

GC/MSD를 이용한 콩나물에서의 Indole-3-acetic acid 분석

이자영 · 한일근 · 이상윤 · 허우덕* · 여익현†

플루윈식품(주) 기술연구소

*한국식품개발연구원 식품분석실

(1995. 4. 10. 접수)

Analysis of Indole-3-acetic acid from bean sprouts by GC/MSD

Jayoung Lee, Ilkeun Han, Sangyun Lee, Woodeck Hawer*, Ikhyun Yeo†

R & D center, Pulmuone, Co., Ltd., Seocho-dong, Seocho-ku, Seoul 137-070, Korea

*Korea Food Research Institute, Sungnam, 463-420, Korea

(Received Apr. 10, 1995)

요약 : 간단한 용매추출 조작에 의한 콩나물에서의 Indole-3-acetic acid(IAA) 분석에 관하여 연구하였다. 콩나물 재배시 성장촉진제로 사용되는 인돌비액제의 주성분인 IAA의 추출은 80% Acetone 100ml와 Methanol 50ml 혼합 용액으로 하였으며, 추출·농축된 시료를 14% BF₃/methanol로 methyl ester화하여 GC/MSD로 분석하였다. 본 분석방법의 회수율은 약 80%로서 우수하였으며, 이 분석방법을 이용하여 시중에 유통중인 포장 콩나물에서의 IAA 분석을 시도하였다.

Abstract : A gas chromatographic analytical method for IAA was developed. IAA was extracted with 80% acetone & methanol. Sample was macerated with 80% acetone & methanol to extract IAA. After filtration, the solvent was removed and residual IAA was esterified with 14% BF₃/MeOH. The IAA esters can be easily separated with intermediate polar column.

Key words : Indole-3-acetic acid(IAA), Methyl ester, Bean sprouts, GC/MSD

1. 서론

콩나물은 우리나라의 전통식품으로 오랜 기간 우리 식탁의 중요한 음식으로 이용되어 왔으며, 그 소비도 꾸준히 증가하고 있다.^{1,2} 콩나물은 영양학적으로도 우수한 식품 중의 하나이다. 특히 콩나물에는 콩에서는 존재하지 않던 비타민 C가 16mg/100g이나 생성되어 존재하고 그밖에도 레시틴, 사포닌, 비타민 B 등이 함유되어 있으며, linoleic acid, linolenic acid 등의 필수 지방산도 함유되어 있다.³ 콩나물의 소비가 많지 않던 과거에는 주로 가정에서 직접 키워 이용하던 것이, 점

차 소비가 증가됨에 따라 대도시를 중심으로 본격적인 콩나물 재배 업소가 생겨나기 시작했다. 특히 근래에는 위생적인 측면을 강조한 포장콩나물이 등장하였으며, 판매량도 점차로 늘고 있는 실정이다. 이것은 양보다 질, 위생적인 식품, 안전한 식품을 섭취하고자 하는 소비자의 욕구에서 비롯된 현상으로 앞으로 이러한 소비욕구는 끊임없이 증가할 것으로 생각된다.

콩나물의 재배시 종자소독 등 부패방지를 위해 톱신·엠, 베노밀 등을 사용하고 있으나 이들은 인체에 매우 유해한 것으로 알려져 있다. 이들은 재배기간 중의 부패방지 효과 뿐만 아니라 재배 후의 보존성에도 어느

정도 영향을 미치는 것으로 나타나 있다.^{4~8} 그리고 성장촉진을 위해 사용되는 약제 중에 plant hormone인 Indole-3-acetic acid(IAA)를 주성분으로 하는 인돌비액제가 있다.⁹ 인돌비액제는 콩나물에 사용이 허가된 유일한 약제이며 주성분인 IAA는 오이의 덩굴손 등 식물체 중에 존재하는 성장 hormone으로서 화학적으로는 아미노산인 tryptophan과 유사하며, 식물체에서 tryptophan으로부터 합성된다.¹⁰ 하지만 이 약제의 경우 사용이 허용된 농약으로 분류되어 있음에도 불구하고 제품에 잔류 허용기준이 없기 때문에 재배업자들이 이런 점을 이용하여 적정 사용량보다 많은 양을 사용할 가능성이 없지 않다.

식물이나 토양, 수질에 잔류되어 있는 농약들에 대한 분석방법 등에 관련된 연구는 수없이 보고된 바 있다. 인돌비액제의 주성분인 IAA의 경우도 분석법 등과 관련한 연구보고가 많이 있었으나 식물성장 hormone으로서가 아닌 농약의 관점에서 다른 연구보고는 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다. 기존에 발표된 IAA 분석과 관련한 보고에서는 주로 μ -Bondapak C₁₈ column을 이용하여 High performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하는 방법이 주종을 이루었으나, 최근에 와서는 Gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS)를 이용한 분석법에 관한 연구도 발표되었다.^{11~13} James R. Dunlap & Gene Guinn이 보고한 『tryptophan의 대사산물로서의 IAA의 분석』이나, J. M. Tusell, F. Artigas 등이 발표한 『cotton floral buds에서의 IAA 분석』 등이 그것이다. 본 연구에서는 이미 보고된 바 있는 여러 가지 IAA 분석법을 수정·보완하여 보다 간편한 IAA 분석법을 새롭게 설정하였다. IAA 분석은 추출·세정·유도체화의 전처리 과정을 거쳐 GC-MSD를 이용하여 분석한다. IAA는 그 자체로는 GC상에서의 검출능이 좋지 않을 뿐 아니라 낮은 농도에서는 검출이 되지 않는 경향이 있기 때문에 추출된 시료를 유도체화하여 분석하였다. 추출·농축된 시료는 diazomethane이나 14% BF₃/methanol을 이용하여 methylation하게 된다. J. D. Cohen¹⁴ 등이 보고한 『diazomethane을 이용한 methylation에 의한 IAA의 미량정량법』 등 지금까지의 IAA 분석법에 이용된 methylation은 diazomethane을 이용한 방법이 대부분이었으나 본 연구에서는 14% BF₃/methanol을 이용한 AOAC법에 의한 met-

hylation¹⁵을 적용하여 분석하였다. 그리고 최종적으로는 보다 간편한 methylation 방법을 설정하였다. 즉, 냉각관을 이용하여 수욕조 안에서 반응시키는 방법에서 heating block을 이용하여 간편하게 유도체화할 수 있도록 하였다. 지금까지의 IAA 분석법을 응용하여 콩나물 중의 IAA 분석법을 새롭게 개발함으로써 분석 전처리 시간을 단축할 수 있었으며, 80% 이상의 좋은 회수율을 확인하였고, 재현성 또한 우수한 것으로 나타났다.

2. 재료 및 방법

2. 1. 기기 및 시약

인돌비액제 살포시 최종 제품의 잔류도를 알아보기 위해 콩나물은 Oksan Living Co.(한국)의 콩나물 재배기를 사용하였으며, 용수의 수주는 자동으로 전원을 조정하는 Theben timer 026(독일)을 이용하였다. 재배시 첨가된 인돌비액제는 시중에서 현재 판매·사용되고 있는 제품을 사용하였다. 재배완료된 콩나물 중의 Indole-3-acetic acid의 분석은 Hewlett Packard사(미국)의 HP 5890 series II gas chromatograph(GC)에 HP 5971 Mass Selective Detector가 direct interface로 연결된 GC-MSD를 사용하였다. GC column은 역시 HP 제품인 PAS-1701(25m×0.32mm×0.25 μ m) column을 사용하였으며, splitless injection으로 인한 peak의 영향을 줄이기 위해 oven의 초기온도를 사용 용매인 heptane의 비등점(98℃)보다 낮은 60℃에서 승온하였다. 시료의 전처리 과정에 사용된 모든 용매는 HPLC grade를 사용하였고 IAA 표준품 및 sodium sulfate anhydrous, sodium chloride 등은 모두 ACR grade의 제품을 사용하였다.

2. 2. IAA 분석

Indole-3-acetic acid는 그 자체로도 GC/MSD에서 분석되나 매우 낮은 감도를 나타내었기 때문에 추출·농축된 IAA를 methylation하여 분석하였다. 먼저 시료의 전처리 과정을 보면 시료 20g을 정밀히 취하고 80% Acetone 100ml(v/v)와 Methanol 50ml를 가하여 mixer를 이용하여 homogenizing한 후 약 10분간 shaking하여 추출하고 감압하에서 여과하였다. 그런 다음 0.05N NaOH/methanol 7ml를 첨가하여 36℃

vacuum evaporator에서 Acetone과 Methanol을 제거하였다. 이 때 시료용액에는 수분이 다량 존재하므로 vacuum 압력이 너무 높으면 시료용액이 끓어 넘치기 쉽기 때문에 주의해야 한다. 농축이 끝난 시료용액에 Ethyl acetate 50ml를 가하여 가볍게 흔들어 세정하고 1N HCl을 이용하여 pH 3으로 하였다. pH 3으로 맞춰진 시료용액에 Diethyl ether 50ml씩으로 3회 추출하여 추출용액을 합친 후 Na_2SO_4 10g을 가하여 가볍게 흔들면서 약 1시간 정도 방치한다. 수분이 제거된 추출액을 여과한 후 36°C vacuum evaporator에서 농축한 후 methylation하였다. Methylation은 지방산 분석에 자주 이용되는 유도체화 방법으로서 예전에는 diazomethane을 이용하는 방법을 많이 사용하였으나, diazomethane의 위험성으로 인하여 14% BF_3 /methanol을 이용하여 유도체화하는 AOAC method를 많이 이용한다.¹⁶⁻¹⁸ Methylation 과정은 추출·농축된 시료를 12ml vial에 옮긴 후 0.5N NaOH/methanol 1ml와 14% BF_3 /methanol 1ml를 넣고 65°C heating block에서 12분간 반응시켰다. 그런 다음 n-heptane 1ml를 가하여 3분간 반응시킨 후 곧바로 냉각하였다. 반응이 끝난 시료에 포화식염수 5ml를 가하고 n-heptane 4ml를 가하여 층분리한 후 5ml로 정용하여 GC/MSD로 분석하였다. 이 때 분석에 사용된 기기조건은 Table 1과 같다.

2. 3. 회수율실험 및 제품분석

새롭게 설정된 IAA 분석법에 대하여 콩나물에서 추

출 정도를 알아보기 위한 회수율실험을 실시하였고, 재배된 콩나물 중의 IAA 분석을 실시한 후 유통중인 콩나물에 대한 분석을 실시하였다. 회수율실험은 먼저 5ppm 농도로 희석한 표준용액 100 μ l를 콩나물 20g에 첨가하여 shaking하며 1시간 정도 방치한 후, 분석 조건에 따라 시료를 전처리하여 GC/MSD로 분석하였다. 이렇게 하여 얻어진 IAA 표준물질 peak와 시료 중의 IAA peak의 면적비로 회수율을 구하였다. 인돌비액제를 살포하여 재배한 콩나물에서의 IAA 잔류 분석을 위하여 당 실험실에서 직접 인돌비액제를 살포하여 콩나물재배¹⁾를 실시하였다. 실험구간은 사용 권장량²⁾ 살포구간 및 사용 권장량의 5배 살포구간, 그리고 대조군으로서 무첨가구간으로 나누어 재배하였고 재배 완료된 최종 제품에 대하여 IAA 잔류도 분석을 실시하였다. 유통중인 콩나물의 분석은 4개 회사의 포장콩나물을 백화점에서 구입하여 분석하였고 그밖에도 일반 유통되는 콩나물을 슈퍼마켓에서 구입하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 콩나물에서의 IAA 분석법 설정

HPLC나 GC를 이용한 분석법을 수정 보완하여 간단한 용매추출과 heating block을 이용한 methylation을 행한 후 GC-MS-D Sim(Selective ion monitoring) mode를 사용하여 분석하는 방법을 설정하였다. 본 분석방법에 따라 분석한 IAA 표준물질의 methyl ester

Table 1. GC/MSD operating conditions

| |
|---|
| Instrument : HP 5890 series II gas chromatograph |
| Detector : HP 5971 mass selective detector |
| Column : HP PAS-1701(0.32 mm ID×25 m). |
| Temperature : Injection port 220°C |
| MSD transfer line 300°C |
| Oven 60°C(0.5 min) -30°C/min -120°C(5 min) -4°C/min -200°C(5 min) |
| Carrier gas : Helium |
| Inlet pressure : 12 psi |
| Injection vol. : 2 μ l splitless injection |

1) 콩나물재배 : 콩나물생산 공정은 일반적으로 원료 콩의 수세→칩지→재배→제품→세척의 단계로 되어 있다. 재배과정은 약 7일로서 1일 5~6회 깨끗한 물로 수주하여야 하며, 일정한 온도와 습도를 유지하여야 한다.

2) 사용 권장량 및 살포방법 : 농약공업협회발행 농약사용지침서 참조(참고문헌 9.)

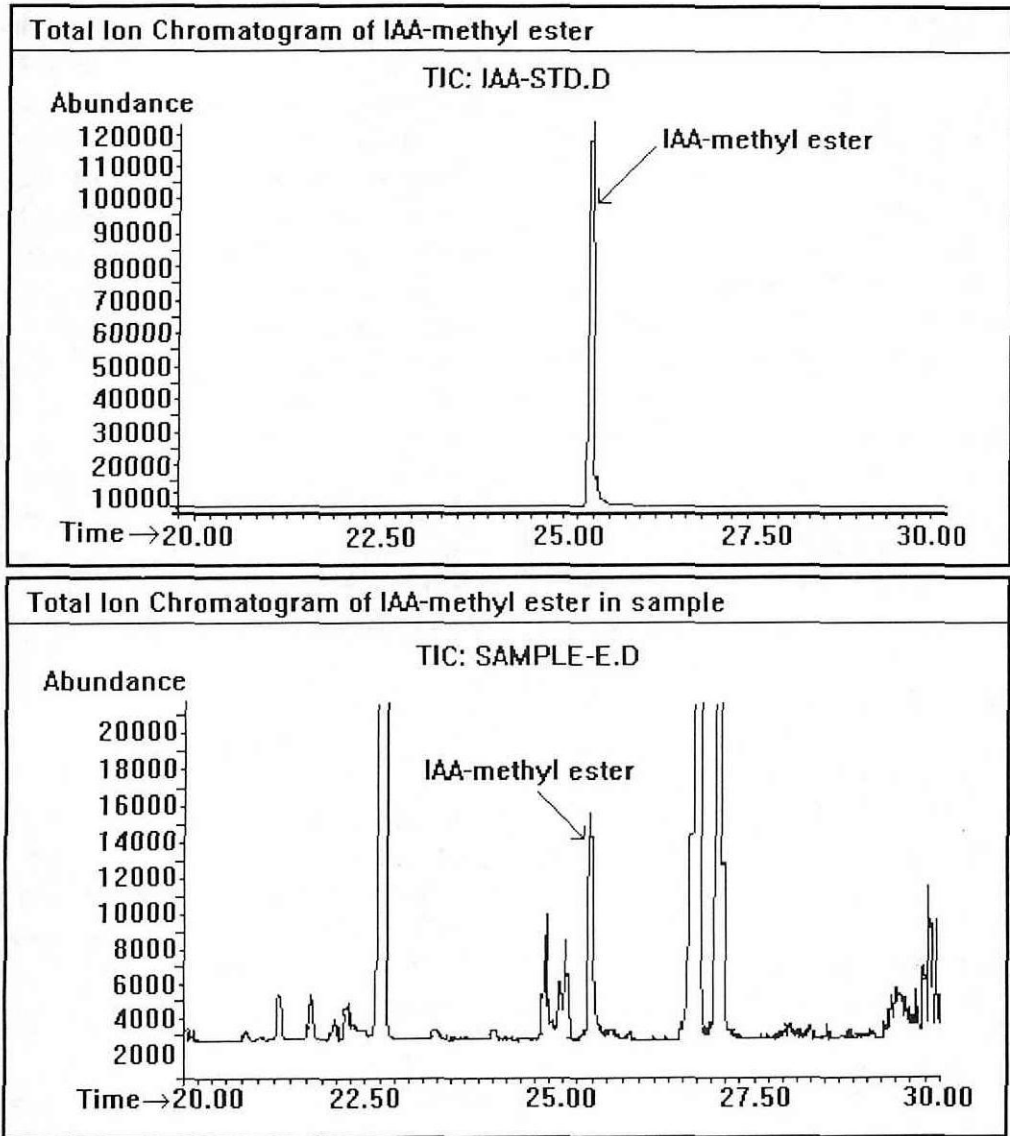


Fig. 1. Total Ion Chromatogram of IAA standard & sample

유도체와 전처리된 시료의 total ion chromatogram 및 IAA methyl ester의 mass spectrum은 Fig. 1과 Fig. 2에 잘 나타나 있다. GC/MSD sim mode로 분석한 시료 중의 IAA methyl ester peak의 mass spectrum에서 보듯이 base peak인 m/z 130 [m -COO- CH_3]을 비롯하여 77 [C_6H_5], 102 [m - CH_2 -COO- CH_3 -N], 146 [m -CO- CH_3], 189 [m]을 target ion으로 이용하였다.

이 분석방법은 시료전처리가 간단하였고, 추출·농

축된 시료의 methylation 과정에서 diazomethane의 사용을 배제하고 0.5N NaOH/methanol과 촉매제로서 14% BF_3 /methanol을 이용하였으며, 따라서 폭발성이 높은 diazomethane을 사용함으로써 생길 수 있는 위험을 제거하였다. 또한 14% BF_3 /methanol을 이용한 AOAC법에 의한 methylation에서는 수욕조와 냉각관을 이용하기 때문에 한번에 2~3개의 시료밖에 처리할 수 없는 단점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 시료전처리 방법 뿐만 아니라 유도체화 과정에 있어서

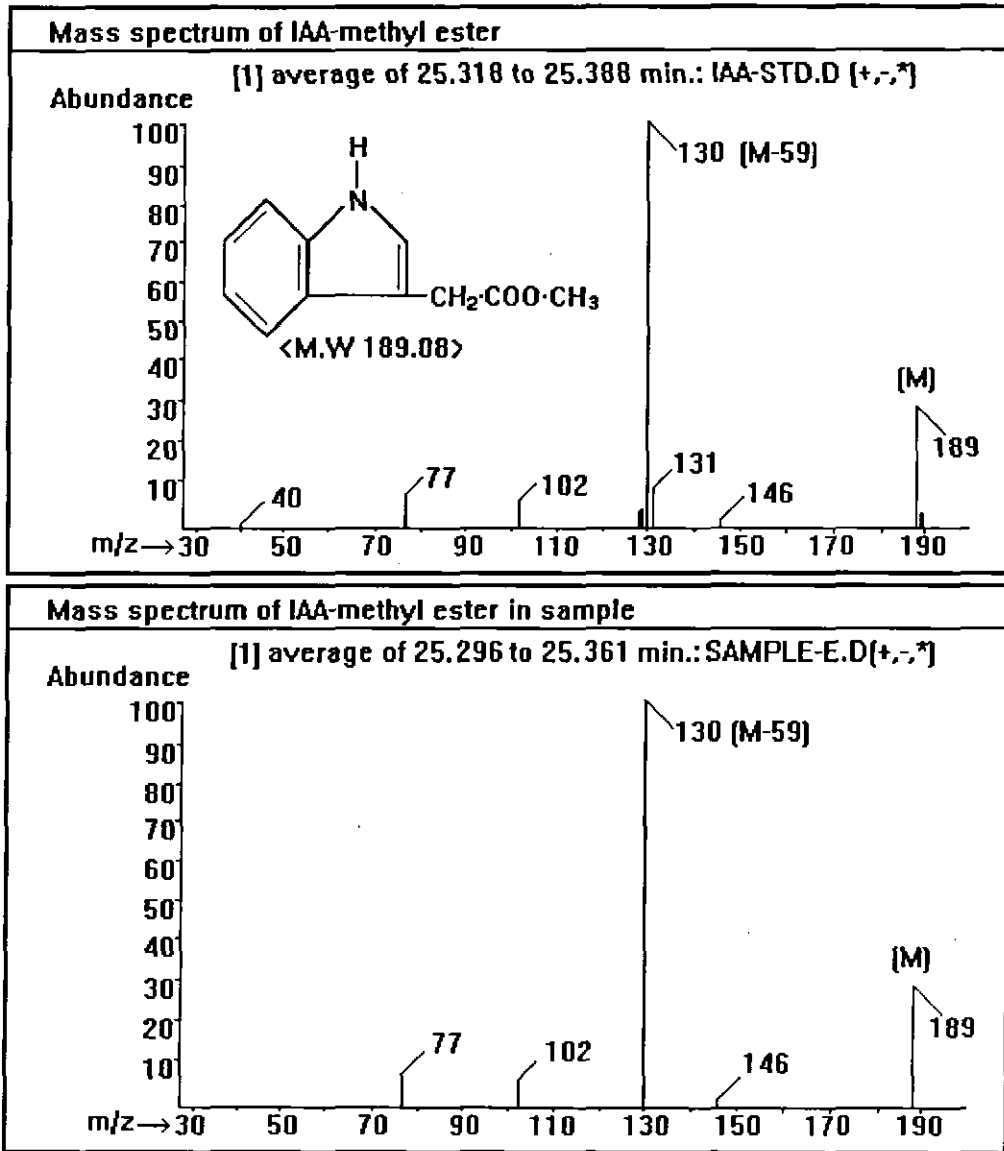


Fig. 2. Mass spectrum of IAA methyl ester in standard & sample

기존의 AOAC 법에 의한 methylation을 응용하여 heating block에서 간편하게 유도체화할 수 있는 방법을 설정하였으며, 많은 시료의 분석을 동시에 진행할 수 있었다. 또한 시료전처리 과정 중 세정과정이 있는데, 사용 용매에 따라 회수율과 세정효과에 큰 차이를 보였다. 세정용매를 각각 Chloroform과 Ethyl acetate를 사용하여 전처리한 후 분석한 결과를 보면 Chloroform으로 세정하였을 때 unknown peak의 면

적이 Ethyl acetate를 사용한 것에 비하여 150~400% 높게 나타난 반면 IAA peak의 면적은 67%(회수율 53%)밖에 되지 않았다. 이렇듯 Chloroform이나 Petroleum Ether를 이용하여 추출용액을 세정하였을 때 회수율이나 세정효과도 좋지 않았을 뿐만 아니라 심한 유화현상으로 인하여 용매간의 분리도 잘 되지 않았고 Ethyl acetate를 사용하는 것이 유리하였다. IAA는 물용해도가 낮으나 pH의 변화에 따라서 유기용매층보

다는 오히려 물층에 잔존하는 성질을 갖고 있기도 하다. 또한 pH가 낮을 때 유기용매에 잘 용해되기 때문에 pH 3인 상태에서 Diethyl ether를 이용하여 추출함으로써 시료로부터 추출효율을 높이고자 하였다.

GC/MSD 분석시 HP PAS-1701 column을 사용하였는데, HP Ultra I이나 Ultra II column에 비하여 간섭 peak의 영향을 적게 받았다. 진처리된 시료를 GC/MSD상에서 scan mode로 분석이 가능한가를 확인하였는데, 서론에서 기술했듯이 IAA는 GC상에서 감도가 좋지 않았을 뿐 아니라 낮은 농도에서는 mass spectrum scan mode로 분석이 불가능하였다. 따라서 지정된 특정 ion에 높은 감응을 나타내는 GC-MSD SIM(selective ion monitoring) mode로 모든 분석을 진행하였으며, 이 때 이용된 target ion들은 위에서 언급되었듯이 77 [C_6H_5], 102 [$m-CH_2-COO-CH_3-N$], 130 [$m-COO-CH_3$], 146 [$m-CO-CH_3$], 189 [m]이었다.

3. 2. 회수율실험 및 제품분석결과

IAA 분석방법에 대한 회수율은 평균 80.3%로서 우수하였으며, standard deviation은 ± 1.52 로서 재현성 또한 우수하였다. 유통중인 콩나물에서의 IAA 분석결과는 Table 2에 잘 나타나 있다. 유통중인 콩나물에서의 IAA 분석은 먼저 0.01, 0.1, 1.0ppm으로 제조한 IAA 표준물질의 methyl ester 유도체를 만들어 GC로 분석하여 각각의 peak 면적으로 검량곡선을 작성한 후 시료를 분석하였다. 유통중인 콩나물의 분석결과 (Table 2)를 보면 먼저 포장콩나물로서 4개사 제품(A, B, C 및 D 시료)을 수거하여 분석하였는데, 그 중 1개사의 콩나물 시료에서 0.23ppm 검출되었다. 일반유통 콩나물(E 시료)은 슈퍼마켓에서 3차례 수거하여 분석하였는데, 그 결과 3차례 모두 IAA의 함유 범위가 E 시

Table 2. Results of IAA residue in bean sprouts

| (mg/kg) | | | | | |
|-----------------------|-----|----|------|----|---------|
| Sample | A | B | C | D | E |
| Amount of IAA residue | *ND | ND | 0.23 | ND | 0.2~0.3 |

*ND : Not detected, detection limit = $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$

Table 3. Results of IAA residue at cultivated bean sprouts with IDB* (mg/kg)

| Sample | *IDB adding ($\times 1$) ^a | *IDB adding ($\times 5$) ^b | Control |
|-------------|---|---|---------|
| IAA residue | 0.01 | 0.1~0.25 | ND |

*IDB : 인돌비액제

a. 인돌비액제 사용 권장량 살포

b. 인돌비액제 사용 권장량의 5배 살포

료에서 보여준 바와 같다. 유통중인 콩나물에서 검출된 IAA 잔류량은 인돌비액제 살포 재배실험 결과 (Table 3)와 비교하면 약 5배 이상의 인돌비액제를 사용하여 재배하였을 때 최종 제품에 잔류하는 양과 비슷하였다. 위와 같은 결과로 볼 때 일반유통 콩나물이나 포장콩나물에서 적정 사용량을 무시하고 너무 많은 양의 약제를 사용하였을 가능성도 있다고 생각된다.

3. 3. 콩나물에 살포된 IAA 잔류 분석

콩나물의 재배중 첨가된 인돌비액제의 잔류량을 살펴보았다. 인돌비액제의 잔류량은 인돌비액제의 주성분인 IAA의 분석을 통해 알아보았고, IAA의 분석은 새로이 설정한 분석법에 따라 실시하였으며, 그 결과는 Table 3에 수록하였다. Table 3에서 보듯이 정상 첨가군과 5배 첨가군의 최종 잔류량은 각각 0.01, 0.1~0.25mg/kg으로서 총 첨가량인 40, 200mg/kg의 약 1/2000 정도로서 대부분 재배중에 소실되는 것을 알 수 있었다. 5배 첨가군의 최종 잔류 분석 결과는 0.1~0.25mg/kg이었으며 대량생산하는 실제 현장조건에서는 훨씬 더 적은 양이 잔류할 것으로 예상된다. 이러한 결과로 볼 때 Table 2에서처럼 일반유통 콩나물과 C사의 포장콩나물에서 0.2~0.3mg/kg 정도의 IAA가 검출되었다는 것은 인돌비액제의 사용 권장량보다 훨씬 많은 양을 사용하였기 때문이라 생각된다. 실제 시중 콩나물을 구입하였을 때 지나치게 노란색을 띠며 굵고 긴 줄기와 자엽부 사이에 싸이 자라나 있는 것을 보면 지나치게 많은 양의 약제를 사용하였음을 짐작할 수 있다.

4. 결론

4. 1. 분석법 설정

새롭게 개발한 콩나물 중 IAA 분석법은 이미 알려진 HPLC법이나 GC법에 비하여 간단하고 신속하게 처리할 수 있었으며, 유도체화 과정에서도 diazomethane의 사용을 배제하고 14% BF₃/methanol을 이용한 heating block에서의 간단한 methylation 방법을 개발하여 신속하게 실험을 진행할 수 있었다. 또한 80% 이상의 우수한 회수율과 재현성을 나타내었다.

4. 2. 재배실험 및 유통 콩나물의 수거분석

인돌비액제를 이용한 콩나물재배 실험결과와 유통 중인 콩나물의 IAA 분석결과를 비교해 보았다. 유통 중인 포장콩나물은 대부분 이상 없었으나 IAA가 검출된 일부 포장콩나물과 일반유통되는 콩나물은 인돌비액제를 이용한 재배 실험결과에서 알 수 있듯이 비교적 많은 양의 약제가 사용되었을 가능성이 있다고 생각된다. 인돌비액제는 콩나물에 사용이 허용되어 있고, 그 주성분인 IAA는 식물체에 존재하는 plant hormone 성분이지만 콩나물의 외관이나 보존성 등을 향상시키기 위한 인돌비액제의 무분별한 사용은 규제되어야 한다.

참고문헌

1. 이성우, 韓國料理文化史, p. 286, 敎文社, 1990.

2. 유태중, 食品年監, p. 349, 文運堂, 1990.
3. 森 雅 央, 調理科學, 11(3), 167~171(1978).
4. 한일근, 채정영, 이자영, 여익현, 分析科學, 7(3), 395~402(1994).
5. C. H. Liu, G. Maltern, X. Yu and J. Rosenu, *J. Agri. Food. Chem.*, **38**, 167~171(1990).
6. G. Tjan and J. Jansen, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**(4), 769~773(1979).
7. S. Cline, A. Felsot and L. Wei, *J. Agri. Food. Chem.*, **29**(5), 1087~1088(1981).
8. R. Bushway and S. Savage, *Food. Chem.*, **35**, 51~58(1990).
9. 農藥工業協會, 農藥使用指針 92, p. 533, 1992.
10. 강영희 외, 植物生理學(翻譯書), p. 386, 아카데미, 1991.
11. J. R. Dunlap and G. Guinn, *J. Plant Phys.*, **90**(1), 197~201(1989).
12. A. Rodriguez and R. Sanchez Tames, *J. Anal. Biochem.*, **146**(1), 184~190(1985).
13. J. M. Tusell, F. Artigas, C. Sunol, E. Martinez and E. Gelpi, *J. Chromatogr.*, **306**, 338~344(1984).
14. J. D. Cohen, *J. Chromatogr.*, **303**, 193~196(1983).
15. *J. of AOAC.*, 15th Edition, p. 957. 964~965(1990).
16. W. R. Morrison and L. M. Smith, *J. Lipid res.*, **5**, 600(1964).
17. L. D. Metcalfe, A. A. Schmitz and J. R. Pelka, *Anal. Chem.*, **38**, 514(1966).
18. O. S. Edron and A. Nowony, *Anal. Chem.*, **35**, 370(1963).