

초음파 처리가 채소 중의 sulforaphane 분석에 미치는 영향

최아름¹, 이건순², 채희정^{1*}

Effects of ultrasonication on the analysis of sulforaphane content in vegetables

A-Reum Choi¹, Gun-Soon Lee² and Hee-Jeong Chae^{1*}

요 약 초음파처리가 십자화과 채소의 sulforaphane 함량 분석에 미치는 영향을 GC/MS를 이용하여 검토 하였다. 무, 알타리무, 순무, 양배추, 브로콜리를 각각 dichloromethane을 추출용매로 하여 초음파처리 후 용매 추출 및 질소 농축을 하고, m/z 72, 160, 55, 114을 선택이온측정법(selective ion monitoring, SIM)을 이용하여 분석하였다. 각 채소류의 sulforaphane 함량은 브로콜리가 149.0 ppm으로 가장 많았으며, 양배추(67.9 ppm), 무(35.4 ppm)의 순으로 높았다. Sulforaphane 추출율은 진탕교반(shaking)만 할 경우보다 초음파처리(sonication)후 진탕교반(shaking)을 할 경우 2.7배 높은 것으로 나타났다. 따라서 초음파추출공정이 sulforaphane의 추출효율 향상에 유효한 방법으로 판단된다.

Abstract The effect of ultrasonication on the sulforaphane analysis in cruciferous vegetables was investigated by GC/MS. The ultrasonication of the analysis samples was carried out in dichloromethane as a solvent, which was followed by concentration in nitrogen gas, and the analysis of sulforaphane was performed using selective ion monitoring (SIM) at m/z 72, 160, 55 and 114. The content of sulforaphane was the highest in the extract of broccoli (149 ppm), and followed by cabbage (67.9 ppm) and radish (35.4 ppm). When the vegetable samples were shaken after ultrasonication, the extraction efficiency of sulforaphane was 2.7-fold enhanced, compared to the extraction by shaking. The result suggested that pretreatment including sonication can be used for improving the extraction efficiency of sulforaphane.

Key Words : sulforaphane, GC/MS, cruciferous vegetables, ultrasonication

1. 서론

십자화과(Cruciferus)속은 350속의 약 3,000종이 있으며, 특히 서아시아의 지중해 연안지방에 종류가 많다. 한편 우리나라에서 많이 재배되고 있는 십자화과 채소류로는 양배추, 배추, 케일, 컬리플라워, 브로콜리, 무, 열무, 유채, 냉이, 갓 등이 있는 것으로 알려지고 있다[1].

십자화과 채소에는 식물성 2차 대사물질인 여러 종류의 glucosinolate, flavonoid, phenol 화합물 등이 풍부하게 존재한다. 이러한 생리활성 물질들을 함유한 채소류를 사람이 섭취하게 되면 그 분해산물이 생성되어 통풍, 설사,

위장병, 반창 및 두통을 치료하는 여러 가지 약리적 또는 생리적 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다[2, 3, 4]. 이에 따라 15세기경부터 유럽에서는 십자화과 채소를 각 가정에서 재배하였고[5], 최근 십자화과 채소에 대한 관심과 소비가 서양뿐 아니라 국내에서도 급증하고 있다. 브로콜리와 같은 서양 십자화과 채소류의 수입이 눈에 띄게 증가하여 웰빙 트렌드에 맞게 국내 십자화과 채소류의 기능성을 개발하고 생체 및 가공품을 널리 이용해야 할 필요성이 대두되고 있다[6].

십자화과 채소 중에 함유된 황 함유 화합물 중 sulforaphane(S-methylsulfinylbutyl isothio-cyanate)은 isothiocyanate의 일종으로 마쇄과정 중 myrosinase라는 효소의 작용에 의해 생성된다[7]. Sulforaphane은 phase I 효소(cytochrome P-450)와 발암원의 독성을 줄이고 발암물질의 배출을 돕는 phase II 효소들에 대한 강력한 유도체로 알려져 있다[8, 9, 10]. 최근 *in vitro* 및 *in vivo*

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업(1-4, 2005-2007)의 지원에 의해 수행되었습니다.

¹호서대학교 식품생물공학과

²한국농업대 생활과학과

*교신저자 : 채희정 (hjchas@hoseo.edu)

상의 실험연구들과 여러 역학조사들에 의해 이 효소들은 종양의 발생을 억제, 자멸을 유도하여 암 생성을 억제하는데 큰 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[11, 12, 13, 14]. Zhang 등은 브로콜리 추출물에서 phase II 효소의 유도 효과가 큰 것을 관찰하였다[10].

식물체의 유용성분을 분리하는 추출공정에 따라 추출 시간의 단축과 수율을 높여서 전처리 공정을 개선 할 수 있다. 정 등[15]은 오가피를 마이크로파, 초음파, 볶음 전처리와 열수 추출법을 병행하여 초음파처리군이 대조군에 비해 높은 추출효율을 나타냈다. 초음파는 주파수가 약 20kHz 이상인 음파를 지칭하며 비파괴 검사와 물체를 전단 및 압축시켜 조직의 물리적 파괴, 유화 형성, 화학반응 촉진 하는 등의 성질을 가지는 것으로 알려져 있다 [16].

현재까지 십자화과 채소 중의 sulforaphane 함량에 대한 연구는 현저히 적은 실정이다. 본 연구에서는 김 등 [17]이 보고한 용매추출법에 물질전달 통로를 형성하는 성질을 갖는 초음파처리에 의해 십자화과 채소의 sulforaphane 추출수율을 향상시킬 수 있는 전처리 방법을 모색하였다. 또한 십자화과 채소인 무(radish), 순무(tumip), 알타리무(young radish), 양배추(cabbage), 브로콜리(broccoli)의 sulforaphane 함량을 GC/MS (gas chromatography/ mass detector)로 분석하여 비교 검토하였다. 이를 통하여 십자화과 채소작물을 산업적으로 이용하기 위한 기초 분석 자료를 확보하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 시약

무(제주), 양배추(고양), 순무(강화), 알타리무(화성), 브로콜리(평창)는 시중에서 구입하여 분석에 사용하였다. Sulforaphane 표준품은 Sigma사(MO, USA)에서 구입하여 분석에 사용하였고, dichloromethane은 하니웰사(Budick & Jacson, USA)의 제품을 사용하였다.

2.2 휘발성 성분 추출

김 등[17]의 방법을 변형하여 진탕교반과 초음파처리를 병행하였다. 건조하지 않은 생시료 50 g을 100 ml의 dichloromethane을 넣고, 초음파 분쇄기(HD 2200, Germany)로 추출(50 power, 1 min)한 후, 4 시간 동안 진탕교반하여 질소 존재 하에 농축한 후 여액을 0.2 μ m로 여과하였다.

2.3 GC/MS에 의한 sulforaphane 정량

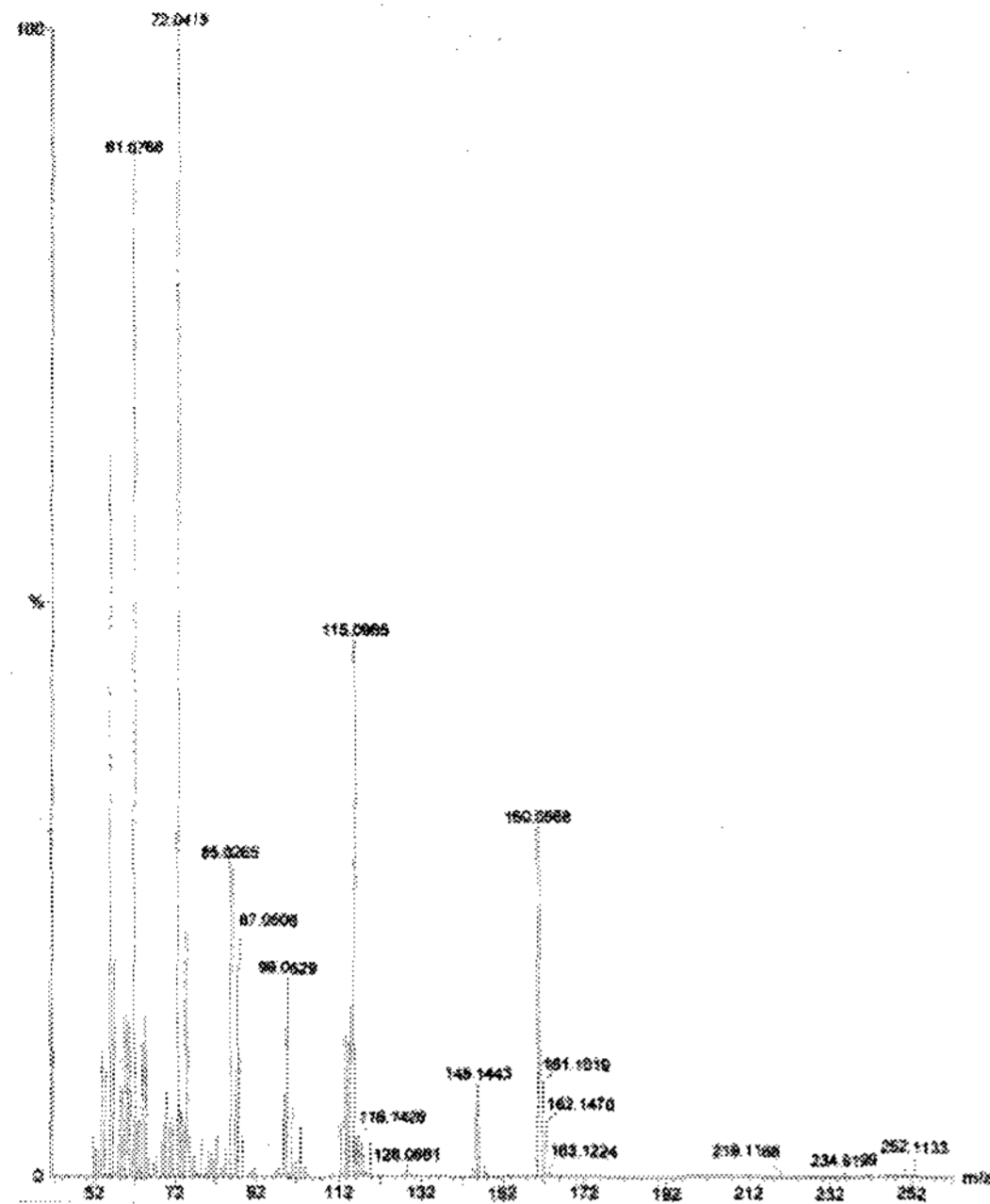
1 ml로 농축한 시료 1 μ l를 capillary direct column (AT-5ms, 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m)을 장착한 GC(Perkin Elmer Clarus 500)와 mass selective detector(Perkin Elmer Clarus 500)시스템에 주입하였다. 오븐 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 2분간 유지한 후 10 $^{\circ}$ C/min로 270 $^{\circ}$ C까지 가열하여 상승시킨 후 5분간 유지하도록 하였다. 주입구 및 검출구 온도는 250 $^{\circ}$ C로 설정하였고, 70 eV의 에너지로 전자 이온화(electron impact ionization, EI)하였다. 시료 주입시 split ratio는 7:1로 사용하였으며, carrier 가스는 helium으로 유속은 1.0 ml/min이었다. GC/MS에 시료를 주입하여 총이온크로마토그램(total ion chromatogram)을 얻은 후 분리된 sulforaphane의 피크를 MS를 이용하여 성분을 확인하였다. 김 등[17]의 방법을 이용하여 선택이온측정법(selective ion monitoring, SIM) 방법으로 얻은 sulforaphane 피크면적을 외부 정량곡선에 의하여 측정하였다. 정량곡선을 작성하기 위하여 sulforaphane 표준물질 일정량을 용매에 녹여 GC/MS에 주입하여 질량분석 스펙트럼을 얻은 후 main fragmentation ion인 m/z 72, 160, 55, 114를 프로그램에 입력하였다. 선택이온 측정법에서 선택한 이온들을 적용시킨 후 얻은 피크를 통해 정량곡선을 작성하여 컴퓨터에 입력하고 십자화과 채소 중의 sulforaphane 함량을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 sulforaphane의 선택이온 질량분석

표준물질인 sulforaphane의 질량분석 스펙트럼은 그림 1에서와 같이, CH₂-NCS m/z 72, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NCS m/z 114, CH₂-S-CH₂ -CH₂-CH₂-CH₂-NCS m/z 160의 fragmentation ion들이 관찰되었다.

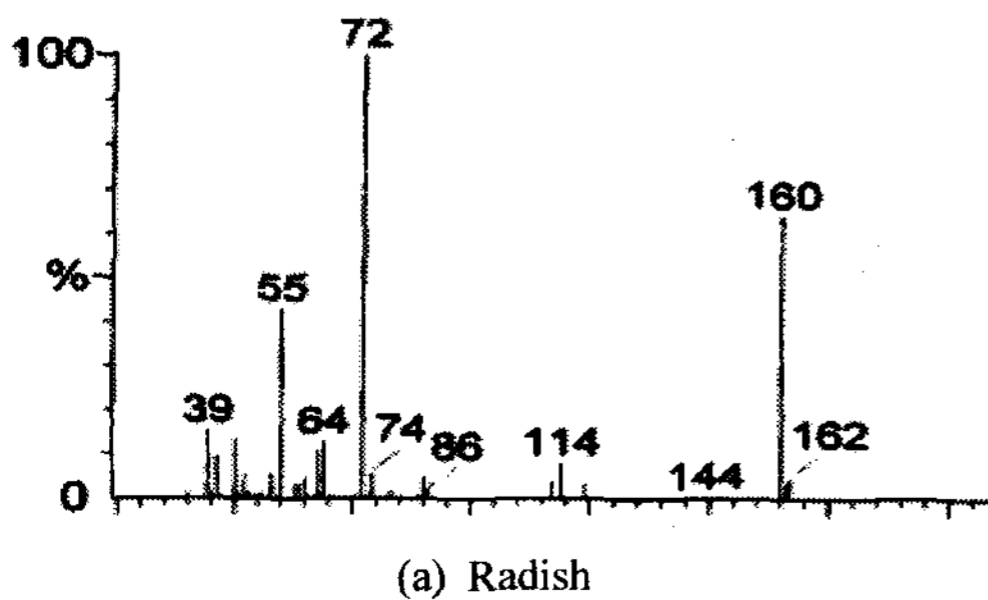
또한, 표준 sulforaphane 피크의 질량분석 스펙트럼에 나타난 각 fragmentation ion의 상대 세기는 m/z 72를 100%로 보았을 때, m/z 160은 57%, m/z 55는 43%, m/z 114는 10%로 나타났고, 정량분석을 위하여 isothiocyanate 화합물의 특징 이온이면서 감도가 높은 m/z 72와 그 다음으로 감도가 높게 나타난 m/z 160과 m/z 114를 선택하여 selected ion monitoring(SIM) mode에서 sulforaphane을 정량하였다.



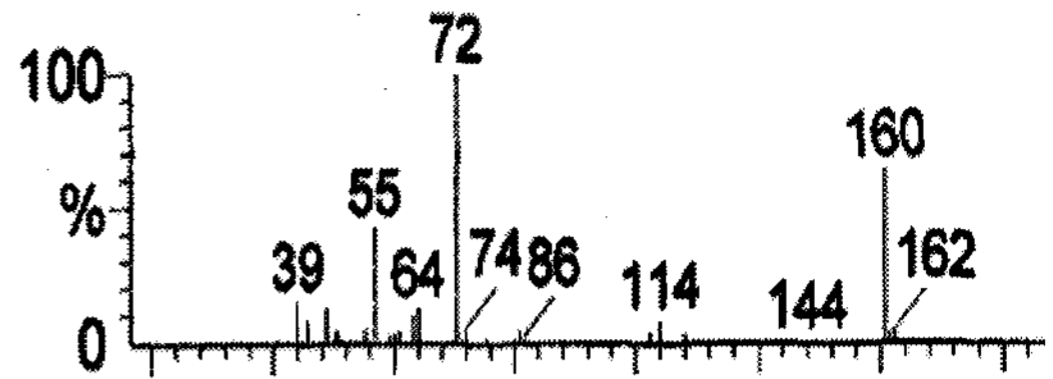
[그림 1] 표준물질 sulforaphane의 질량분석스펙트럼

3.2 십자화과 채소 중 sulforaphane의 질량 분석 스펙트럼

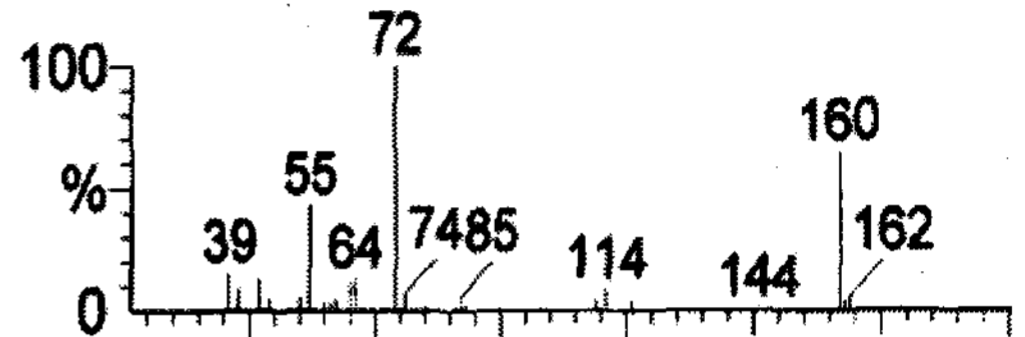
무, 브로콜리 및 양배추 추출물을 각각 이용하여 얻은 sulforaphane 피크의 질량분석 스펙트럼은 그림 2와 같이 나타내었다. 세가지 시료 모두에서 $\text{CH}_2\text{-NCS}$ m/z 72, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCS}$ m/z 114, $\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCS}$ m/z 160의 fragmentation ion들이 관찰되었으며 표준 sulforaphane 피크의 질량분석 스펙트럼에 나타난 각 fragmentation ion인 m/z 72, m/z 160, m/z 114, m/z 55의 상대 세기와 유사하였다. Zhang 등[10]과 김 등[17]이 보고한 브로콜리 추출물의 sulforaphane 피크에 대한 질량분석 스펙트럼과 일치한 fragmentation ion을 보였고, 무, 브로콜리 및 양배추에서 sulforaphane을 함유하고 있음을 확인하였다.



(a) Radish



(b) Broccoli

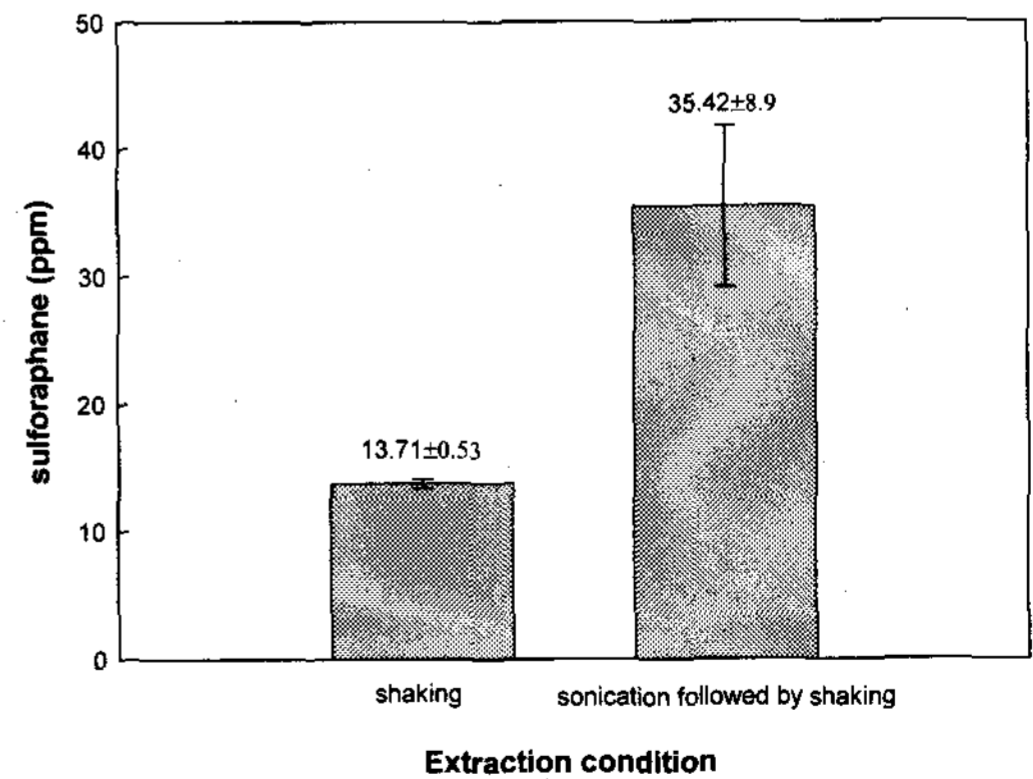


(c) Cabbage

[그림 2] 무(A), 브로콜리(B), 양배추(C)의 질량분석스펙트럼

3.3 추출조건에 따른 sulforaphane의 함량

dichloromethane 용매를 사용하여 무를 추출하는 경우 단순히 진탕교반만 하여 추출한 시료와 초음파처리한 후 진탕교반하여 추출한 시료에 대하여 sulforaphane 분석결과를 비교하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 진탕교반만 한 경우보다 초음파처리한 후 진탕교반하여 추출하였을 경우에서 2.7배 높은 sulforaphane 함량을 보였다. 즉 초음파처리를 sulforaphane을 추출하였는데 시료의 유효 성분이 같은 추출시간에 더 많은 양이 추출되었음을 확인할 수 있었다.



[그림 3] 추출조건에 따른 무의 sulforaphane 함량

김 등[17]이 보고한 무의 sulforaphane 함량 측정법에서 초음파처리를 실시하지 않고 측정한 sulforaphane 함량은 5.5~8.8 ppm으로 본 연구와 큰 차이를 나타내어

추출방법에 따른 영향이 큰 것으로 판단된다. 따라서 이후의 모든 분석 실험에서는 초음파 처리를 적용하여 실시하였다.

3.4 십자화과 채소 중 sulforaphane 함량

표준물질인 sulforaphane을 서로 다른 농도로 조제하여 GC/MS에 주입한 후 선택이온측정법(selective ion monitoring, SIM)에 의하여 얻은 면적을 농도에 대하여 정량곡선을 작성한 후, 십자화과 채소 중의 sulforaphane 함량은 표준물질의 질량 스펙트럼과 동일하게 나타나는 피크만을 적분하여 얻은 면적에 의해 계산하였다.

무, 브로콜리와 양배추의 초음파처리 용매 추출물은 GC/MS에 주입하여 scan mode로 얻은 총이온크로마토그래프에서는 표준물질 sulforaphane과 유사한 머무름 시간을 나타내는 성분이 존재하였으므로, sulforaphane만을 선택적으로 분석하기 위하여 표준물질인 sulforaphane의 특징적인 이온과 상대세기를 지닌 질량분석 스펙트럼을 토대로 SIM에 의해 정량하였다.

시중에서 구입한 무, 브로콜리, 양배추, 순무, 알타리무 중의 sulforaphane 함량을 상기의 분석방법을 이용하여 분석한 결과를 표 1에 나타내었다.

[표 1] 선택이온법(SIM)에 의한 십자화과 채소의 sulforaphane 함량

Vegetables	Sulforaphane (ppm)
Radish	35.42±0.51
Broccoli	149.03±0.35
Cabbage	67.90±0
Tumip	-
Young radish	-

* 평균±표준편차

표 1에서 보는 바와 같이 브로콜리가 149.0 ppm으로 가장 많이 함유되어 있었으며, 양배추는 67.9 ppm, 무는 35.4 ppm이었다. 김 등[17]이 보고한 함량보다 양배추는 9배, 무는 6배 높은 함량을 나타냈으며, 브로콜리의 함량은 유사한 결과를 보였다. 이는 정 등[15]의 보고와 같이 초음파 처리를 병행한 결과, 높은 추출수율을 얻은 것으로 판단된다. 순무와 알타리무에서는 sulforaphane이 검출되지 않았다. 양배추와 무에 대해서도 시료 구입 장소에 따른 함량 차이를 보였던 것과 같이 본 실험결과와 비교하였을 때 큰 차이를 보였다. 순무는 15.4~23.1 ppm 정도의 sulforaphane을 함유한다고 보고된 바와 다르게 성분이 존재하지 않았다[17].

Sulforaphane의 함량은 일반적으로 채소의 품종, 부위, 재배환경에 따라 달라지는 것으로 알려져 있다. Hao 등 [18]은 브로콜리의 품종에 따라 2,746~4,748 ppm으로 매우 다양하였고, Kiyotaka 등[19]은 브로콜리의 화구에 가장 많은 171.3 ppm이 함유되어 있다고 하여 부위별 sulforaphane의 차이를 보고하였다. 또한 기온 등 재배환경에 따라 sulforaphane과 같은 iso-thiocyanate류의 함량에 차이가 있다고 보고하였다[20, 21, 22].

이상으로 초음파 처리에 의해 sulforaphane의 추출효율을 향상시킨 분석법을 개발하였고, 십자화과 채소작물을 기능성식품으로 개발하기 위한 기초 자료를 확보하였다.

4. 결론

십자화과 채소의 기능성 물질로서 각광을 받고 있는 sulforaphane의 함량 분석을 위한 GC/MS 분석 조건을 검토한 결과 isothiocyanate 화합물의 특징 이온이면서 감도가 높은 m/z 72, 160, 55, 114을 선택하여 선택이온측정법(selective ion monitoring, SIM)을 적용하였다. 또한 시료 전처리 조건 중 채소시료를 초음파 처리 후 진탕교반하여 질소 농축한 것이 진탕교반만 한 경우보다 추출효율을 2.7배 향상시켰다. 시중에 판매되고 있는 무, 알타리무, 순무, 양배추, 브로콜리를 분석한 결과, 분석한 시료 중 알타리무와 순무는 sulforaphane이 검출되지 않았으며, sulforaphane을 가장 많이 함유한 채소는 브로콜리, 양배추, 무순으로 나타났다.

참고문헌

- [1] Lee, S. M., Rhee, S. H. and Park, K. Y. (1997) Antimutagenic effect of various cruciferous vegetables in *Salmonella* assaying system. *J. Food Hyg. Safety*, 12, 321-327.
- [2] Fenwick, G. R., Heaney, R. K. and Mawson, R. (1989) Glucosinolates. In : *Toxicants of Plant Origin*. Vol. II. Glycosides, Cheeke, P. R., (Ed.) CRC Press, Inc., USA, 277-281.
- [3] Sporn, V. L., Wattenberg, L. W. (1981) Enhancement of glutathione S-transferase activity of the mouse forestomach by inhibitors of benzo[a] pyrene-induced neoplasia of forestomach. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 769-771.

- [4] Prakash, S. (1980) In "Brassica Crops and Wild Allies, Biology and Breeding". *Japan Sci. Soc. Press.*, 151-163.
- [5] Van Marrewijk, N. P. A. and Toxopeus, H. (1979) Proc. Eucarpia 'Cruciferae 1979' Conf. Wageningen., 47-56.
- [6] Fenwick, G. R., Heaney, R. K. and Mulin, W. (1983) Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18, 123-201.
- [7] Kjacr, A. (1960) Naturally derived isothio cyanates (mustard oils) and their parent glucosides. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 18, 122-176.
- [8] Prochaska, H. J. and Talalay, P. (1988) Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.*, 48, 4776-4782.
- [9] Talaly, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prester, T. and Zhang, Y. (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol., Lett.*, 82-83, 173-179.
- [10] Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. and Posner, G. H. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 2399-2403.
- [11] Gamet-Payrastre L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M. A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J. and terce, F. (2000) Sulforaphane a naturally occurring isothiocyanate induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 60, 1426-1433.
- [12] Bradfield, C. A. and Bjeldanes, L. F. (1987) High performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food. Chem.*, 35, 46-49.
- [13] Whitty, J. P. and Bjeldanes, L. F. (1987) The effects of dietary cabbage on xenobiotic metabolizing enzymes and the binding of aflatoxin B₁ to hepatic DNA in rats. *Food. Chem. Toxicol.*, 25, 581-587.
- [14] Park, K. Y., Lee, K. I. and Rhee, S. H. (1992) Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Food Sci. Nutr.*, 21, 149-153.
- [15] Chung, H. S. and Youn, K. S. (2005) Effects of microwave, ultrasound and roasting pretreatments on hot water extraction of *Acanthopanax senticosus*. *Korean J. Food Preserv.* 12, 146-150.
- [16] Earnshaw, R. G. (1998) Ultrasound a new opportunity for food preservation. In : Ultrasound in Food Processing, Povey, M. J. W and Mason, T. J.(Ed.), Blackie Academic and Professional, London, England, 183-192.
- [17] Kim, M. R., Lee, K. J., Kim, J. H. and Sok, D. E. (1997) Determination of sulforaphane in cruciferous vegetables by SIM. *J. Food Sci. Technol.*, 29, 882-887.
- [18] Hao, L., Yuan, Q. and Xiao, Q. (2005) Purification of sulforaphane from *Brassica oleracea* seed meal using low-pressure column chromatography. *J. Chromato. B.*, 828, 91-96.
- [19] Kiyotaka, N., Toshiko, U., Ohki, H., Tsuyoshi, T., Toshihide, S. and Teruo, N. (2006) Evaporative light scattering analysis of sulforaphane in broccoli samples: Quality of broccoli products regarding sulforaphane contents. *J. Agric. Food. Chem.*, 54, 2479-2483.
- [20] Coogan, R. C., Wills, R. B. H. and Nguyen, V. Q. (2001) Pungency levels of white radish (*Raphanus sativus L.*) grown in different seasons in Australia. *Food Chem.*, 72, 1-3.
- [21] Lee, J. M., Yoo, I. O. and Min, B. H. (1996) Effect of cultivars and cultural conditions on the pungent principle contents in radish roots. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 37, 349-356.
- [22] Pereira, F. M. V., Rosa, E., Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Carvalho, R. and Aires, A. (2002) Influences of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 6239-6244.

최 아 름(A-Reum Choi)

[준회원]



- 2007년 2월 : 호서대학교 식품생물공학과 (공학사)
- 2007년 2월 ~ 현재 : 호서대학교 식품생물공학과 석사과정

<관심분야>
기능성식품, 생물공학

이 건 순(Gun-Soon Lee)

[정회원]



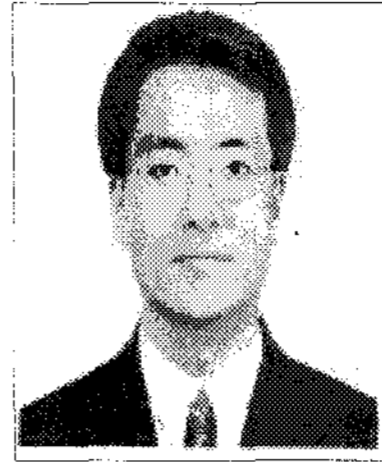
- 1985년 8월 : 한국방송통신대학교 (가정학사)
- 1991년 2월 : 동국대학교 사범대학 (가정학석사)
- 1995년 2월 : 동국대학교 사범대학 (가정학박사)
- 2002년 8월 ~ 현재 : 한국농업대학 부교수

<관심분야>

기능성식품, 임상영양

채 희 정(Hee-Jeong Chae)

[정회원]



- 1989년 2월 : 서울대학교 화학공학과 (공학사)
- 1991년 2월 : 서울대학교 화학공학과 (공학석사)
- 1995년 2월 : 서울대학교 화학공학과 (공학박사)
- 2000년 3월 ~ 현재 : 호서대학교 자연과학대학 식품생물공학과 부교수

<관심분야>

기능성식품, 생물공학