



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

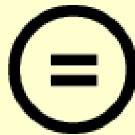
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

생활과학석사학위논문

결사슬 구조가 다른 글루코시놀레이트를  
섭취한 흰 쥐의 혈중 대사체 분포 측정

Determination of Goitrogenic Metabolites in the  
Serum of Male Wistar Rat Fed Structurally  
Different Glucosinolates.

2014 년 8 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

최 은 지

결사슬 구조가 다른 글루코시놀레이트를  
섭취한 흰 쥐의 혈중 대사체 분포 측정

Determination of Goitrogenic Metabolites in the  
Serum of Male Wistar Rat Fed Structurally  
Different Glucosinolates.

지도교수 권 훈 정

이 논문을 생활과학석사 학위논문으로 제출함  
2014년 4월

서울대학교 대학원  
식품영양학과  
최 은 지

최 은 지의 생활과학석사 학위논문을 인준함  
2014년 6월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 국 문 초 록

글루코시놀레이트 (glucosinolate)는 십자화과 식물에 다량 함유되어 있는 이차대사산물로 갑상선에 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 글루코시놀레이트의 체내 흡수에 관한 연구를 살펴보면 대부분이 organic isothiocyanates를 경구투여 하거나, 식물체 내 myrosinase와 함께 다양한 글루코시놀레이트가 포함된 식물체를 투여하였다. 따라서 개별적 글루코시놀레이트의 흡수 및 대사를 예측하는데 어려움이 있다. 본 연구에서는 랫드 (rat)에 순수하게 분리한 4종의 글루코시놀레이트 (sinigrin, progoitrin, glucoerucin, glucotropaeolin)를 경구투여 하였으며, 글루코시놀레이트가 반갑상선 영향을 미치는 분해산물로 대사되는지 확인하기 위해 thiocyanate ion, cyanide ion, organic isothiocyanates, organic nitriles, organic thiocyanates의 농도를 혈청에서 측정하였다. Thiocyanate ion은 비색법으로 측정하였으며, cyanide ion은 CI-GC-MS를 사용하여 측정하였다. Organic isothiocyanates와 그 대사체는 cyclocondensation assay로 측정하였다. Organic nitriles와 organic thiocyanates는 EI-GC-MS를 사용하여 측정하였다. Progoitrin군을 제외한 모든 군에서 대사산물 중 thiocyanate ion의 농도가 가장 높게 측정되었다. Progoitrin군에서는 organic isothiocyanates (goitrin)가 가장 높은 농도로 검출되었다. Glucoerucin군에서는 갑상선종발생에 영향을 미치는 물질의 생성이 상대적으로 적은 편이었다. 본 연구에서 측정한 투여 5시간 내

글루코시놀레이트는 대부분 최종분해산물인 thiocyanate ion으로 대사되는 것이 확인되었으며, 글루코시놀레이트 결사슬 구조에 따라 thiocyanate ion 생성량이 다양한 것으로 관찰되었다. 결사슬 구조가 안정한 탄소 양이온을 형성할 수 있는 경우에 글루코시놀레이트의 분해가 촉진되어 갑상선종발생에 영향을 미치는 thiocyanate ion의 생성 또한 증가하는 것으로 보인다. 뿐만 아니라 식물체 내 myrosinase의 작용 없이 갑상선종발생에 영향을 미치는 대사체가 형성될 수 있으므로, 조리 과정에서 발생하는 식물체 내 myrosinase 불활성화는 십자화과 식물에 포함된 글루코시놀레이트의 반영양적 효과에 영향을 주지 않을 것으로 사료된다. 특히 sinigrin과 progoitrin의 경우 국내 섭취량이 높은 편인데 가공조건을 거친 후 섭취 시 여전히 갑상선종 발생 물질의 생성 가능성이 상당하므로, 이들에 의한 반갑상선 영향을 줄이기 위해 가공 및 조리법 개선에 대한 연구가 필요할 것이다.

주요어: 글루코시놀레이트, 갑상선종발생성의 대사체, 티오시아나산 음이온, 고이트린, 갑상선

학번: 2012-23548

# 목차

|  |     |
|--|-----|
| 국문초록.....  | i   |
| 목차.....  | iii |
| List of tables.....  | v   |
| List of figures.....   | vi  |
| I. 서론.....   | 1   |
| II. 문헌고찰.....  | 4   |
| II.1. 글루코시놀레이트의 특성.....                                      | 4   |
| II.2. 글루코시놀레이트 분해산물의 생성.....                                 | 6   |
| II.3. 글루코시놀레이트의 체내 분해 및 흡수.....                              | 9   |
| II.4. 글루코시놀레이트의 체내 효과.....                                   | 12  |
| III. 재료 및 방법.....  | 17  |
| III.1. 실험 재료.....  | 17  |
| III.1.1. 시료.....   | 17  |
| III.1.2. 시약 및 기기.....  | 20  |
| III.2. 실험 방법.....  | 23  |
| III.2.1. 글루코시놀레이트의 추출 및 분리.....                              | 23  |
| III.2.2. 동물실험.....   | 25  |
| III.2.3. 혈청 내 글루코시놀레이트 대사산물 분석.....                          | 26  |
| III.2.3.1. Thiocyanate ion 정량 분석.....                        | 26  |
| III.2.3.2. Cyanide ion 정량 분석.....                            | 27  |
| III.2.3.3. Organic isothiocyanates 정량 분석.....                | 28  |
| III.2.3.4. Organic nitriles, organic thiocyanates 정량 분석..... | 29  |

|  |    |
|--|----|
| III.2.4. 글루코시놀레이트 투여에 따른 갑상선 호르몬 변화..... | 31 |
| III.2.5. 혈액 생화학적 검사.....                 | 31 |
| III.2.6. 통계분석.....                       | 31 |
| IV. 결과 및 고찰.....                         | 32 |
| IV.1. 글루코시놀레이트의 추출 및 분리.....             | 32 |
| IV.2. 혈청 내 글루코시놀레이트 대사산물 분석.....         | 36 |
| IV.3. 글루코시놀레이트 투여에 따른 갑상선 호르몬 변화.....    | 45 |
| IV.4. 장기 중량 측정 및 혈액 생화학적 검사.....         | 47 |
| V. 요약 및 결론.....                          | 49 |
| VI. 참고문헌.....                            | 51 |
| Abstract.....                            | 60 |

## List of tables

|   |    |
|---|----|
| Table 1. Biological effects of glucosinolates on animals.....                                 | 13 |
| Table 2. Selected glucosinolates and their breakdown products.....                            | 18 |
| Table 3. Abundant sources of selected glucosinolates.....                                     | 19 |
| Table 4. Glucosinolate metabolites in rat serum.....  | 37 |
| Table 5. Serum T <sub>3</sub> and T <sub>4</sub> levels of rats treated with glucosinolates.. | 46 |
| Table 6. Serum biochemistry of rats treated with glucosinolates.....                          | 48 |



## List of figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Glucosinolate hydrolysis and the formation of GLS-BPs.....          | 8  |
| Figure 2. Chromatogram and mass spectrum of isolated progoitrin....           | 33 |
| Figure 3. Chromatogram and mass spectrum of isolated glucoerucin..            | 34 |
| Figure 4. Chromatogram and mass spectrum of isolated glucotropaeolin<br>..... | 35 |
| Figure 5. Glucosinolate metabolites in rat serum.....                         | 38 |

# I. 서론

글루코시놀레이트 (glucosinolate)는 배추, 브로콜리, 겨자와 같은 십자화과 식물에 다량 함유되어 있는 이차대사산물로 thioglucoside의 일종이다 (Fahey et al., 2001). 글루코시놀레이트는 식물체에 자극이 가해지지 않을 경우 안정한 상태지만, 식물체 조직이 손상될 경우 방출되어 myrosinase ( $\beta$ -thioglucosidase)에 의해 효소적 가수분해가 일어난다 (Cottaz et al., 1996). 이때 pH, 온도 등 가수분해 조건과 글루코시놀레이트의 결사슬 구조에 따라 생성되는 글루코시놀레이트 분해산물의 종류와 조성이 달라지는데 organic isothiocyanates, organic nitriles, organic thiocyanates, thiocyanate ion 등이 이에 해당한다 (Fenwick et al., 1982, Fenwick and Heaney, 1983, Cole, 1976).

글루코시놀레이트는 일반적으로 식품의 가공, 섭취 시의 저작 운동, 그리고 소화 과정에서 myrosinase에 의해 가수분해 되어 글루코시놀레이트 분해산물이 생성된다 (Fenwick et al., 1982, Shapiro et al., 2001). 특히 소화 과정 중 펩신 HCl과 대장의 장내 균총은 글루코시놀레이트 분해산물이 생성되는데 중요한 역할을 한다 (Maskell and Smithard, 1994). 글루코시놀레이트 분해산물은 분배계수 값이 높고 분자량의 크기가 작은 편이어서 체내로 빠르게 흡수되는데 모든 분해산물이 동일한 흡수율을 가지지는 않는다. 글루코시놀레이트의 체내 흡수에 관한 연구를 살펴보면 organic isothiocyanates의 흡수율이 결사슬 구조에 따라 달라진다는 것을 알 수 있다. 그러나 이처럼 대부분의 연구가 organic isothiocyanates를 경구투여 하거나, 식물체 내 myrosinase와 함께 다양한 글루코시놀레이트가 포함된 식물체를 투여하여 흡수량을 분석하였다

(Slominski et al., 1988, Slominski et al., 1987, Mennicke et al., 1987, Conaway et al., 1999). 따라서 개별적 글루코시놀레이트의 흡수 및 대사를 예측하는데 어려움이 있다.

채종박을 투여한 동물실험에 따르면, 실험 결과 갑상선의 무게가 증가하고, 갑상선 호르몬의 수준이 감소하며, 간과 신장 기능에 이상이 발견되었는데, 이는 글루코시놀레이트 대사산물에 의해 발생한 것으로 보여진다. 글루코시놀레이트 분해산물 중 goitrin과 organic nitriles는 갑상선종발생에 영향을 미치는 물질로 알려져 있다. 이들은 갑상선의 요오드 이온 흡수를 감소시켜 갑상선의 크기가 증가하고, 갑상선 호르몬의 수준이 감소하는데 관여한다 (Heaney and Fenwick, 1995). 뿐만 아니라 thiocyanate ion은 갑상선으로 유입된 요오드 이온이 방출되는 속도를 증가시켜 갑상선 호르몬의 합성을 저해한다. 또한 고농도의 thiocyanate ion은 갑상선 호르몬 합성과정 중 요오드의 유기화를 저해시킴으로써 갑상선 호르몬의 합성을 방해한다 (Erdoğan, 2003).

선행연구에 따르면, 손상된 식물체 조직으로부터 다양한 글루코시놀레이트 분해산물들이 발견되었다. 그러므로 생체 내에서 글루코시놀레이트의 결사슬 구조에 따라 생성되는 대사산물의 흡수, 분포, 생리학적 효과 또한 달라질 것으로 보인다. 그러나 생체 내의 글루코시놀레이트 대사와 관련된 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내에서 다량 소비되는 글루코시놀레이트를 구조에 따라 분류하여 총 4종의 글루코시놀레이트를 선정하였다. 그리고 각각의 글루코시놀레이트를 Wistar rat에 경구투여 한 뒤 글루코시놀레이트가 반갑상선 영향을 미치는 분해산물로 대사되는지 확인하기 위해 흡수된

대사산물의 농도 (thiocyanate ion, cyanide ion, organic isothiocyanates, organic nitriles, organic thiocyanates)를 혈청에서 측정하였다. 이를 통해 결사슬 구조에 따른 글루코시놀레이트의 흡수 및 대사를 비교하고자 한다.

## II. 문헌고찰

### 1. 글루코시놀레이트의 특성

글루코시놀레이트 ( $\beta$ -thioglycosides N-hydroxysulfates)는 황이 결합된  $\beta$ -D-glucopyranose와 함께 결사슬 구조를 가지는 물질이다. 결사슬과 화학적 구조에 따라 글루코시놀레이트를 분류하면 120종 이상이 존재하는데, 주로 연구된 글루코시놀레이트는 *Brassica* 속 식물에 많이 함유되어 있는 aliphatic,  $\omega$ -methylthioalkyl, aromatic, heterocyclic 글루코시놀레이트이다. 국내에서 글루코시놀레이트는 주로 십자화과 식물을 통해 섭취된다. 십자화과에는 350개 이상의 속과 3000개 이상의 종이 포함되어 있는데, 그 중에서도 *Brassica* 속이 많이 소비되는 편이다 (Fahey et al., 2001).

글루코시놀레이트는 식물체의 얼얼한 매운 맛을 제공하는 물질로 글루코시놀레이트가 가수분해되어 생성되는 물질에 따라 그 특유의 향과 맛이 형성된다 (Fenwick and Heaney, 1983). 글루코시놀레이트는 매우 안정한 수용성 물질로써 십자화과 식물체 건조 중량의 약 1 %를 차지한다 (Rosa et al., 1997). 십자화과 식물체에서도 뿌리, 잎, 줄기, 씨앗 등 부위에 따라 글루코시놀레이트 함량이 다양한데, 씨앗의 경우 글루코시놀레이트 함량이 10 %까지 증가한다. 이외에도 식물체의 나이, 병원균 감염 여부, 상처 여부 등에 따라 글루코시놀레이트 함량이 달라진다. 식물체는 주로 12 종류 이하의 글루코시놀레이트를 함유하고 있으며, 최대 23 종류의 글루코시놀레이트를 함유하는 경우가 *Arabidopsis thaliana*를

통해 발견되었다 (Fahey et al., 2001).

## 2. 글루코시놀레이트 분해산물의 생성

글루코시놀레이트는 비교적 안정한 상태로 식물체의 액포에 저장되어 있다. 하지만 식품의 가공, 저작운동, 소화운동 중에 식물체에 자극이 가해지면 세포벽과 세포 소기관이 파괴되어 글루코시놀레이트가 방출된다. 이 때 다른 세포 소기관에 존재하던 myrosinase ( $\beta$ -thioglucosidase)도 분비되어 글루코시놀레이트와 접촉하면 가수분해가 시작된다. 따라서 글루코시놀레이트의 당이 떨어지고 불안정한 aglycone (thiohydroxamate-O-sulfonate)이 형성되며, 곧 이어 aglycone의 sulfate기마저 떨어짐으로써 다양한 종류의 분해산물이 생성된다. 글루코시놀레이트 분해산물은 pH, 온도 등 가수분해 조건과 글루코시놀레이트의 구조에 따라 그 종류와 조성이 달라진다 (Holst and Williamson, 2004) (Figure 1).

가수분해 중간 물질로 생성된 aglycone이 Lossen rearrangement를 거치면 organic isothiocyanate가 생성된다. 이는 가수분해 조건상 pH가 중성일 경우 주로 생성되는 물질로 십자화과 식물 특유의 얼얼한 매운맛을 제공한다 (Fenwick and Heaney, 1983). 이 물질은 비교적 안정하지만,  $\beta$ -탄소에 hydroxyl기가 있는 경우 예외적으로 불안정하기 때문에 자연스럽게 고리화가 진행되어 5-vinyl-2-oxazolidinethione (goitrin)이 형성된다. 결사슬 구조가 indole기인 경우에도 불안정하므로 자연적으로 분해되는데, 이 때 thiocyanate ion이 생성되고 최종적으로 indole-3-carbinol이 형성된다 (Fenwick et al., 1982).

Organic nitrile은 산성조건에서 생성되는 분해산물로  $Fe^{2+}$ 의 영향을

받는다. 따라서 피클 양배추, 콜슬로, 사우어크라우트와 같은 식품을 저장할 때 주로 생성되는 물질이다 (Daxenbichler et al., 1980). Epithionitrile은 결사슬 구조의 말단 탄소가 이중결합으로 연결되어 있는데, epithiospecifier protein (ESP) 및  $Fe^{2+}$ 이 함께 존재할 경우 황 이온의 첨가를 촉진하여 thirane 고리를 형성한다 (Tookey, 1973). 다수의 식물을 사용한 연구에서 식물체가 자가 분해를 통해 organic nitrile을 생성하는 것이 발견되었지만, nitrile forming factor에 대해 정확하게 밝혀진 바는 없다 (Holst and Williamson, 2004).

Organic thiocyanate는 글루코시놀레이트의 주된 분해산물은 아니지만, *Thlaspi*, *Lepidium*, *Alyssum*, *Coronopus* 속으로 수행된 일부 연구에서 발견된 바 있다. 뿐만 아니라 *Thlaspiarvensis* 씨앗을 사용한 실험에서 아스코르브산과 낮은 온도 조건이 2-propenyl thiocyanate의 생성을 증가시키는 것이 관찰되었다 (Fenwick et al., 1982). 하지만 organic thiocyanate의 생성기전에 대한 정보는 아직 분명하게 밝혀지지 않았다. 글루코시놀레이트 결사슬 구조가 안정한 탄소 양이온을 생성할수록 organic thiocyanate가 생성되기 쉽다는 주장이 있지만, 이것이 실험으로 증명되지는 않았다 (Lüthy and Benn, 1977). *Lepidium sativum*를 사용한 실험에서는 식물체로부터 thiocyanate forming protein (TFP)을 분리한 뒤 아미노산 서열을 분석한 결과 ESP와의 높은 연관성이 밝혀졌다. 하지만 분리한 TFP를 처리하였을 때, benzyl 글루코시놀레이트에서만 organic thiocyanate 형성이 확인되었다 (Burow et al., 2007).



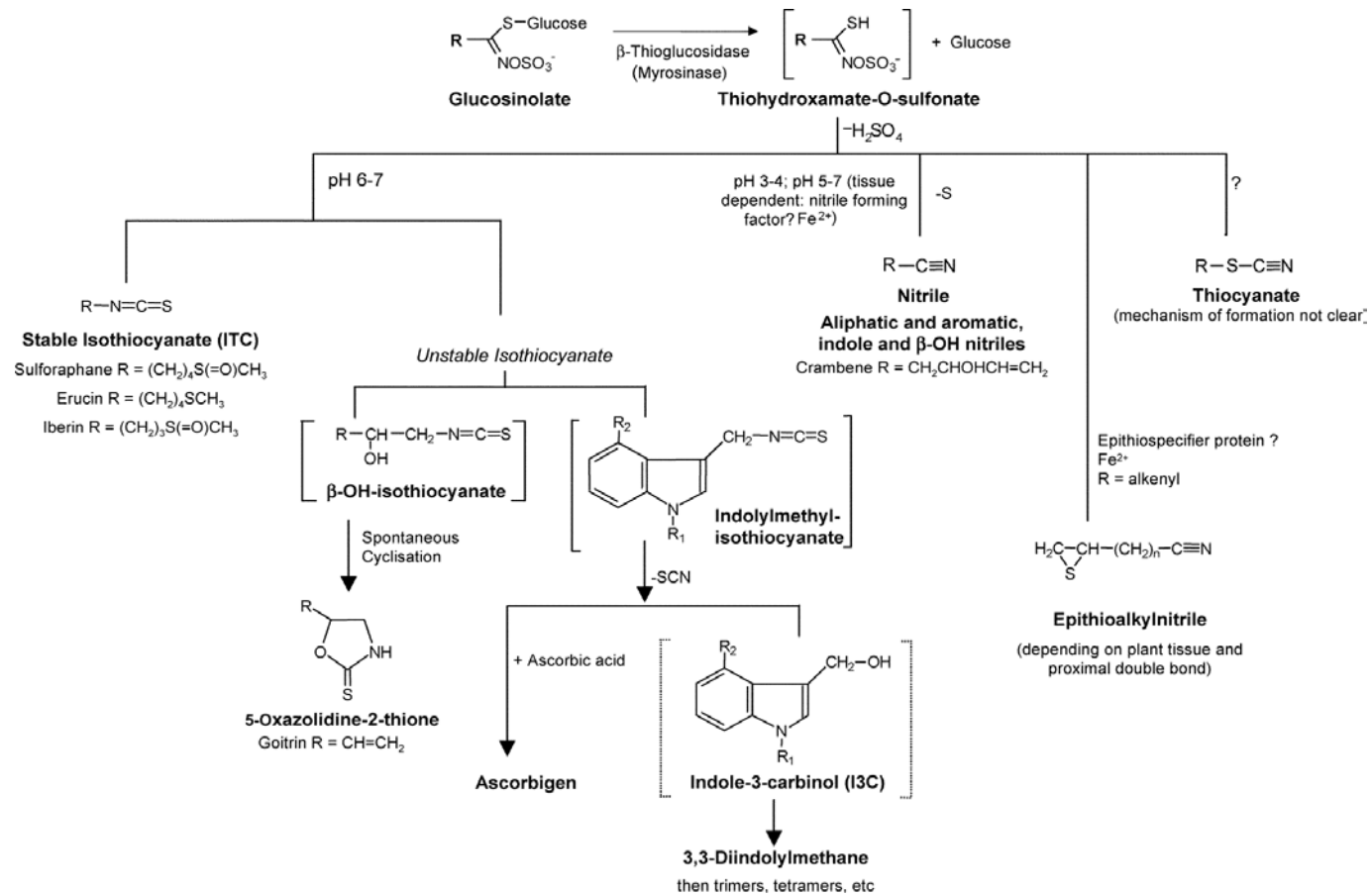


Figure 1. Glucosinolate hydrolysis and the formation of GLS-BPs (Holst and Williamson, 2004)

### 3. 글루코시놀레이트의 체내 분해 및 흡수

십자화과 식물의 섭취 시 저작운동은 일반적으로 글루코시놀레이트가 myrosinase와 반응하는 첫 번째 단계이다. 조리되지 않은 신선한 브로콜리 새싹을 충분히 씹고 삼킨 사람의 경우 씹지 않고 삼킨 사람보다 소변에서 더 많은 양의 organic isothiocyanate 대사체가 발견되었는데, 이로부터 저작운동의 중요성을 알 수 있다 (Shapiro et al., 2001).

글루코시놀레이트는 소화과정 중에서도 분해되는데 산 가수분해, 식물체 내 myrosinase에 의한 가수분해, 그리고 장내 미생물에 의한 분해가 이와 관련되어 있다 (Holst and Williamson, 2004). 글루코시놀레이트에 펩신 HCl을 처리하고, 소장에 글루코시놀레이트를 처리한 연구에서, 생성되는 분해물질의 양이 글루코시놀레이트 구조별로 다양한 것으로 확인되었다. 또한 단순히 산을 처리한 경우보다 글루코시놀레이트의 분해량이 훨씬 증가하였다 (Maskell and Smithard, 1994). 소화과정에서의 산성조건이나 소화효소에 외에 식물체 내 myrosinase에 의해 글루코시놀레이트가 분해될 수도 있다. Myrosinase가 활성화 된 채종박을 섭취한 랫드의 맹장세포를 배양한 경우, myrosinase가 불활성화 된 채종박을 섭취한 랫드의 맹장세포 보다 많은 양의 분해산물이 생성되었다. 같은 조건의 결장과 직장세포를 배양한 결과 myrosinase 활성화와 불활성화 경우의 차이가 더 큰 것으로 관찰되었다 (Michaelsen et al., 1994). 뿐만 아니라 장내 미생물 영향에 대한 연구에 의하면, 채종박을 섭취한 돼지의 회장에서 섭취량의 60 %에 해당하는 글루코시놀레이트가 변형되지 않은 상태로 발견되었으나, 대변에서는 글루코시놀레이트를 발견할 수 없었다 (Holst and Williamson, 2004).

캐놀라박 섭취 수탉을 이용한 실험에서는 맹장을 제거 시킨 경우가 그렇지 않은 경우보다 대변 내 글루코시놀레이트의 함량이 유의하게 높았다. 또한 무균 처리된 암탉의 경우 그렇지 않은 경우보다 대변 내 글루코시놀레이트 함량이 유의하게 높았다 (Slominski et al., 1987). 따라서 대장에 도달하는 글루코시놀레이트가 대장 미생물에 의해 분해된 후 재흡수 되어 체내로 들어간다고 해석할 수 있다.

글루코시놀레이트의 흡수에 대한 연구는 크게 두 가지로 나뉘어 글루코시놀레이트의 흡수패턴 혹은 글루코시놀레이트 분해산물의 흡수패턴에 대한 연구로 진행되어왔다. 글루코시놀레이트는 친수성 물질이며 전하를 띠기 때문에 인지질 층을 통과하기 어렵다. 하지만 채종박 섭취 랫드의 체내 allyl 글루코시놀레이트 이동을 추적한 실험에서 글루코시놀레이트가 소장과 대장의 장점막을 통과하여 이동하는 것이 관찰되었다. 또한 장 벽을 통과할 때 능동수송이 아닌 촉진확산으로 이동하는 것이 관찰되었다 (Michaelsen et al., 1994). 반면에 글루코시놀레이트가 당 부분을 포함하므로 포도당 수송체에 의해 능동수송 될 것이라는 주장도 존재한다 (Holst and Williamson, 2004).

글루코시놀레이트 분해산물은 상대적으로 친유성의 성질을 띠며 분배계수 값이 높다. 또한 분자량의 크기가 작은 편이어서 수동확산을 통해 체내로 빠르게 흡수된다. 랫드에 cysteine이 결합된 benzyl isothiocyanate를 경구투여 한 결과, 투여 45분 만에 혈중 농도가 최고치에 도달했으며, 배출 또한 빠른 속도로 진행되어 반감기가 1~2시간에 불과했다 (Brusewitz et al., 1977). 또한 랫드에 organic isothiocyanates (benzyl, allyl, methyl, ethyl, *n*-butyl) 경구투여 후 24시

동안 소변을 모아 소변 내 organic isothiocyanate 대사체를 측정 한 연구에서, 결가지 사슬에 따라 흡수율이 매우 달라지는 것이 관찰되었다 (Mennicke et al., 1987). 랫드에 phenethyl isothiocyanate와 phenylhexyl isothiocyanate를 경구투여 한 연구에서는 phenethyl isothiocyanate의 경우 혈중 농도가 2.9시간 만에 최고치에 도달했지만, phenylhexyl isothiocyanate의 경우 8.9시간 만에 최고치에 도달했다. 또한 phenylhexyl isothiocyanates는 경구 투여량의  $7 \pm 1 \%$ 가 소변으로,  $47 \pm 14 \%$ 가 대변으로 배설되었으나, phenethyl isothiocyanate는 경구 투여량의  $89 \pm 2 \%$ 가 소변,  $10 \pm 2 \%$ 가 대변으로 배설되었다. 따라서 결사슬 구조의 길이가 긴 phenylhexyl isothiocyanate의 경우 친유성의 성질이 상대적으로 강하기 때문에 혈액으로의 흡수가 느리고, 대변을 통한 배출이 쉬우며, 소변을 통한 배설은 어려운 것으로 추측된다 (Conaway et al., 1999). Organic isothiocyanate 외 글루코시놀레이트 분해산물의 흡수에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

#### 4. 글루코시놀레이트의 체내 효과

글루코시놀레이트는 그 자체로 활성을 지니지 않으나, 분해산물들이 다양한 생리학적 활성을 지닌다고 알려져 있다. 글루코시놀레이트 분해산물에 대한 연구는 주로 organic isothiocyanate의 항암효과에 초점을 맞추어 진행되었다 (Terry et al., 2001, Talalay and Fahey, 2001). 반면에 글루코시놀레이트의 반영양적 효과와 독성 가능성이 지속적으로 제기되어왔다.

채종박을 섭취한 동물실험에 따르면 식이에 함유된 글루코시놀레이트 농도가 높을수록 그에 따른 부정적 효과도 심각해지는 것으로 확인되었다. 동물에게 일반적으로 나타나는 글루코시놀레이트 유해효과는 식이 섭취 감소, 성장 및 생식 감소인 것으로 관찰되었다 (Tripathi and Mishra, 2007) (Table 1). 뿐만 아니라 채종박을 섭취한 젓소에서 혈중 thyroxine ( $T_4$ )의 농도가 감소하는 것이 발견되었다. 동일한 식이를 랫드에 투여한 경우에는 갑상선의 크기가 작아지는 것이 발견되었다 (Papas et al., 1979). 가금류를 이용한 채종박 섭취 실험에서는 갑상선의 크기가 비대해지고, 갑상선 호르몬의 농도가 감소하였으며, 간과 신장에 이상이 관찰되었다. 뿐만 아니라 성장과 생식활동도 감소하는 것으로 관찰되었다. 돼지를 이용한 실험에서는 채종박의 섭취량과 갑상선 무게의 연관성이 확인되었다. 또한 랫드가 채종박 외에도 십자화과 식물, 글루코시놀레이트, 글루코시놀레이트 분해산물을 섭취하는 모든 경우에서 간이 비대해지는 것이 발견되었다 (Heaney and Fenwick, 1995).

**Table 1. Biological effects of glucosinolates on animals (Tripathi and Mishra, 2007)**

| Animal              | TGIs <sup>1</sup><br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ diet) | Effect on animals  | Reference                   |
|---------------------|---|--|-----------------------------|
| <i>Monogastrics</i> |   |  |                             |
| Rat                 | 3.3-4.4   | Reduced intake and growth  | Vermorel et al. (1988)      |
|                     | 7.7   | Depressed intake and growth  | Vermorel et al. (1987)      |
|                     | 6.6   | Poor gain, increase thyroid weight and changed thyroid morphology  | Wallig et al. (2002)        |
|                     | 0.5   | No adverse effect  | Bjerg et al. (1989)         |
| Pigs                | 1.3-2.79  | Reduced feed intake and growth   | Bell et al. (1991)          |
|                     | 7.0   | Severe growth depression   | Mawson et al. (1994)        |
|                     | 9-10  | Induced liver and thyroid hypertrophy  | Bourdon and Aumaitre (1990) |
|                     | 10  | Induced iodine deficiency, Hypothyroidism, reduced bone and serum zinc content and alkaline phosphatase activity | Aumaitre et al. (1989)      |
|                     | 0.16-0.78   | No adverse effect during growth, pregnancy and lactation   | Opalka et al. (2001)        |
|                     | 2.2   | No adverse effect during growing period  | Roth-Mailer et al. (2004)   |
|                     | 1.3   | Reduced gain during finishing period   | Roth-Mailer et al. (2004)   |
| Poultry             | 5.4–11.6  | No adverse effect on intake and gain   | Lesson et al. (1987)        |
|                     | 2.3–8.18  | No adverse effect on weight gain   | Marangos et al. (1974)      |

**Table 1. (Continued)**

|                  |           |  |                               |
|------------------|-----------|--|-------------------------------|
|                  | 7.6–15.3  | Severe growth depression   | Thomas et al. (1983)          |
|                  | 34.0      | Severe growth depression   | Pearson et al. (1983)         |
|                  | 0.9       | No adverse effect on intact and growth                             | Seškevičienė et al. (2004)    |
|                  | 4.6       | Reduced feed intake by 0.09 and gain by 0.12 levels                | Seškevičienė et al. (2004)    |
| Rabbits          | 7.9       | No apparent adverse effect on growth and health of broiler rabbits | Tripathi et al. (2003)        |
|                  | 17.9–25.3 | Severe growth depression and increased mortality                   | CSWRI (2002)                  |
| <i>Ruminants</i> |           |  |                               |
| Calves           | 1.2–2.4   | No adverse effect on thyroid and liver function of calves          | Anderssen and Sorensen (1985) |
| Steers           | 10–15     | No detrimental effect on growth and feed conversion of steers      | Bush et al. (1978)            |
| Cow              | 11.0      | Induced iodine deficiency in cow                                   | Laarveld et al. (1981c)       |
|                  | 11.7–24.3 | Depressed feed intake and milk production in dairy cow             | Waldern (1973)                |
|                  | ≥23.0     | Reduced intake and milk production in cow                          | Ingalls and Sharma (1975)     |
|                  | 31.0      | Thyroid disturbance and depressed fertility in cow                 | Ahlin et al. (1994)           |
| Sheep            | 1.2–2.2   | Weight loss during lactation in ewes                               | Mandiki et al. (2002)         |
|                  | 15.0      | Reduced growth in lambs  | Thomas et al. (1984)          |
|                  | 17.5      | No effect on intake but increased thyroid weight in lam            | Hill et al. (1990)            |
|                  | 33.0      | Growth depression in lamb  | Tripathi et al. (2004)        |
|                  | <4.22     | No adverse effect on lamb performance                              | Derycke et al. (1999)         |

**Table 1. (Continued)**

|      |         |  |                          |
|------|---------|--|--------------------------|
|      | ≥4.22   | Induced iodine deficiency and influenced thyroid weight and histology in lambs | Derycke et al. (1999)    |
|      | 1.2–1.6 | Reduced plasma levels of estradiol provoked reproductive disturbance           | Mandiki et al. (2002)    |
| Fish | 2.18    | Reduced growth by 0.15 level   | Glencross et al. (2004b) |
|      | 19.3    | Severe growth depression and thyroid disturbances                              | Burel et al. (2000c)     |

---

<sup>1</sup>TGIs: total glucosinolates



갑상선종발생의 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 글루코시놀레이트 분해산물에는 5-vinyl-2-oxazolidinethione (goitrin), organic isothiocyanate, organic nitrile, thiocyanate ion이 있다. 특히 goitrin과 organic nitrile의 경우 갑상선으로 요오드가 유입되는 것을 방해함으로써 갑상선의 무게를 증가시키고 갑상선 호르몬의 수준을 감소시키는 것으로 관찰되었다 (Heaney and Fenwick, 1995). Thiocyanate ion은 요오드와 경쟁적 작용을 하는 것으로 알려져 있는데, 갑상선으로 유입된 요오드 이온이 방출되는 속도를 증가시켜 갑상선 호르몬의 합성을 저해하는 goiter로서 작용하는 것이 밝혀졌다 (Astwood, 1943). 또한 고농도의 thiocyanate ion은 갑상선 호르몬 합성 과정 중 요오드의 유기화를 저해시킴으로써 갑상선 호르몬의 합성을 방해하는 것이 확인되었다 (Erdoğan, 2003). Thiocyanate ion의 갑상선종 발생 특성은 요오드 부족 시 발생하는 것으로 요오드를 보충할 경우 그 증상을 완화시킬 수 있다. 반면에 goitrin의 반갑상선 영향은 요오드 섭취량과 관계없이 발생하므로 요오드 보충으로 증상을 완화시킬 수 없다. 따라서 goitrin은 매우 강력한 반갑상선 물질 중 하나로 간주된다 (Fenwick and Heaney, 1983).


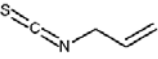
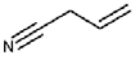
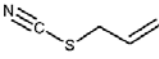
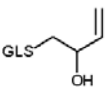
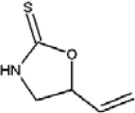
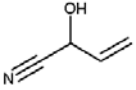


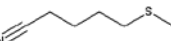
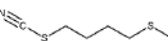
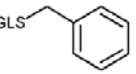
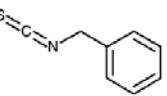
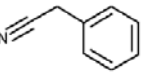
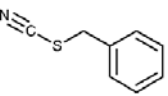
### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 실험 재료

##### 1.1. 시료

국내에서 다량 소비되고 있는 십자화과 식물체를 고려하여 결사슬 구조에 따라 4종의 글루코시놀레이트를 선정하였다 (Table 2, Table 3). Sinigrin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Progoitrin, glucoerucin, glucotropaeolin은 각 성분이 많이 포함되어 있다고 알려진 십자화과 식물의 씨앗으로부터 분리하였다. Progoitrin은 *Brassica napus* L. 씨앗 (아시아종묘, Seoul, Korea), glucoerucin은 *Eruca sativa* Mill. 씨앗 (아시아종묘, Seoul, Korea), glucotropaeolin은 *Tropaeolummajus* L. 씨앗 (가람원, Yongin, Korea)으로부터 분리하였다. 씨앗은 구입 후 사용 직전까지 냉장보관 하였다. 표준시약으로 사용한 progoitrin potassium salt, glucoerucin, glucotropaeolin potassium salt는 ChromaDex (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다.

**Table 2. Selected glucosinolates and their breakdown products**

| Glucosinolates  |                        |   | Corresponding degradation products   |  |  |
|-----------------|------------------------|---|--|--|--|
| Trivial name    | R-group                |   | Organic isothiocyanate (R-NCS)   | Organic nitrile (R-CN)   | Organic thiocyanate (R-SCN)  |
| Sinigrin        | Allyl                  |   |   |   |   |
| Progoitrin      | (R)2-Hydroxy-3-butenyl |   |   |   | <sup>1</sup>   |
| Glucoerucin     | 4-(Methylthio)butyl    |   |   |   |   |
| Glucotropaeolin | Benzyl                 |  |  |  |  |

<sup>1</sup>R-SCN of progoitrin is not reported to occur.

**Table 3. Abundant sources of selected glucosinolates**

| Glucosinolates  | Abundant sources <sup>1</sup>   |  |
|-----------------|---|--|
|                 | Scientific name   | Common name  |
| Sinigrin        | <i>Armoracia rusticana</i><br><i>Brassica juncea</i>  | Horse-radish<br>Mustard                                    |
| Progoitrin      | <i>Brassica napus</i> L.<br><i>Brassica campestris</i> L.<br><i>Brassica rapa var. glabra</i> Regel | Rape<br>Turnip<br><i>kimchi</i> cabbage                    |
| Glucoerucin     | <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>pekinensis</i><br><i>Eruca sativa</i> Mill.                         | <i>kimchi</i> cabbage<br>Rocket mustard                    |
| Glucotropaeolin | <i>Brassica rapa var. glabra</i> Regel<br><i>Lepidium sativum</i> L.<br><i>Tropaeolum majus</i> L.  | <i>kimchi</i> cabbage<br>Garden cress<br>Garden nasturtium |

<sup>1</sup>Fenwick et al. (1982), Griffiths et al. (2001), 박한울 (2012)

## 1.2. 시약 및 기기

n-Hexane, methyl alcohol, 2-propanol, dichloromethane은 삼전화학(주) (Seoul, Korea)에서 구입하였다. DEAE-Sephadex A-25 chloride form, imidazole, formic acid, trifluoroacetic acid, potassium thiocyanate, potassium cyanide, tetrabutylammonium sulfate (TBAS; 50 % w/w solution in water), 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide (PFB-Br), sodium tetraboratedecahydrate, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, benzyl isothiocyanate, allyl cyanide, benzyl cyanide는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Potassium sulfate는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Acetonitrile은 Avantor Performance Materials (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. Iron (III) nitrate enneahydrate ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )는 Kanto Chemicals Co. Inc. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ), magnesium sulfate anhydrous ( $\text{MgSO}_4$ )는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Allyl isothiocyanate는 Fluka (Buchs, Switzerland)에서 구입하였으며, erucin, DL-goitrin은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 1,2-benzenedithiol, benzyl thiocyanate은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Allyl thiocyanate, 2-hydroxy-3-butenyl cyanide, 4-(methylthio)butyl cyanide, 4-(methylthio)butyl thiocyanate는 본 연구실에서 합성하였다. 실험에 사용된 모든 수용액은 3차 증류수를 사용하였다.

PVDF membrane filter (Durapore®, hydrophilic, 0.22  $\mu\text{m}$ ), amicon ultra centrifugal filter devices (3K & 30K), PTFE membrane filter (hydrophilic, 0.5  $\mu\text{m}$ )는 Millipore Co. (Bedford, MA, USA)에서 구입하였다. Mouse/Rat Triiodothyronine (T3) ELISA kit와 Mouse/Rat Thyroxine (T4) ELISA kit는 Calbiotech (Spring valley, CA, USA)에서 구입하였다.

회전진공농축기는 Heidolph WB 2000 (Kelheim, Germany), 제이오텍(주) RBC-10 (Daejeon, Korea), 제이오텍(주) VE-11 (Daejeon, Korea)이 연결된 Heidolph VV 2000 (Kelheim, Germany)을 사용하였다. 항온수조는 제이오텍(주) (Daejeon, Korea)의 BS-21 Shaking & Heating bath을 사용하였다. 원심분리기는 Hitachi Co. (Tokyo, Japan)의 Himac CP80MX, 한일과학산업(주) (Seoul, Korea)의 Smart R17을 사용하였다. Preparative HPLC는 Japan Analytical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)의 LC-9201을 사용하였으며, Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA)의 Supelcosil PLC-18 column (25 cm  $\times$  21.2 mm, 12  $\mu\text{m}$ )을 연결하여 분석하였다. 진공원심농축기는 Labogene (Lyngby, Denmark)의 Scan Speed Maxi Vac Alpha을 사용하였으며, 분광광도계는 MECASYS Co. (Daejeon, Korea)의 Optizen 2120UV UV/VIS spectrophotometer를 사용하였다. Microplate spectrophotometer는 Molecular Devices Co. (Sunnyvale, CA, USA)의 Spectramax 190을 사용하였다. CI-GC-MS는 Thermo scientific (Waltham, MA, USA)의 TSQ 8000 triple quadrupole GC-MS/MS, TriPlus RSH Autosampler가 연결된 TRACE 1310 GC를 사용하였으며, Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA)의 DB-WAX column (60 m  $\times$  0.25 mm I.D., 0.5  $\mu\text{m}$  df)을 연결하여 분석하였다. EI-

GC-MS는 allyl thiocyanate 분석 시 JEOL (Tokyo, Japan)의 JMS600W가 연결된 Agilent 6890 Series GC (Palo Alto, CA, USA), 그 외 물질 분석 시 Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA)의 Clarus 600T CG-MS가 연결된 Clarus 680 GC를 사용하였다. Allyl cyanide는 Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA)의 HP-PLOT/Q column (30 m × 0.530 mm I.D., 40 μm df)을 연결하여 분석하였으며, 나머지 물질은 Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA)의 DB-5MS column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.5 μm df)을 연결하여 분석하였다. HPLC는 UV detector가 연결된 Dionex Co. (Sunnyvale, CA, USA)의 Dionex ultimate 3000을 사용하였으며, Phenomenex (Torrance, CA, USA)의 Luna C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm, 100 Å)을 연결하여 분석하였다. 혈액분석기는 Fuji film Co. (Tokyo, Japan)의 Fuji dri-chem 3500s를 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 글루코시놀레이트의 추출 및 분리

Song et al. (2006), Rochfort et al. (2006)의 방법을 참고하여 글루코시놀레이트의 추출을 진행하였다. Myrosinase를 불활성화하기 위해 *Brassica napus* L. 씨앗과 *Eruca sativa* Mill. 씨앗을 110 °C 오븐에서 2시간 동안 건조시켰다. *Tropaeolum majus* L. 씨앗은 단단해서 오븐으로 효소를 불활성화 시키기 어려우므로 씨앗 100 g당 1 L의 물을 사용하여 10분간 끓인 후 건조시켰다. 효소를 불활성화 한 뒤 막자와 막자사발을 이용하여 파쇄하였다. 분쇄한 씨앗 100 g당 200 ml hexane을 이용하여 지방을 제거하는 과정을 5반복 하였다. 잔여 용액은 회전진공농축기를 이용하여 완전히 제거한 뒤 질량 10배의 70 % methanol을 추가하여 75 °C, 110 rpm 항온수조에서 10분간 추출하였다. 추출 후 원심분리 하여 상층액을 얻었다 (2000 × g, 15분, 상온). 회전진공농축기를 이용하여 상층액의 30 % 가량이 남을 때까지 농축하였다.

추출한 시료로 Visentin et al. (1992), ISO norm (1992)의 방법을 참고하여 ion-exchange chromatography를 진행하였다. 먼저 DEAE-Sephadex A-25를 2 M acetic acid 용액과 혼합하여 현탁액 상태로 준비하였다. 액체의 부피가 가라앉은 고체 부피의 두 배가 될 때까지 2 M acetic acid를 첨가하였으며, 실험 이틀 전 준비하여 냉장 보관하였다. DEAE-Sephadex A-25 column (2.5 x 30 cm)을 만든 후 6 M imidazole formate 150 ml로 컨디셔닝 (conditioning)하였다. 이어서 증류수 150 ml로 세척한 후 시료 150 ml를 로딩 (loading)하였다. Formic acid/2-



propanol/water (3:2:5) 200 ml, 증류수 300 ml 순서로 세척한 후 0.5 M  $K_2SO_4$ /5% 2-propanol 150 ml로 용리하였다. 분리한 시료는 PVDF membrane filter로 필터 (filter)하였다.

분리 후 필터한 시료를 preparative HPLC를 이용하여 해당 글루코시놀레이트 부분만 받아내었다. Preparative HPLC에 사용된 모든 용매는 PTFE membrane filter로 필터 하였고 실험 전에 초음파로 가스를 제거하였다. Preparative HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 컬럼: C18; 파장: 229 nm; 유속: 3 ml/min; *Brassica napus* L.은 용매로 isocratic mobile phase 0.1 % TFA in water를 사용하였으며, 약 27~28분에 progoitrin이 검출되었다. *Eruca sativa* Mill.은 용매로 isocratic mobile phase 0.1 % TFA in 75 % water / 25 % methanol을 사용하였으며, 약 22~23분에 glucoerucin이 검출되었다. *Tropaeolummajus* L.은 용매로 isocratic mobile phase 0.1 % TFA in 70 % water / 30 % methanol을 사용하였으며, 약 22~23분에 glucotropaeolin이 검출되었다. 받아 낸 시료를 진공원심농축기로 농축 시키고 229 nm에서 흡광도를 측정하여 표준시약 대비 농도를 계산하였다.

## 2.2. 동물실험

서울대학교 실험동물자원관리원에서 7주령 Wistar rats ( $206.32 \pm 1.86$  g)를 공급받아 서울대학교 약학대학 실험동물시설에서 사육하였다. 총 25마리를 5개의 군 (control, sinigrin, progoitrin, glucoerucin, glucotropaeolin)으로 무작위로 나누어 실시하였다. 10개의 cage에 2, 3마리씩 나누어 넣었으며, 24시간의 순화기간을 가졌다. 사육실의 온도는  $22 \pm 2$  °C, 습도는  $50 \pm 5$  %로 조절 되었으며, 조명은 12시간 주기로 조절되어 오후 7시~오전 7시에 소등되었다. 기본식은 Purina irradiated laboratory chow 38057 (Purina Korea, Seoul, Korea)와 멸균수를 사용하였다. 경구 투여 전 16시간 동안 절식 시켰으며 실험군은 각 군에 따른 글루코시놀레이트를  $50 \mu\text{mol/ml}$ 씩, 대조군은 동량의 멸균수를 경구투여 하였다. 경구 투여 5시간 후 CO<sub>2</sub> 가스로 마취하고 복대동맥 채혈법을 통해 혈액을 채취하였으며, 간을 적출하여 생리 식염수로 세척한 후 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 이상 방치하여 응고시킨 후 4 °C, 2,000 x g에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, 사용 직전까지 -80 °C 초저온 냉동고에 보관하였다. 본 연구는 서울대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 수행되었다 (승인번호: SNU-130621-3-1).

## 2.3. 혈청 내 글루코시놀레이트 대사산물 분석

### 2.3.1. Thiocyanate ion 정량 분석

Van Staden and Botha (2000), 심기환 et al. (1993)의 방법을 참고하여 thiocyanate ion의 농도를 측정하였다. 먼저 1400 mg의  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 를 40 ml의 물에 녹인 후 3.7 ml의 70 %  $\text{HNO}_3$ 을 첨가하여 Fe (III) reagent solution을 제조하였다. 그리고 혈청 내 단백질을 제거하기 위해 amicon ultra centrifugal filter devices (30K)를 사용하여 혈청 200  $\mu\text{l}$ 를 원심 분리하였다 (14,000  $\times$  g, 15분, 4  $^\circ\text{C}$ ). 여과액 100  $\mu\text{l}$ 을 취하여 Fe (III) reagent solution 100  $\mu\text{l}$ 와 10분 간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 potassium thiocyanate를 사용하여 표준검량곡선을 획득하였다.

### 2.3.2. Cyanide ion 정량 분석

Bhandari et al. (2012)의 방법을 참고하여 cyanide ion 농도를 측정하였다. 먼저 포화된 sodium tetraborate decahydrate에 녹아있는 10 mM TBAS (pH 9.5)와 ethyl acetate에 녹아있는 20 mM PFB-Br을 제조하였다. 100  $\mu$ l의 혈청에 800  $\mu$ l의 10 mM TBAS 용액과 500  $\mu$ l의 20 mM PFB-Br 용액을 첨가한 후 2분 간 볼텍싱 (vortexing)하였다. 70  $^{\circ}$ C의 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 원심 분리하였다 (9300  $\times$  g, 4분, 상온). 상층액을 MgSO<sub>4</sub>로 탈수한 후 CI-GC-MS로 분석하였으며 분석조건은 다음과 같다. 컬럼: DB-WAX; 운반기체: 1 ml/min helium; CI 기체: 1.5 ml/min methane (positive ion), 전자에너지: 150 eV; 주입량: 1  $\mu$ l; 주입구 온도: 210  $^{\circ}$ C; ion source 온도: 200  $^{\circ}$ C; MS transfer line 온도: 220  $^{\circ}$ C; 처음 오븐 온도 60  $^{\circ}$ C에서 2분 유지 후, 7  $^{\circ}$ C/min의 속도로 230  $^{\circ}$ C까지 올라가면 4분 유지한다. PFB-CN (m/z 208)은 약 23.18분에 검출되었으며 SIM mode로 측정하였다. 표준물질로 potassium cyanide를 사용하여 표준검량곡선을 획득하였다.

### 2.3.3. Organic isothiocyanates 정량 분석

Zhang (2012), Ye et al. (2002)의 방법을 참고하여 cyclocondensation assay로 organic isothiocyanates와 그 대사체의 농도를 측정하였다. Organic isothiocyanates는 체내에서 dithiocarbamates로 대사되며, 본 방법으로 이들을 모두 측정할 수 있다. 먼저 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.5)와 acetonitrile에 녹아있는 20 mM 1,2-benzenedithiol, 50 mM 1,2-benzenedithiol을 제조하였다. Sinigrin, glucoerucin, glucotropaeolin군의 경우, 2.0 ml vial에 200  $\mu$ l의 혈청, 200  $\mu$ l의 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.5), 400  $\mu$ l의 20 mM 1,2-benzenedithiol을 첨가한 후 65  $^{\circ}$ C 항온수조에서 3시간 동안 반응시켰다. Progoitrin군의 경우, 2.0 ml vial에 200  $\mu$ l의 혈청, 200  $\mu$ l의 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.5), 400  $\mu$ l의 50 mM 1,2-benzenedithiol을 첨가한 후 65  $^{\circ}$ C 항온수조에서 12시간 동안 반응시켰다. Progoitrin의 분해산물인 goitrin의 고리형 구조는 반응속도가 느리므로 1,2-benzenedithiol의 농도와 반응시간을 증가시켰다. 반응 후 온도가 상온으로 떨어지면 원심 분리하여 침전물을 가라앉혔다 (10,000  $\times$  g, 2분, 상온). 상층액 20  $\mu$ l를 HPLC로 분석하였으며 분석조건은 다음과 같다. 컬럼: C18; 용매: isocratic mobile phase, 80 % methanol / 20 % water; 유속: 1 ml/min; 파장: 365 nm; 1,3-benzodithiole-2-thione은 9~10분에 검출되었으며, 매번 시료 분석 후 10분 동안 95 % acetonitrile / 5 % water로 컬럼을 세척하였다. 표준물질로 allyl isothiocyanate, erucin, benzyl isothiocyanate, DL-goitrin을 사용하여 표준검량곡선을 획득하였다.

### 2.3.4. Organic nitriles, organic thiocyanates 정량 분석

Amicon ultra centrifugal filter devices (3K)를 사용하여 혈청 200  $\mu$ l를 원심 분리하였다 (14,000  $\times$  g, 30분, 4  $^{\circ}$ C). 여과액 130  $\mu$ l를 취하여 dichloromethane 130  $\mu$ l로 추출한 후  $MgSO_4$ 로 탈수하였다. EI-GC-MS로 분석하였으며 분석조건은 다음과 같다. 운반기체: 1.5 ml/min helium; 전자에너지: 70 eV; 주입량: 1  $\mu$ l; ion source 온도: 250  $^{\circ}$ C; MS transfer line 온도: 250  $^{\circ}$ C; Sinigrin군의 경우 allyl thiocyanate가 고온에서 이성질체화 되므로 두 가지 조건으로 분석하였다. 먼저 allyl thiocyanate 분석 시 DB-5MS 컬럼을 사용하였고, 주입구 온도를 50  $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 처음 오븐 온도 35  $^{\circ}$ C에서 2분 유지 후, 5  $^{\circ}$ C/min의 속도로 70  $^{\circ}$ C까지 올린 다음 25  $^{\circ}$ C/min의 속도로 310  $^{\circ}$ C에 도달하면 5분 간 유지하였다. Allyl cyanide 분석 시에는 HP-PLOT/Q 컬럼을 사용하였고, 주입구 온도를 250  $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 처음 오븐 온도 80  $^{\circ}$ C에서 2분 유지 후, 10  $^{\circ}$ C/min의 속도로 180  $^{\circ}$ C까지 올린 다음 5분 간 유지하였다. 나머지 군의 경우 DB-5MS 컬럼을 사용하였고, 주입구 온도를 250  $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 처음 오븐 온도 40  $^{\circ}$ C에서 5분 유지 후, 10  $^{\circ}$ C/min의 속도로 200  $^{\circ}$ C까지 올린 다음 25  $^{\circ}$ C/min의 속도로 310  $^{\circ}$ C에 도달하면 5분 간 유지하였다. 표준물질로 사용한 Allyl thiocyanate (m/z 99)는 약 7.90분, allyl cyanide (m/z 67)는 약 9.53분, 2-hydroxy-3-butenyl cyanide (m/z 57)는 약 10.61분, 4-(methylthio)butyl cyanide (m/z 61)는 약 14.72분, 4-(methylthio)butyl thiocyanate (m/z 61)는 약 18.04분, benzyl cyanide (m/z 117)는 약 13.76분, benzyl thiocyanate (m/z 91)는 약 16.86분에 검출되었으며, 이들을 사용하여 표준검량곡선을

획득하였다.

## 2.4. 글루코시놀레이트 투여에 따른 갑상선 호르몬 변화

군 별 혈액을 합한 후 총 triiodothyronine ( $T_3$ )와 총 thyroxine ( $T_4$ )의 농도를 3회 반복 측정하였다.  $T_3$ 는 Mouse/Rat Triiodothyronine ( $T_3$ ) ELISA kit로 측정하였으며,  $T_4$ 는 Mouse/Rat Thyroxine ( $T_4$ ) ELISA kit로 측정하였다.

## 2.5. 혈액 생화학적 검사

감마글루타밀 전이효소 ( $\gamma$ -glutamyltransferase: GGT), 알라닌 아미노기 전이효소 (Alanine aminotransferase: ALT), 아스파테이트 아미노기 전이효소 (Aspartate aminotransferase: AST), 알칼리 인산분해효소 (Alkaline phosphatase: ALP), 총 빌리루빈 (Total bilirubin: TBIL), 크레아틴 인산효소 (Creatine phosphokinase: CPK), 혈액 요소 질소 (Blood urea nitrogen: BUN), 크레아티닌 (Creatinine: CRE)을 혈액분석기로 측정하였다.

## 2.6. 통계 분석

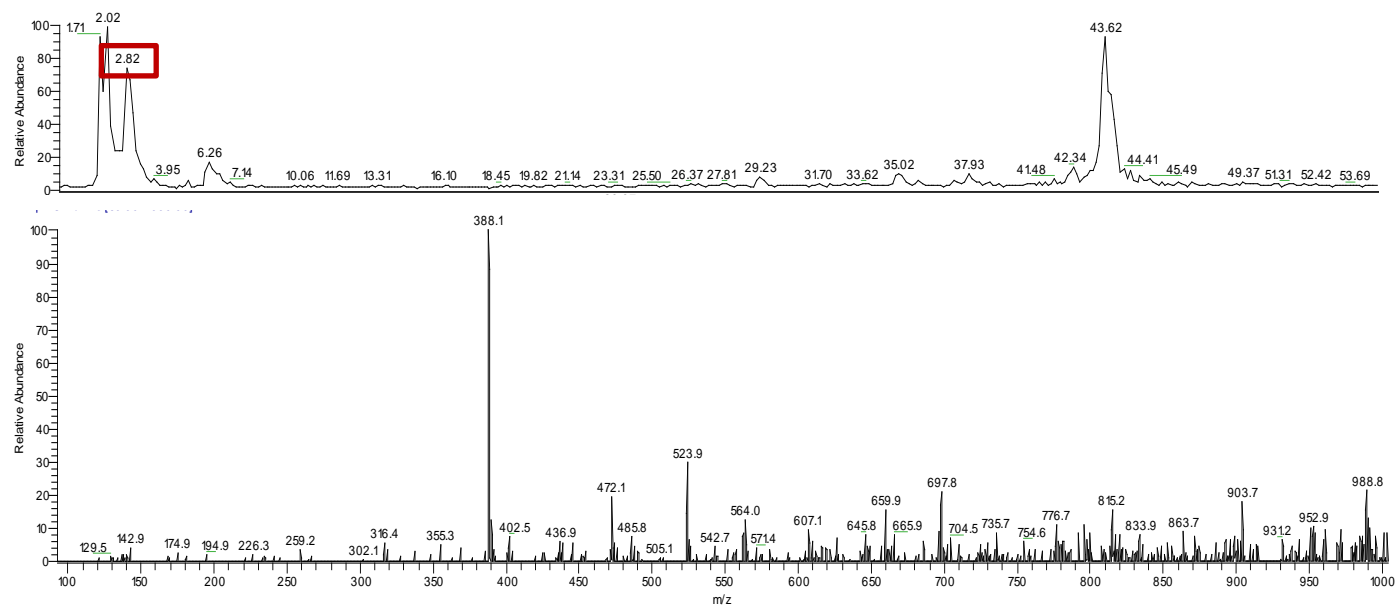
모든 분석 데이터로부터 평균값과 표준편차를 구하고 실험군 간의 유의적인 차이를 검증하기 위해 SPSS (Ver. 21)를 사용하였으며, 대조군의 평균을 블랭크 (blank) 값으로 사용하였다. 일원배치 분산분석을 실시하고, 사후검증을 위해 Tuckey' s HSD test를 실시하였다 ( $p < 0.05$ ).



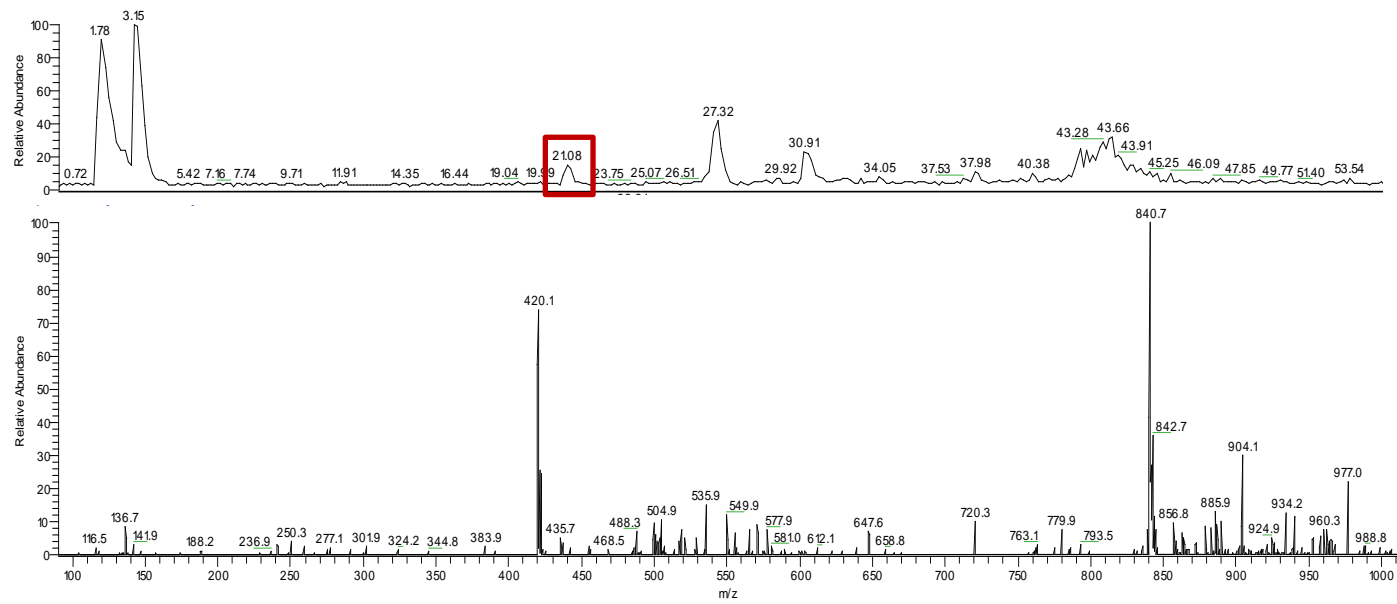
## IV. 결과 및 고찰

### 1. 글루코시놀레이트의 추출 및 분리

씨앗에서 글루코시놀레이트를 분리, 필터한 시료를 LC-MS로 정성한 후 preparative HPLC로 해당 글루코시놀레이트 부분만 받아냈다. Figure 2~4는 LC-MS의 크로마토그램 (chromatogram)과 해당 글루코시놀레이트 피크 (peak)의 매스 스펙트럼 (mass spectrum)을 나타내고 있다.



**Figure 2. Chromatogram and mass spectrum of isolated progoitrin**



**Figure 3. Chromatogram and mass spectrum of isolated glucoerucin**

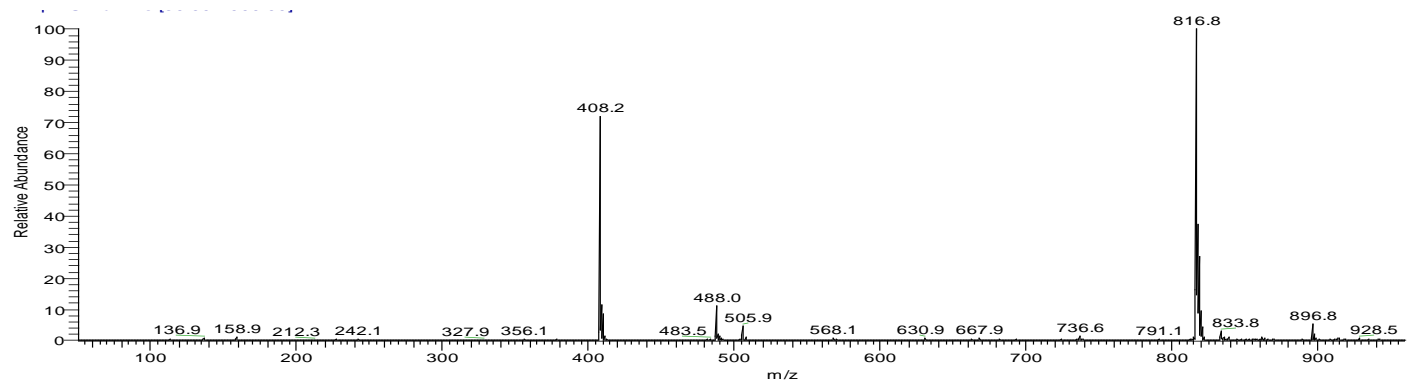
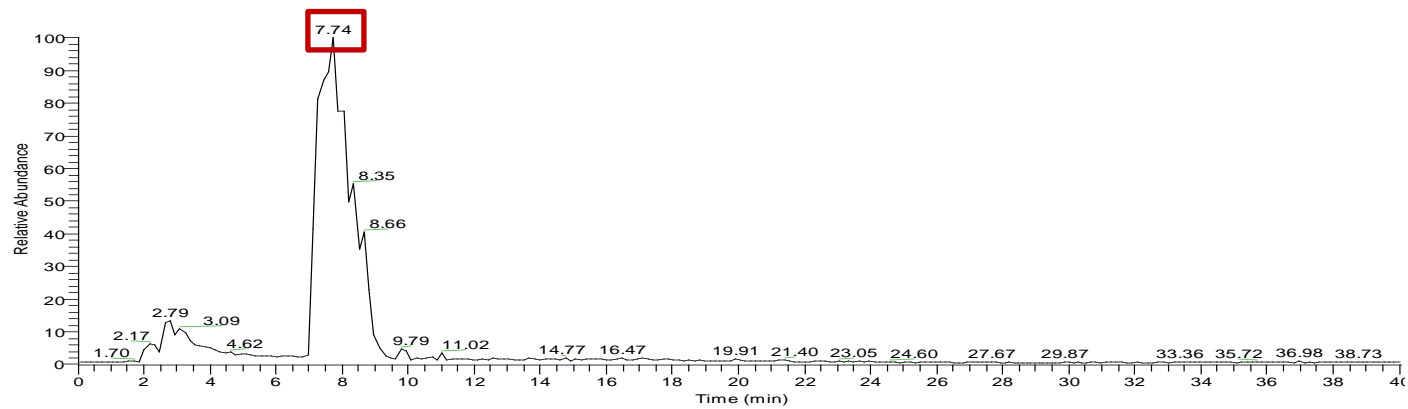


Figure 4. Chromatogram and mass spectrum of isolated glucotropaeolin

## 2. 혈청 내 글루코시놀레이트 대사산물 분석

글루코시놀레이트 투여 다섯 시간 후에 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하였다. 모든 군에서 thiocyanate ion, cyanide ion, organic isothiocyanates가 검출되었으며, progoitrin을 제외한 모든 군에서 thiocyanate ion의 농도가 가장 높게 측정되었다 (Table 4).

결사슬 구조 별로 살펴보면 thiocyanate ion은 sinigrin (R = allyl)군에서 가장 높은 농도 ( $53.27 \pm 21.62 \mu\text{M}$ )로 검출되었으며, glucotropaeolin (benzyl), glucoerucin (methylthiobutyl), progoitrin (hydroxyallyl)군의 순서로 검출 농도가 감소하였다. 또한 sinigrin, glucotropaeolin군의 혈중 thiocyanate ion 농도는 glucoerucin, progoitrin군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다. Cyanide ion은 glucotropaeolin군에서 가장 높은 농도 ( $13.28 \pm 6.29 \mu\text{M}$ )로 검출되었으며, sinigrin, glucoerucin, progoitrin군의 순서로 검출 농도가 감소하였다. Glucotropaeolin군의 혈중 cyanide ion 농도는 sinigrin, glucoerucin, progoitrin군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다. Organic isothiocyanates는 progoitrin군에서 유의하게 높은 농도 ( $14.81 \pm 2.23 \mu\text{M}$ )로 검출되었다. Glucoerucin군에서도 organic isothiocyanates가 검출되었으나 그 농도는 무시할 수 있을 정도로 소량이었다. Organic nitriles는 sinigrin, glucoerucin군에서 검출되었으나, sinigrin군에서의 검출 농도는 매우 낮았다. Organic thiocyanates는 모든 군에서 검출되지 않았다 (Table 4, Figure 5).

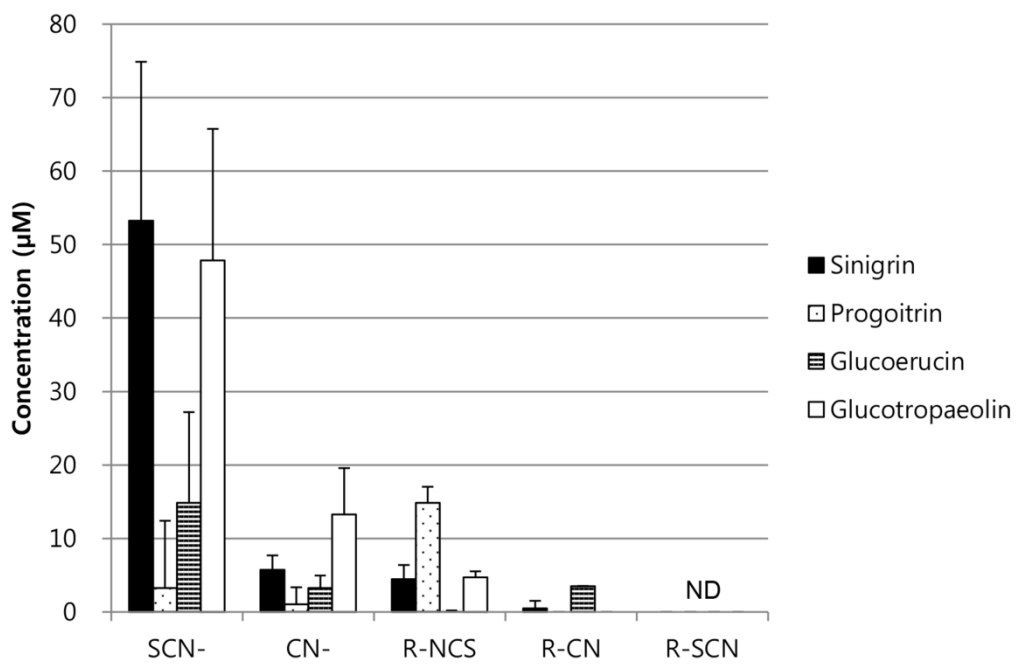
**Table 4. Glucosinolate metabolites in rat serum**

|                 | SCN <sup>-</sup> (μM)      | CN <sup>-</sup> (μM)      | R-NCS (μM)                | R-CN (μM)   | R-SCN (μM)     |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|----------------|
| Sinigrin        | 53.27 ± 21.62 <sup>b</sup> | 5.72 ± 2.00 <sup>a</sup>  | 4.47 ± 1.93 <sup>b</sup>  | 0.47 ± 1.06 | ND             |
| Progoitrin      | 3.24 ± 9.16 <sup>a</sup>   | 1.03 ± 2.33 <sup>a</sup>  | 14.81 ± 2.23 <sup>c</sup> | ND          | - <sup>1</sup> |
| Glucoruciferin  | 14.84 ± 12.36 <sup>a</sup> | 3.22 ± 1.72 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 3.48 ± 0.05 | ND             |
| Glucotropaeolin | 47.84 ± 17.90 <sup>b</sup> | 13.28 ± 6.29 <sup>b</sup> | 4.73 ± 0.80 <sup>b</sup>  | ND          | ND             |

*Note.* R-NCS: organic isothiocyanate, R-CN: organic nitrile, R-SCN: organic thiocyanate, ND: not detected

Values in the same column with different superscripts (a, b, c) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>1</sup> R-SCN of progoitrin is not reported to occur.



Note. R-NCS: organic isothiocyanate, R-CN: organic nitrile, R-SCN: organic thiocyanate, ND: not detected

**Figure 5. Glucosinolate metabolites in rat serum**

대부분의 군에서 대사산물 중 유독 thiocyanate ion의 농도가 높게 측정되었다는 점에 주목할 필요가 있다. Organic isothiocyanates의 대사 연구에 따르면 글루타치온 (glutathione)과 결합한 후 mercapturic acid형태로 소변을 통해 배설 된다고 알려져 있는데, 이는 benzyl isothiocyanates를 경구 투여한 랫드의 소변과, phenylethyl isothiocyanate의 전구체인 gluconasturtiin이 다량 함유되어 있는 물냉이를 섭취한 사람의 소변을 통해 확인되었다 (Brusewitz et al., 1977, Chung et al., 1992). Organic nitriles는 cytochrome P450와 관련된 대사를 통해 cyanide ion을 생성하며, 생성량은 organic nitriles의 구조에 따라 달라진다고 밝혀졌다 (Silver et al., 1982). 또한 organic nitriles를 투여한 마우스의 혈청에서 thiocyanate ion이 검출되었는데, 이 결과는 organic nitriles로부터 생성된 cyanide ion이 thiocyanate ion으로 전환될 수 있음을 뒷받침한다 (Stea, 1952). 뿐만 아니라 organic thiocyanates는 글루타치온과 결합한 후 대사되어 cyanide ion을 생성하는 것이 확인되었다 (Hideo and Casida, 1971). 본 연구에서는 organic nitriles와 organic thiocyanates가 거의 검출되지 않은데 비해 thiocyanate ion과 cyanide ion의 농도는 상대적으로 높게 측정되었다. 이는 글루코시놀레이트 유기대사산물의 대사속도가 상대적으로 빨라서 본 연구에서 측정할 다섯 시간 내에 thiocyanate ion과 cyanide ion으로 거의 대사되었기 때문에 나타난 결과로 추정된다. 더불어 아직 대사가 완료되지 않은 organic nitriles와 cyanide ion으로부터 thiocyanate ion이 추가로 생성될 수 있다고 판단할 수 있다.

Progoitrin군에서는 대사산물 중 organic isothiocyanates의 농도가 가장 높게 측정되었다.  $\beta$ -탄소에 hydroxyl기가 있는 progoitrin의 경우



가수분해 시 자연적으로 고리화가 진행되어 5-oxazolidine-2-thione (goitrin)이 생성된다 (Kjaer et al., 1959). Goitrin은 thiocyanate ion과 함께 갑상선에 부정적인 효과를 가지는 것으로 알려진 물질로 동물실험을 통해 간과 갑상선의 무게를 증가시키며, 갑상선 호르몬의 합성을 방해한다고 보고되었다 (Nishie and Daxenbichler, 1982, Fenwick and Heaney, 1983). Goitrin과 유사하게 thiocyanate ion도 갑상선종발생에 영향을 끼치지만, 요오드 보충으로 그 영향을 완화시킬 수 있다. 이에 반해 goitrin의 반갑상선 영향은 요오드 보충으로 완화시킬 수 없다. 따라서 goitrin은 매우 강력한 반갑상선 물질 중 하나로 간주되고 있다 (Fenwick and Heaney, 1983).

Glucoerucin군에서는 갑상선종발생에 영향을 끼치는 물질의 생성이 상대적으로 적은 편이다. 뿐만 아니라 thiocyanate ion과 cyanide ion은 낮은 농도로 검출된 반면, organic nitriles는 적지 않은 농도가 생성되었으므로 glucoerucin의 대사가 다른 글루코시놀레이트에 비해 상대적으로 느리다고 추측할 수 있다. Sinigrin, glucotropaeolin군의 경우 다른 실험군에 비해 글루코시놀레이트 투여 다섯 시간 내에 생성된 thiocyanate ion의 농도가 유의하게 높았다. 이는 결사슬 구조가 각각 allyl과 benzyl기인 sinigrin과 glucotropaeolin이 대사되어 thiocyanate ion을 생성할 때, 비교적 안정한 탄소 양이온을 형성할 수 있기 때문에 나타난 결과로 보여진다. Progoitrin군의 경우 다른 실험군에 비해 organic isothiocyanates (goitrin)가 눈에 띄게 많이 생성되었다. 이는 goitrin의 고리형 구조가 글루타치온과의 반응속도를 느리게 하므로 파괴속도 또한 지연되어 높은 농도로 검출된 것으로 보인다. 또한 goitrin은 갑상선에 반영양적인 영향을 미치는 강력한 물질이므로 지연된 파괴속도가 반영양적

영향을 더 악화시킬 것으로 예상된다.

본 연구에서 소량의 organic nitriles가 progoitrin, glucoerucin군에서 검출되었으며, organic thiocyanates는 모든 군에서 검출되지 않았다. 그러나 organic isothiocyanates와 thiocyanate ion은 모든 군에서 검출되었다. McGregor (1978)는 *Brassica napus*, *Brassica campestris* rapeseed, *Brassica juncea* mustard를 yellow mustard (*Brassica hirta*) myrosinase와 반응시킨 실험에서 organic isothiocyanates, goitrin과 함께 thiocyanate ion이 생성되는 것을 확인하였다. 총 22종류의 식물체로부터 생성된 글루코시놀레이트 분해산물의 양을 살펴보면 organic isothiocyanates 4.9~131.2  $\mu\text{mol}$ , goitrin 3.3~91.0  $\mu\text{mol}$ , thiocyanate ion 5.4~13.1  $\mu\text{mol}$ 로 다양했다. 22 종류 중 19 종류의 식물체에서는 organic isothiocyanates의 검출량이 thiocyanate ion의 검출량 보다 높았다. 또한 17 종류의 식물체에서는 goitrin의 검출량이 thiocyanate ion의 검출량 보다 높았다. Organic isothiocyanates와 goitrin 검출량의 합은 모든 식물체에서 thiocyanate ion의 검출량 보다 높았다. 동물모델을 이용한 본 실험에서도 동일한 대사산물들이 관찰되었다. Progoitrin군의 경우 goitrin의 농도가 thiocyanate ion 보다 높게 측정되었으므로 선행연구와 비슷한 경향을 보였다. 하지만 본 실험의 나머지 실험군에서는 thiocyanate ion의 농도가 organic isothiocyanates 보다 훨씬 높게 측정되었다. 이는 동물모델을 사용한 본 연구에서 투여 다섯 시간 내에 생성된 goitrin 외 organic isothiocyanates가 대사과정을 거친 후 거의 파괴되었기 때문에 발생한 차이라고 보여진다. 뿐만 아니라 본 연구에서는 식물체 내 myrosinase의 작용 없이 글루코시놀레이트 대사체가 형성되었다는 점에서 선행연구와 차이가 있다.

국내에서 다량 소비되는 십자화과 식물 중 본 연구에서 사용된 글루코시놀레이트가 함유되어 있는 식물에는 배추, 유채, 겨자, 브로콜리, 콜리플라워, 케일, 양배추가 있다 (한혜정, 2009, 박한울, 2012, Tian et al., 2005, Sasaki et al., 2012, Kim et al., 2010). Sinigrin은 겨자 잎 생중량 g당 21.1  $\mu\text{mol}$ , 브로콜리 꽃 생중량 g당 1.5E-03  $\mu\text{mol}$ , 콜리플라워 꽃 생중량 g당 0.4  $\mu\text{mol}$ , 케일 잎 생중량 g당 1.1  $\mu\text{mol}$ , 양배추 생중량 g당 0.6  $\mu\text{mol}$ 이 포함되어 있다. Progoitrin은 유채 싹 생중량 g당 6.1  $\mu\text{mol}$ , 배추 잎 생중량 g당 1.1  $\mu\text{mol}$ , 브로콜리 꽃 생중량 g당 8.8E-04  $\mu\text{mol}$ , 콜리플라워 꽃 생중량 g당 8.6E-02  $\mu\text{mol}$ , 케일 잎 생중량 g당 0.3  $\mu\text{mol}$ , 양배추 생중량 g당 0.4  $\mu\text{mol}$ 이 포함되어 있다. Benzyl 글루코시놀레이트는 배추 잎 생중량 g당 0.13~0.24  $\mu\text{mol}$ 이 포함되어 있다. Glucoerucin은 배추 잎 생중량 g당 0.5  $\mu\text{mol}$ , 브로콜리 꽃 생중량 g당 1.0E-02  $\mu\text{mol}$ , 콜리플라워 꽃 생중량 g당 2.6E-02  $\mu\text{mol}$ 이 포함되어 있다. 각 식물체의 국내 평균 섭취량을 고려하면, 하루에 sinigrin 18.6  $\mu\text{mol}$ , progoitrin 15.6  $\mu\text{mol}$ , glucotropaeolin 1.5~2.7  $\mu\text{mol}$ , glucoerucin 5.7  $\mu\text{mol}$ 을 섭취하는 셈이다. 본 연구에서 sinigrin, glucotropaeolin을 투여한 랫드의 혈중으로부터 고 농도의 thiocyanate ion이 검출되었으며, progoitrin을 투여한 랫드의 혈중에서는 고 농도의 goitrin이 검출되었다. 따라서 국내 섭취량이 높은 편인 sinigrin과 progoitrin으로부터 갑상선종 발생 물질이 생성될 가능성이 크다고 보여진다. 특히 겨자에는 sinigrin이 다량 포함되어 있으므로 겨자의 섭취 시 반갑상선 물질이 생성될 가능성이 높다. 더불어 배추에는 소량의 progoitrin과 glucotropaeolin이 함유되어 있지만, 국내 섭취량이 제법 높은 편이므로 이에 따른 반갑상선 물질의 생성 가능성도 간과할 수 없다.

식품 가공 조건에 따른 글루코시놀레이트의 분해양상을 살펴보면 (박한울, 2012), 식품 내 산도, 온도와 같은 환경에 따라 분해산물의 생성 패턴이 다양하다는 것을 알 수 있다. Sinigrin은 산성과 중성조건에서 모두 organic isothiocyanates로 우세하게 분해되는 경향을 보였다. Progoitrin은 산성과 중성조건에서 모두 organic nitriles가 우세하게 생성되었다. 가열 조건에서는 효소의 불활성화로 인해 분해산물의 생성이 대체로 현저하게 낮아졌지만, organic nitriles보다 organic isothiocyanates의 감소폭이 더 컸으므로 주로 organic nitriles가 생성되는 것으로 확인되었다. 따라서 산성과 중성 조건에서 가공을 거친 sinigrin의 섭취 시, organic isothiocyanates가 다량 함유되어 있으므로 thiocyanate ion에 노출될 가능성이 줄어들 수 있다. 동일한 조건의 progoitrin을 섭취하는 경우 organic nitriles가 다량 함유되어 있어서 goitrin에 노출될 가능성은 줄어들지만, 대사과정에서 thiocyanate ion이 생성될 수 있으므로 갑상선종 발생 물질에 의한 반갑상선 영향에는 변화가 없을 것으로 보인다. 가열과정을 거친 sinigrin 혹은 progoitrin의 섭취 시에는 글루코시놀레이트가 거의 분해되지 않았기 때문에 대사 과정에서 고농도의 thiocyanate ion 혹은 goitrin에 노출될 가능성이 크다. 또한 가열 과정에서 생성된 소량의 organic nitriles로부터 thiocyanate ion이 생성될 수 있으므로 갑상선종 발생 물질의 생성에는 거의 변화가 없을 것으로 보인다. 뿐만 아니라 선행연구에 따르면 progoitrin이 발효 과정을 거칠 경우 다량의 goitrin이 생성되는 것으로 관찰되었다. 그러므로 발효 과정을 거친 progoitrin의 섭취 시 goitrin에 의한 반갑상선 영향이 더 증가할 것으로 보인다. 가공 조건에 따른 글루코시놀레이트 분해양상을 종합해 보면, sinigrin이 다량 포함되어 있는 식물체의 섭취 시 가열조리를 피함으로써 thiocyanate ion의 생성 가능성을 감소시킨다면 이에 따른 반갑상선 영향도

줄어들 것으로 보인다. Progoitrin의 경우에는 산성, 중성조건과 가열, 발효과정에서 thiocyanate ion과 goitrin의 발생 가능성을 피할 수 없다. 따라서 progoitrin이 다량 함유되어 있는 식물체를 섭취하는 경우 가공과정을 통해 글루코시놀레이트에 의한 반갑상선 영향을 감소시키는 것은 쉽지 않을 것으로 보인다.

### 3. 글루코시놀레이트 투여에 따른 갑상선 호르몬 변화

글루코시놀레이트의 단회 투여가 갑상선 호르몬 변화에 영향을 미치는지 알아 보기 위해 혈중 총  $T_3$ ,  $T_4$ 의 농도를 측정하였다. Sinigrin, glucotropaeolin군에서  $T_3$ 의 농도가 감소하였는데, 이는 thiocyanate ion의 영향을 받은 것으로 보인다. Progoitrin군에서는  $T_3$ ,  $T_4$ 의 농도가 모두 감소하였는데, goitrin의 영향을 받은 것으로 보인다. Glucoerucin군에서는 갑상선종발생에 영향을 미치는 물질이 적게 생성되었음에도 불구하고  $T_4$ 의 농도가 감소하였다. 이처럼 갑상선 호르몬 농도에 변화가 감지되었지만 대조군과 실험군간의 유의적 차이는 나타나지 않았으므로 글루코시놀레이트가 갑상선 호르몬에 미치는 영향에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다 (Table 5).

**Table 5. Serum T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> levels of rats treated with glucosinolates**

|                        | Control     | Sinigrin    | Progoitrin  | Glucoerucin | Glucotropaeolin |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| T <sub>3</sub> (ng/ml) | 1.59 ± 0.95 | 1.27 ± 0.29 | 1.42 ± 0.46 | 1.95 ± 0.31 | 1.59 ± 0.69     |
| T <sub>4</sub> (µg/dl) | 3.39 ± 1.30 | 4.22 ± 2.28 | 1.60 ± 0.62 | 1.11 ± 0.78 | 3.68 ± 1.91     |

#### 4. 장기 중량 측정 및 혈액 생화학적 검사

체중 100 g당 간의 중량은  $3.77 \pm 0.35$  g으로 글루코시놀레이트 투여 5시간 후 Wistar rat 간 조직의 중량에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

혈액 생화학적 검사 결과, 감마글루타밀 전이효소 (GGT), 알라닌 아미노기 전이효소 (ALT), 아스파테이트 아미노기 전이효소 (AST), 알칼리 인산분해효소 (ALP), 총 빌리루빈 (TBIL), 크레아틴 인산효소 (CPK), 크레아티닌 (CRE)의 농도에서 각 군간의 유의적 차이가 발견되지 않았다. 혈액 요소 질소 (Blood urea nitrogen: BUN)의 측정 결과는 progointrin, glucoerucin군의 농도가 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다. 그러나 혈액요소질소 (BUN)와 함께 신장질환 관련 지표로 활용되는 크레아티닌 (CRE)의 농도에서는 실험군과 대조군 간의 유의한 차이가 발견되지 않았다. 따라서 글루코시놀레이트 투여와 신장 기능 사이의 좀 더 신중한 이해가 필요하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다 (Table 6).



**Table 6. Serum biochemistry of rats treated with glucosinolates**

|             | Control     | Sinigrin    | Progoitrin  | Glucoerucin | Glucotropaeolin |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| GGT(U/L)    | 3.8 ± 0.4   | 16.0 ± 24.7 | 6.0 ± 4.8   | 5.6 ± 4.8   | 3.8 ± 1.1       |
| ALT(U/L)    | 19.4 ± 7.0  | 23.8 ± 8.5  | 19.6 ± 4.3  | 17.2 ± 4.5  | 17.4 ± 1.8      |
| AST(U/L)    | 80.4 ± 46.0 | 95.2 ± 22.0 | 84.4 ± 27.5 | 75.6 ± 17.1 | 58.6 ± 12.5     |
| ALP(U/L)    | 576 ± 190   | 720 ± 81    | 653 ± 180   | 555 ± 89    | 857 ± 290       |
| TBIL(mg/dl) | 0.5 ± 0.5   | 1.5 ± 0.7   | 1.1 ± 0.9   | 1.1 ± 0.7   | 0.7 ± 0.3       |
| CPK(U/L)    | 260 ± 357   | 268 ± 68    | 208 ± 125   | 215 ± 45    | 137 ± 53        |
| BUN(mg/dl)  | 13.2 ± 5.6  | 17.7 ± 2.3  | 20.5 ± 5.1* | 21.5 ± 3.3* | 11.1 ± 1.3      |
| CRE(mg/dl)  | 0.3 ± 0.1   | 0.4 ± 0.4   | 0.2 ± 0.0   | 0.3 ± 0.1   | 0.3 ± 0.1       |

\* Significant differences in comparison with the control ( $p < 0.05$ )

## V. 요약 및 결론

본 연구는 국내에서 다량 소비되는 글루코시놀레이트를 구조에 따라 분류하여 선택한 4종의 글루코시놀레이트 (sinigrin, progoitrin, glucoerucin, glucotropaeolin)를 Wistar rat에 경구투여 한 뒤 흡수된 대사산물의 농도를 혈청에서 측정하였다. 이를 통해 결사슬 구조에 따른 글루코시놀레이트의 흡수 및 대사를 비교했다는 점에 본 연구의 의의가 있다.

Sinigrin, glucoerucin, glucotropaeolin군에서 대사산물 중 thiocyanate ion의 농도가 가장 높게 측정되었다. Organic nitriles와 organic thiocyanates가 대사과정을 거치면 thiocyanate ion이 생성되는데, 이들의 대사속도가 상대적으로 빠르기 때문에 다섯 시간 내에 thiocyanate ion과 cyanide ion으로 거의 대사된 것으로 보인다. 또한 대사가 완료되지 않은 organic nitriles와 cyanide ion으로부터 추가적인 thiocyanate ion이 생성될 가능성이 있다고 보여진다. 특히 sinigrin과 glucotropaeolin군에서 유의하게 높은 thiocyanate ion이 측정되었는데, 이는 글루코시놀레이트 결사슬 구조가 안정한 탄소 양이온을 형성할 수 있기 때문에 나타난 결과라고 추측할 수 있다.

Progoitrin군에서는 isothiocyanates (goitrin)의 농도가 유의하게 높게 측정되었는데, goitrin은 thiocyanate ion과 함께 갑상선종발생에 영향을 미치는 물질로 잘 알려져 있다. Goitrin은 고리형 구조를 가지고 있기 때문에 다른 organic isothiocyanates에 비해 파괴속도가 지연되어 높은 농도로 검출된 것으로 보인다. 더불어 느린 파괴속도 때문에 갑상선에

미치는 반영양적 영향이 더 악화될 것으로 사료된다.

Glucoerucin군에서는 다른 군에 비해 갑상선종발생에 영향을 미치는 물질의 생성이 낮은 편이었다. 뿐만 아니라 thiocyanate ion과 cyanide ion은 낮은 농도로 검출된 것에 비해 organic nitriles는 적지 않은 농도로 검출되었다. 이를 통해 glucoerucin의 대사가 느리다는 것을 알 수 있다.

본 연구를 통해 글루코시놀레이트의 구조에 따라 생성된 대사산물들이 흡수되어 혈액 내에 다양한 비율로 분포하는 것이 확인되었다. 뿐만 아니라 갑상선으로 요오드가 유입되는 과정을 방해하는 thiocyanate ion이 체내에서 빠른 속도로 전환되는 것이 발견되었다. 이를 통해 요오드의 동시투여가 thiocyanate ion에 의해 유도되는 T<sub>3</sub> 결핍으로부터 보호하는데 도움이 된다는 실험 결과를 설명할 수 있다. 또한 식물체 내의 myrosinase 작용 없이도 반갑상선 작용을 하는 thiocyanate ion과 goitrin이 생성될 수 있음이 동물모델을 통해 확인되었다. 그러므로 조리를 통한 myrosinase의 불활성화는 십자화과 식물 내에 존재하는 글루코시놀레이트의 반영양적 효과에 영향을 주지 못할 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 네 가지의 글루코시놀레이트 중 sinigrin은 겨자에 다량 함유되어 있는 물질로 국내에서 섭취량이 높은 편이다. Progoitrin은 배추에 소량 함유되어 있지만 배추의 국내 섭취량이 높은 편이므로 결과적으로 progoitrin의 국내 섭취량도 높은 편이다. 이들 식물체는 가공조건을 거친 후 섭취될 경우 여전히 갑상선종 발생 물질의 생성 가능성이 상당하다. 따라서 sinigrin과 progoitrin에 의한 반갑상선 영향을 줄이기 위해 가공 및 조리법 개선에 대한 연구가 필요할 것이다.

## VI. 참고문헌

박한울, 식품 가공 조건에 따른 십자화과 식물의 글루코시놀레이트 분해산물 연구. *서울대학교 대학원 식품영양학과 석사학위논문* 2012.

심기환; 강갑석; 안철우; 서권일, 무의 glucosinolate 와 indole glucosinolate 열분해산물의 함량분석. *한국응용생명화학회지 (구 한국농화학회지)* 1993, 36 (1), 23-28.

한혜정, 십자화과 식물에 함유되어 있는 thiocyanate 분석을 통한 한국인의 thiocyanate 섭취량 측정. *서울대학교 대학원 식품영양학과 석사학위논문* 2009.

Astwood, E., The chemical nature of compounds which inhibit the function of the thyroid gland. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1943, 78 (1), 79-89.

Bhandari, R. K.; Oda, R. P.; Youso, S. L.; Petrikovics, I.; Bebart, V. S.; Rockwood, G. A.; Logue, B. A., Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in plasma by chemical ionization gas chromatography mass-spectrometry (CI-GC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 404 (8), 2287-2294.

Brusewitz, G.; Cameron, B.; Chasseaud, L.; Gorler, K.; Hawkins, D.; Koch, H.; Mennicke, W., The metabolism of benzyl isothiocyanate and

its cysteine conjugate. *Biochem. J* **1977**, *162*, 99–107.

Burow, M.; Bergner, A.; Gershenzon, J.; Wittstock, U., Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*—identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant Molecular Biology* **2007**, *63* (1), 49–61.

Chung, F.-L.; Morse, M. A.; Eklind, K. I., New potential chemopreventive agents for lung carcinogenesis of tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Research* **1992**, *52* (9 Supplement), 2719s–2722s.

Cole, R. A., Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. *Phytochemistry* **1976**, *15* (5), 759–762.

Conaway, C. C.; Jiao, D.; Kohri, T.; Liebes, L.; Chung, F.-L., Disposition and pharmacokinetics of phenethyl isothiocyanate and 6-phenylhexyl isothiocyanate in F344 rats. *Drug Metabolism and Disposition* **1999**, *27* (1), 13–20.

Cottaz, S.; Henrissat, B.; Driguez, H., Mechanism-based inhibition and stereochemistry of glucosinolate hydrolysis by myrosinase. *Biochemistry* **1996**, *35* (48), 15256–15259.

Daxenbichler, M. E.; VanEtten, C. H.; Williams, P. H., Glucosinolate products in commercial sauerkraut. *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry* **1980**, *28* (4), 809–811.

Erdoğan, M. F., Thiocyanate overload and thyroid disease. *Biofactors* **2003**, *19* (3), 107–111.

Fahey, J. W.; Zalcmann, A. T.; Talalay, P., The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **2001**, *56* (1), 5–51.

Fenwick, G.; Heaney, R., Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. *Food Chemistry* **1983**, *11* (4), 249–271.

Fenwick, G. R.; Heaney, R. K.; Mullin, W. J.; VanEtten, C. H., Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **1982**, *18* (2), 123–201.

Griffiths, D. W.; Deighton, N.; Birch, A. N. E.; Patrian, B.; Baur, R.; Städler, E., Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. *Phytochemistry* **2001**, *57* (5), 693–700.

Heaney, R. K.; Fenwick, G. R., Natural toxins and protective factors in Brassica species, including rapeseed. *Natural Toxins* **1995**, *3* (4), 233–237.

Hideo, O.; Casida, J. E., Glutathione S-transferases liberate hydrogen cyanide from organic thiocyanates. *Biochemical Pharmacology* **1971**, *20* (7), 1708–1711.

Holst, B.; Williamson, G., A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Natural Product Reports* **2004**, *21* (3), 425–447.

ISO norm, Rapeseed– Determination of glucosinolate content–Part 1: Method using high–performance liquid chromatography. *International Organization for Standardization* **1992**, *ISO 9167–1*, 1–9.

Kim, J. K.; Chu, S. M.; Kim, S. J.; Lee, D. J.; Lee, S. Y.; Lim, S. H.; Ha, S.–H.; Kweon, S. J.; Cho, H. S., Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Food chemistry* **2010**, *119* (1), 423–428.

Kjaer, A.; Christensen, B.; Hansen, S., Isothiocyanates 34. The absolute configuration of (–)-5-vinyl-2-oxazolidinethione (goitrin) and its glucosidic progenitor (progoitrin). *Acta Chemica Scandinavica* **1959**, *13* (1), 144–150.

Lüthy, J.; Benn, M., Thiocyanate formation from glucosinolates: a study of the autolysis of allylglucosinolate in *Thlaspi arvense* L. seed flour extracts. *Canadian Journal of Biochemistry* **1977**, *55* (10), 1028–1031.

Maskell, I.; Smithard, R., Degradation of glucosinolates during in vitro incubations of rapeseed meal with myrosinase (EC 3.2. 3 1) and with pepsin (EC 3.4. 23. 1)-hydrochloric acid, and contents of porcine small intestine and caecum. *British Journal of Nutrition* **1994**, *72* (03), 455–466.

McGregor, D., Thiocyanate ion, a hydrolysis product of glucosinolates from rape and mustard seed. *Canadian Journal of Plant Science* **1978**, *58* (3), 795–800

Mennicke, W.; Kral, T.; Krumbiegel, G.; Rittmann, N., Determination of N-acetyl-S-(N-alkylthiocarbamoyl)-L-cysteine, a principal metabolite of alkyl isothiocyanates, in rat urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1987**, *414*, 19–24.

Michaelsen, S.; Otte, J.; Simonsen, L.-O.; Sørensen, H., Absorption and degradation of individual intact glucosinolates in the digestive tract of rodents. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science* **1994**, *44* (1), 25–37.

Nishie, K.; Daxenbichler, E., Hepatic effects of R-goitrin in sprague-dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* **1982**, *20* (3), 279–287.

Papas, A.; Ingalls, J.; Campbell, L., Studies on the effects of rapeseed



meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *The Journal of Nutrition* **1979**, *109* (7), 1129–1139.

Rochfort, S.; Caridi, D.; Stinton, M.; Trenerry, V. C.; Jones, R., The isolation and purification of glucoraphanin from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1120* (1–2), 205–10.

Rosa, E.; Heaney, R.; Fenwick, G.; Portas, C., Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews, Volume 19* **1997**, 99–215.

Sasaki, K.; Neyazaki, M.; Shindo, K.; Ogawa, T.; Momose, M., Quantitative profiling of glucosinolates by LC–MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane. *Journal of Chromatography B* **2012**, *903*, 171–176.

Shapiro, T. A.; Fahey, J. W.; Wade, K. L.; Stephenson, K. K.; Talalay, P., Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2001**, *10* (5), 501–508.

Silver, E.; Kuttub, S.; Hasan, T.; Hassan, M., Structural considerations in the metabolism of nitriles to cyanide in vivo. *Drug Metabolism and*

*Disposition* **1982**, *10* (5), 495–498.

Slominski, B.; Campbell, L.; Stanger, N., Influence of cecectomy and dietary antibiotics on the fate of ingested intact glucosinolates in poultry. *Canadian Journal of Animal Science* **1987**, *67* (4), 1117–1124.

Slominski, B. A.; Campbell, L. D.; Stanger, N. E., Extent of hydrolysis in the intestinal tract and potential absorption of intact glucosinolates in laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1988**, *42* (4), 305–314.

Song, L.; Iori, R.; Thornalley, P. J., Purification of major glucosinolates from *Brassicaceae* seeds and preparation of isothiocyanate and amine metabolites. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86* (8), 1271–1280.

Stea, K., The effect of thyroxine administration on the formation of thiocyanate from acetonitrile in mice. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **1952**, *8* (3), 263–270.

Talalay, P.; Fahey, J. W., Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *The Journal of Nutrition* **2001**, *131* (11), 3027S–3033S.

Terry, P.; Wolk, A.; Persson, I.; Magnusson, C., Brassica vegetables

and breast cancer risk. *Jama* **2001**, *285* (23), 2975–2977.

Tian, Q.; Rosselot, R. A.; Schwartz, S. J., Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* **2005**, *343* (1), 93–99.

Tookey, H., Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC 3.2. 3.1): separation of a protein required for epithiobutane formation. *Canadian Journal of Biochemistry* **1973**, *51* (12), 1654–1660.

Tripathi, M.; Mishra, A., Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* **2007**, *132* (1), 1–27.

Van Staden, J.; Botha, A., Spectrophotometric determination of thiocyanate by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *403* (1), 279–286.

Visentin, M.; Tava, A.; Iori, R.; Palmieri, S., Isolation and identification of trans-4-(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish roots (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, *40*, 1687–1691.

Ye, L.; Dinkova-Kostova, A. T.; Wade, K. L.; Zhang, Y.; Shapiro, T. A.;

Talalay, P., Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica Chimica Acta* **2002**, *316* (1), 43–53.

Zhang, Y., The 1, 2-benzenedithiole-based cyclocondensation assay: a valuable tool for the measurement of chemopreventive isothiocyanates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2012**, *52* (6), 525–532

## **Abstract**

### **Determination of goitrogenic metabolites in the serum of male Wistar Rat fed structurally different glucosinolates.**

Eun-ji Choi

Department of Food and Nutrition

The graduate school

Seoul National University

Glucosinolates (GLSs) are abundant in cruciferous vegetables and reported to have anti thyroidal effects. Four GLSs (sinigrin, progoitrin, glucoerucin, and glucotropaeolin) were administered orally to rats, and the breakdown products of GLSs (GLS-BPs: thiocyanate ions, cyanide ions, organic isothiocyanates, organic nitriles, and organic thiocyanates) were measured in serum. Thiocyanate ions were measured by colorimetric method, and cyanide ions were measured with CI-GC-MS. Organic isothiocyanates and their metabolites were measured with the cyclocondensation assay. Organic nitriles and organic thiocyanates were measured with EI-GC-MS. In all

treatment groups except for progoitrin, thiocyanate ions were the highest among the five GLS-BPs. In the progoitrin treated group, a high concentration of organic isothiocyanates (goitrin) was detected. In the glucoerucin treated group, a relatively low amount of goitrogenic substances was observed. The metabolism to thiocyanate ions happened within five hours of the administration, and the distribution of GLSs varied with the side chain. GLSs with side chains that can form stable carbocation seemed to facilitate the degradation reaction and produce a large amount of goitrogenic thiocyanate ions. Because goitrogenic metabolites can be formed without myrosinase, the inactivation of myrosinase during cooking would have no effect on the anti-nutritional effect of GLSs in cruciferous vegetables.

#### Keywords

Glucosinolates, goitrogenic metabolites, thiocyanate ions, goitrin, thyroid

Student number: 2012-23548