13	Dimeric 4-mercaptobutyl GSL	4.13±0.29	5.08±1.56	3.37±1.26	2.11±0.15	2.83±0.53
14	4-Methoxyglucobrassicin	0.68±0.12	0.61±0.19	0.68±0.07	0.54±0.03	0.50±0.42
15	Gluconasturtin	0.17±0.04	0.15±0.05	0.13±0.01	0.11±0.02	0.13±0.02
16	Unknown	0.13±0.04*	ND	ND	ND	
17	Unknown	0.15±0.04	0.23±0.08	0.13±0.04*	ND	0.12±0.01
Total		11.3±1.04	13.7±5.16	10.7±2.77	9.76±0.86	11.4±2.23
(B) Harvested at 6 weeks after sowing						
1	Glucoraphanin	7.86±2.48	7.61±1.08	13.6±6.49	8.48±2.11	6.34±0.60
2	Sinigrin	0.63±0.33	0.65±0.24	0.62±0.21	0.65±0.01	0.58±0.08
3	Gucoalyssin	ND <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND
4	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
5	Diglucothiobeinin	1.69±0.38	1.40±0.06	1.82±1.18	1.91±0.16	1.84±0.58
6	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
7	Glucobrassicinapin	0.37±0.01	0.34±0.08	0.37±0.23	0.29±0.08	0.29±0.06
8	Unknown	0.21±0.02	0.20±0.02	0.19±0.06	0.20±0.03	0.20±0.02
9	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
10	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND
11	Glucorucin	11.1±1.40	8.85±1.14	11.7±5.01	11.4±1.49	9.55±0.40
12	Glucobrassicin	0.07±0.01	0.07±0.02	0.08±0.03	0.07±0.02	0.05±0.02
13	Dimeric 4-mercaptobutyl GSL	4.90±1.92	6.79±2.88	4.98±1.88	4.95±2.08	4.09±1.20
14	4-Methoxyglucobrassicin	1.06±0.05	0.93±0.10	0.97±0.26	1.17±0.07	0.93±0.18
15	Gluconasturtin	0.24±0.02	0.26±0.04	0.27±0.05	0.24±0.06	0.23±0.01
16	Unknown	0.26±0.05	0.24±0.04	0.34±0.08	0.23±0.02	0.20±0.07
17	Unknown	0.25±0.04	0.30±0.08	0.35±0.08*	0.29±0.08	0.26±0.06
Total		28.6±1.15	27.7±3.54	35.8±7.70	29.9±5.14	24.6±1.63

<sup>1)</sup>Numbers from Table 2.<sup>2)</sup>ND: not detected.\**n*=2 because one sample was not detected.

## 감사의 글

본 연구는 2010년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

## 참고 문헌

- Bennett RN, Mellon FA, Botting NP, Eagles J, Rosa EAS, Williamson G. 2002. Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (rocket salad). *Phytochemistry* 61: 25-30.
- Bennett RN, Rosa EAS, Mellon FA, Kroon PA. 2006. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *J. Sci. Food Agric.* 54: 4005-4015.
- Bennett RN, Rosa C, Mellon FA, Rosa EAS. 2007. Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* L. (Salad Rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (Wild Rocket) from diverse geographical locations. *J. Agric. Food Chem.* 55: 67-74.
- Bones AM, Rossiter JT. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol. Plant* 97: 194-208.
- Cataldi TR, Rubino A, Lelario F, Bufo SA. 2007. Naturally occurring glucosinolates in plant extracts of rocket salad (*Eruca sativa* L.) identified by liquid chromatography coupled with negative ion electrospray ionization and quadrupole ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21: 2374-2388.
- Daxenbichler ME, Spencer GF, Carlson DG, Rose GB, Brinker AM, Powell RG. 1991. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* 30: 2623-2638.
- D'Antuono LF, Elementi S, Neri R. 2008. Glucosinolates in *Diplotaxis* and *Eruca* leaves: Diversity, taxonomic relations and applied aspects. *Phytochemistry* 69: 187-199.
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10367-10372.
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56: 5-51.
- Fenwick GR, Heaney RK, Mawson R. 1989. *Toxicants of Plant Origin vol. II, Glycosides* edited by Cheeks PR. pp. 1-41. CRC Press Inc, Florida.
- Halkier BA, Du L. 1997. The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Sci.* 2: 425-431.
- Iori R, Bernardi R, Gueyrard D, Rollin P, Palmieri S. 1999. Formation of glucoraphanin by chemoselective oxidation of natural glucoerucin: A chemoenzymatic route to sulphoraphane. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 1047-1048.
- Jirovetz L, Smith D, Buchbauer G. 2002. Aroma compound analysis of *Eruca sativa* (Brassicaceae) SPME headspace leaf samples using GC, GC-MS, and olfactometry. *J. Agri. Food Chem.* 50: 4643-4646.
- Li Y, Zhang T, Korkaya H, Liu S, Lee H-F, Newman B, Yu Y, Clouthier SG, Schwartz SJ, Wicha MS, Sun D. 2010. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin. Cancer Res.* 16: 2580-2590.
- Kim SJ, Jin S, Ishii G. 2004. Isolation and structure elucidation of 4-( $\beta$ -D-glucopyranosylsulfanyl) butyl glucosinolate from leaves of Rocket Salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 2444-2450.
- Kim SJ, Kawaharada C, Ishii G. 2006. Effect of ammonium: nitrate nutrient ratio on nitrate and glucosinolate contents of hydroponically-grown rocket salad (*Eruca sativa* Mill.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 52: 387-393.
- Kim SJ, Ishii G. 2006. Glucosinolate profiles in the seeds, leaves and roots of rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and anti-oxidative activities of intact plant powder and purified 4-methoxyglucobrassicin. *Soil Sci. Plant Nutr.* 52: 394-400.
- Kim SJ, Kawaharada C, Jin S, Hashimoto M, Ishii G, Yamauchi H. 2007. Structural Elucidation of 4-(Cysteinyl)butyl glucosinolate from the leaves of *Eruca sativa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 114-121.
- Talalay P, Zhang Y. 1996. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 806-810.
- Wittstock U, Halkier BA. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Sci.* 7: 263-270.
- Yadava TP, Friedt DW, Gupta SK. 1998. Oil content and fatty acid composition of Taramira (*Eruca sativa* L.) genotypes. *J. Food Sci. Technol.* 35: 557-558.
- Zhang Y, Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* 54: 1976-1981.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. A major inducer of anti-carcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2399-2403.