

Thin Layer Chromatography 法에 의한 α -Solanine의 定量

崔 銀 玉 · 安 承 堯

서울대학교 食品營養學科
(1981년 12월 15일 수리)

Thin Layer Chromatographic Determination of α -Solanine

Eun-Ok Choe · Seung-Yo Ahn

Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul, Korea

Abstract

The thin layer chromatographic determination of α -solanine in potato tuber was investigated. The solanine was extracted with methanol-chloroform mixture (2:1, v/v), and precipitated as the crude glycoalkaloid by the addition of ammonium hydroxide. The solanine in the crude precipitate was separated by TLC using a solvent system of 1% NH_4OH -absolute ethanol-chloroform (1:2:2, v/v). The purity of α -solanine was confirmed by infrared spectrophotometry. The α -solanine separated by TLC was determined at the wavelength of 310nm after coloration with concentrated sulfuric acid-1% paraformaldehyde, with the molar absorptivity of 2,090.

緒 論

감자(*Solanum tuberosum* L.)는 우리나라를 비롯하여 유럽 등지에서 옛부터 주요한 食糧資源으로 利用되고 있는 食品이지만, 貯藏 條件에 따라서 貯藏中 solanine이 多量 蓄積되어 發生하는 中毒事故가 問題視되어왔다.^{1~4)}

1826年 Baup⁵⁾에 의해 처음 發見된 solanine은 질소를 함유한 steroid 配糖體로서 감자의 여러 部位(塊莖, 싹, 꽃)에서 發見된다. 지금까지 α -, β -, γ -solanine과 α -, β -, γ -chaconine 등이 發見되고 있는데, 감자中에는 α -solanine과 α -chaconine이 95% 이상 함유되어 있다.^{6,7)}

Solanine은 發見 초기, 쓴 맛과 嘔吐 등의 消化

器 障碍를 유발시키는 物質로 알려져 왔으나, 최근 들어 teratogen으로 作用할 수 있다는 가능성이 報告됨에^{8~12)} 따라 solanine은 더욱 관심을 끌게 되었다.

Solanine은 그 發見이래 주로 wet chemical method^{13~23)}에 의해서 抽出, 定量되어 왔는데, 특히 Fitzpatrick 등²³⁾의 chloroform-methanol system을 利用한 bisolvent extraction method는 代表的이라 하겠다. 이 方法은 별다른 기구없이 實施할 수 있다는 장점은 있으나 抽出 時間이 길고 實驗의 簡素化를 위한 方法으로 α -solanine과 α -chaconine을 포함한 총 글리코알칼로이드(total glycoalkaloid: TGA)로써 定量하고 있다. α -solanine과 α -chaconine의 個別定量方法으로는 gas chromatography(GC)⁵⁾나, high performance

liquid chromatography (HPLC)²⁴⁾ 등이 있으나, methylation 등의 조작을 거쳐 GA 유도체로 만들어야 하는 번거로움 이외에도 設備나 費用面에서 여러가지 制約이 따르게 된다.

그러나 食品中の 毒性成分의 含量뿐만 아니라, 곤충과 병균에 對한 耐病虫害²⁵⁾ 品種 감자의 育種學的인 面에서 solanine의 定量은 重要하므로 좀더 간편하고 신속한 方法의 確立이 要求된다 하겠다.

本 研究에서는 Bushway 등¹³⁾의 抽出 過程을 수정하여 solanine 중 毒性이 잘 알려진¹⁾ α -solanine을 thin layer chromatography (TLC) 法에 의해 分離, 定量하는 方法을 모색하고 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

本 實驗에 使用된 감자는 1981년에 收穫된 것으로 重量이 40~60g의 것을 닦아 陰乾하여 使用하였다.

Standard α -solanine과 α -solanine 및 α -chaconine의 混合物은 Rodney J. Bushway(University of Maine at Orono, USA)로부터 얻었다.

2. Glycoalkaloid의 抽出

감자中の glycoalkaloid(GA)의 抽出은 Bushway 등의 方法¹³⁾에 준하여 용매 system을 달리하여 Fig. 1과 같이 抽出하였다.

감자 試料 50g에 methanol-chloroform (2 : 1 v/v) 混合溶液 200ml를 3회에 나누어 마쇄하여 濾過시킨 후, 침전을 용매로 씻어 濾液을 250ml로 만들었다. 이 중 50ml를 50~55°C에서 약 半量(20~30ml)으로 減壓濃縮하였다. 여기에 0.2N HCl 용액 20ml를 加한 後 3분간 sonication하고 이를 遠心分離(25,000rpm, 4°C, 10min.)하여 색소물질을 비롯한 不純物을 제거하였다. 여기에서 얻어진 상등액에 진한 암모니아 용액 약 25ml를 加하여 pH 10.5~11.0으로¹⁴⁾ 조절하여 GA를 沈澱시켰다. 沈澱을 촉진시키기 위하여 70°C water bath에서 20분간 가열한 후 ice bath를 이용하여 2시간 동안 冷却시켰다. 다시 遠心分離(25,000 rpm, 4°C, 10min.)에 의해 沈澱을 收集한 후 室溫에서 하룻밤 風乾하여 침전에 남아있는 암모니아를 제거하였다. 얻어진 沈澱을 methanol (99.6

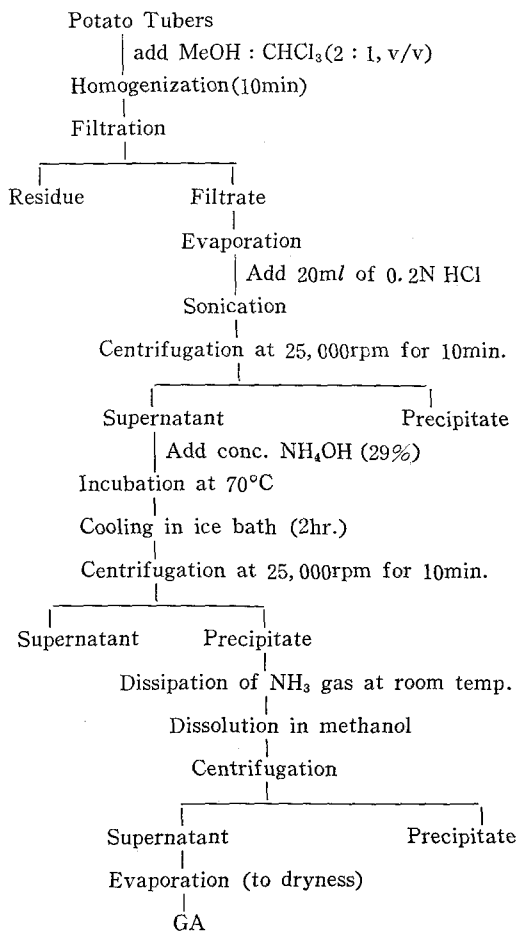


Fig. 1. Extraction of glycoalkaloid from potato tubers

%) 20ml에 용해시켜 遠心分離(5,000rpm, 20°C, 10min.)한 후 上澄液 10ml를 취하여 40~45°C에서 증발시켜 GA의 침전을 얻었다.

3. Thin layer chromatography에 의한 α -solanine의 同定

앞에서 얻은 glycoalkaloid 침전을 methanol (99.6%)에 녹여, 이 溶液을 standard α -solanine 및 α -chaconine 溶液과 함께 silica gel plate에 帶狀으로 塗附하여 table 1의 용매로 展開시켰다.

전개가 끝난 plate는 꺼내어 風乾시킨 後 4% H₂SO₄ 용액으로 분무하고 이를 120~130°C 건조기에서 20분간 發色시켰다. 발색된 plate로부터 standard α -solanine 및 α -chaconine 용액과 시료 용액의 R_f 値를 比較, 確認하였다.

Table 1. Solvent systems of thin layer chromatography for glycoalkaloid separation

| System | Composition (v/v) |
|--------------------|---|
| I | 1% NH ₄ OH-absolute ethanol-chloroform (1 : 2 : 2) |
| II ²⁶⁾ | n-butanol-formic acid-aater (4 : 1 : 5) |
| III ²⁷⁾ | 2% acetic acid-95% ethanol (1 : 3) |
| IV ²²⁾ | methanol-ethyl acetate-acetic acid-Water (20 : 30 : 10 : 1) |

4. Thin layer chromatography에 의한 α -solanine의分離

얻어진 glycoalkaloid 칩진을 앞에서와 같은 방법으로 1% NH₄OH-absolute ethanol-chloroform (Table 1)으로展開시켰다.

전개가 끝난 TLC plate는 꺼내어 風乾시킨 후 유리판으로 plate의 半을 가리고 standard 용액과 시료용액의 一部가 塗附된 부분을 4% H₂SO₄ 용액으로 분무하고 이를 120~130°C 건조기에서 20분간 發色시켰다.

분무된 한 쪽에서 나타난 α -solanine의 위치와 동일한 위치로 분무되지 않은 쪽의 α -solanine 부분을 spatula로 긁어내어 methanol (99.6%)에 녹였다. 이것을 Büchner funnel을 통하여 濾過하였으며 이 때 충분한 methanol로 용출시켰다. 濾液은 rotary evaporator로 40~45°C에서 증발시켜 α -solanine의 흰 沈澱을 얻었다.

5. Infrared spectrophotometry

TLC에 의하여 分離된 α -solanine 결정을 mortar에서 KBr과 함께 磨碎하여 pellet으로 만든 후, 이를 Perkin Elmer 283 spectrophotometer로 IR spectrum을 얻어 standard spectrum과 比較하였다.

6. Absorption spectrophotometry

α -solanine 結晶을 2.5ml 1% H₂SO₄ 용액에 녹이고 buret을 사용하여, 진한 H₂SO₄ 용액 5ml를 흔들면서 한 방울씩 加하였다. 1분 후, 1% paraformaldehyde 용액 2.5ml를 같은 방법으로 加하였다.

Baker 등¹⁴⁾의 方法에 따라 試藥 添加 90분 경과 후에 280~700nm 波長범위에서 Shimadzu UV

200 spectrophotometer로 吸收 spectrum을 求하였다. 또한 얻어진 spectrum 위에서 最大吸收波長을 求하고 이로부터 molar absorptivity를 求하였다.

7. α -Solanine의 定量

Fig. 1에 따라 抽出된 GA는 rotary evaporator에서 완전히 蒸發시킨 후 一定量의 methanol (3ml)에 녹였다. 이 중 1ml를 TLC plate에 帶狀으로 塗附하여 solvent system I으로 展開시켰다. 이 때 TLC plate의 한 쪽 끝을 비워 나머지 용액 중의 一部를 塗附하여 detection 指標로 삼았다. 展開가 끝난 plate는 꺼내어 風乾한 후 유리판으로 한 쪽을 가리고 4% H₂SO₄ 용액을 噴霧하였다. 120°C 건조기에서 20분간 發色시킨 후 發色되지 않은 solanine 부분을 spatula로 긁어내었다. 이를 methanol에 溶解시킨 후 Büchner funnel을 통하여 濾過하였다. 얻어진 濾液을 rotary evaporator로 40~45°C에서 완전히 蒸發시키고 여기에 2.5ml 1% H₂SO₄ 용액을 加하여 溶解시켰다. 여기에 진한 H₂SO₄ 용액 5ml를 buret을 使用하여 흔들면서 1방울씩 加하고 1분 후 1% paraformaldehyde 용액 2.5ml를 같은 방법으로 加하였다. 90분 放置後, 앞에서 구한 α -solanine의 最大吸收波長인 310nm에서 吸光度를 측정하여 standard curve로부터 그 농도를 求하였다.

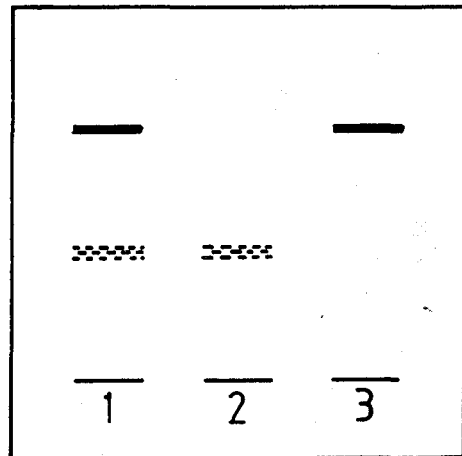


Fig. 2. Thin layer chromatogram of potato GA solvent system, absolute ethanol-CHCl₃-1% NH₄OH (2 : 2 : 1 v/v), 1 : obtained GA, 2 : α -solanine, 3 : α -chaconine

Table 2. R_f values of glycoalkaloid in various solvent systems

| glycoalkaloid | R_f values at solvent systems | | | | Color | |
|---------------------|---------------------------------|------|------|------|--------------------------------------|---|
| | I | II | III | IV | H ₂ SO ₄ spray | UV irradiation after H ₂ SO ₄ spray |
| α -Solanine | 0.26 | 0.37 | 0.80 | 0.16 | Brown | Blue |
| α -Chaconine | 0.44 | 0.42 | 0.90 | 0.30 | Brown | Blue |

8. 標準曲線의 作成

Standard α -solanine 3mg을 methanol 25ml에 溶解시켜 일정량씩(12.5ml, 6.25ml, 3ml, 2ml, 1ml) 취하여 rotary evaporator로 40~45°C에서 완전히 蒸發시켰다. 여기에 2.5ml 1% H₂SO₄ 溶液을 加하여 溶解시키고 진한 H₂SO₄ 溶液 5ml를 buret을 使用하여 흔들면서 1방울씩 加하고 1분 후 1% paraformaldehyde 용액 2.5ml를 같은 方法으로 加하였다. 이 용액을 90분 방치 후 310nm에서 吸光度를 測定하고 α -solanine의 농도와 흡광도 사이의 關係를 圖示하였다.

9. 회수를 검정

Fig. 1과 같은 方法에 의해 干자 100g을 methanol-chloroform (2:1, v/v) 혼합용매를 使用하여 얻은 抽出液을 500ml로 만들었다. 이를 250ml씩 들로 나누고 한 쪽에 standard α -solanine 3mg을 添加하였다. 그리고 각각에서 50ml씩 취하여 Fig. 1과 같이 단계적인 조작을 거쳐 GA 沉澱을 얻었다.

얻어진 crude GA 中の α -solanine을 앞의 α -solanine의 定量方法으로 定量하여 회수율을 결정하였다.

III. 結果 및 考察

1. Thin layer chromatography

試料에서 얻은 GA結晶을 一定量의 methanol에 녹여 standard α -solanine 및 α -chaconine의 혼합 溶液과 함께 帶狀으로 塗附하여 1% NH₄OH-CHCl₃-EtOH (Table 1)로 展開시킨 chromatogram은 Fig. 2와 같다.

Fig. 2와 같이 本 實驗方法으로 얻은 GA는 α -solanine과 α -chaconine의 混合物임을 알 수 있었다. 이 chromatogram의 pattern은 methanol-CHCl₃-1% NH₄OH (2:2:1, v/v)을 使用한 Bushway 등⁶⁾, CHCl₃-EtOH-1% NH₄OH (44:44:12, v/v)을 使用한 Coxon⁷⁾의 實驗結果와 유사하였다.

Table 1의 각 solvent system을 使用하여 실시

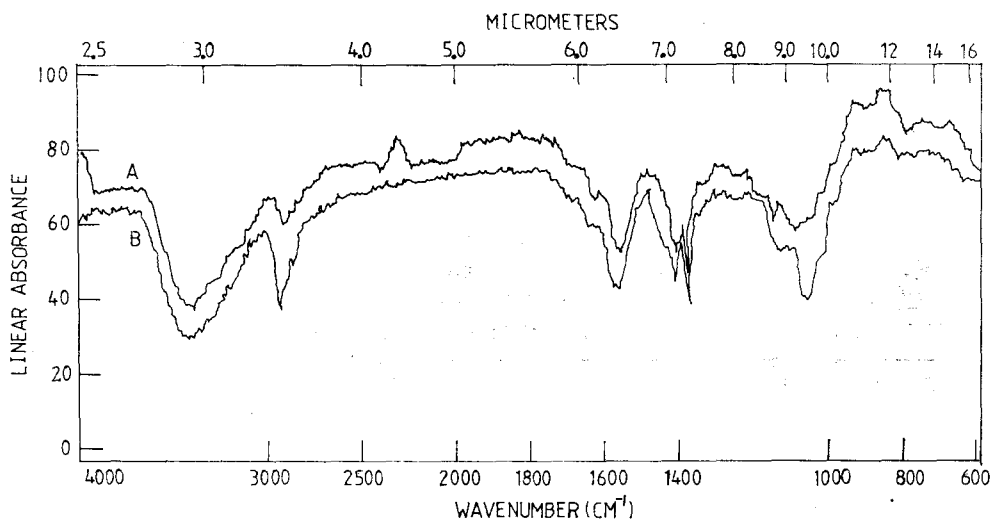


Fig. 3. Infrared spectrum of α -solanine, A: authentic α -solanine. B: obtained α -solanine

한 TLC의 R_f 값은 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 crude GA 中の α-solanine의 分離效果는 chloroform-absolute ethanol-1% NH₄OH (Table 1)의 solvent system 이 가장 우수하였다.

3. Infrared spectrophotometry

本 實驗에서 얻은 α-solanine 및 standard α-solanine의 IR spectrum은 Fig. 3과 같이 그 pattern이 대체로 일치하였다.

IR spectrum의 3400cm⁻¹의 넓은 band는 -CH와 -OH group 사이의 interaction에 의한 hydrogen bond의 stretching 이고, 2900cm⁻¹의 band는 aliphatic -CH에 의한 stretching vibration 이다. 또한 1550cm⁻¹의 band는 carbonyl group, 1400 cm⁻¹의 band는 -CH₃ group, 1390cm⁻¹의 band는

$\begin{matrix} O \\ || \\ -C-CH_3 \end{matrix}$ group, 1050cm⁻¹의 band는 secondary hydroxyl group에 의한 吸收들으로써²⁸⁾ 이 spectrum은 α-solanine 구조²⁹⁾를 잘 뒷받침하고 있다.

4. Absorption spectrophotometry

α-solanine의 1% H₂SO₄ 용액을 진한 H₂SO₄ 용액과 1% paraformaldehyde 용액 混合物(Marquis reagent)과 90분간 反應시켜 얻어진 發色溶液으로부터 얻어진 spectrum은 Fig. 4과 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 spectrum은 310nm와 380nm 근처에서 最大吸收를 가지므로 定量을 위한 모든 측정을 310nm에서 實施하였다. 尙장 310nm에서 molar absorptivity는 2090 이었다.

α-solanine과 Marquis reagent와의 棕色反應은 C₂에 double bond를 갖는 steroid nucleus (solanidine)에 매우 특이한 反應이라는 것³⁰⁾이 알려져 있을 뿐 그 이상의 mechanism은 아직 밝혀지지 않고 있다.

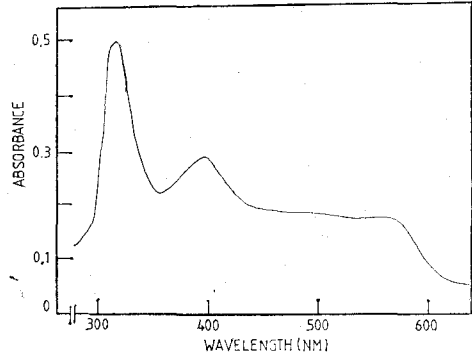


Fig. 4. Absorption spectrum of α-solanine

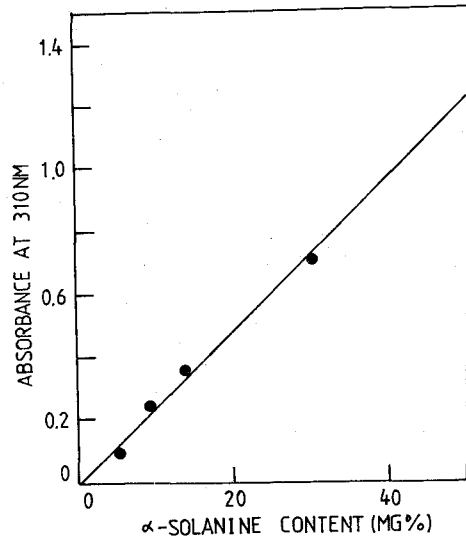


Fig. 5. Standard curve of α-solanine

Schreiber 등³¹⁾은 cholesterol 과의 構造의 類似性에 起因하여 steroidal carbonium ion의 連續的 酸化反應이라고 하였으나 최근에는 이러한 說마저 反駁되어³⁰⁾ 결국 强酸과 酸化劑의 存在 下에 oxidized carbonium ion의 特殊한 系列(specific series)을 이룬다고 理解되고 있다.

Table 3. α-Solanine recovered from potato samples with 4 mg% of α-solanine added

| Potato α-solanine mg% | Added mg% | Theoretical mg% | Measured mg% | Recovery % |
|-----------------------|-----------|-----------------|--------------|------------|
| 11.0 | 4.0 | 15.0 | 15.5 | 112.5 |
| 10.5 | 4.0 | 14.5 | 14.8 | 107.5 |
| 9.0 | 4.0 | 13.0 | 14.1 | 112.5 |
| Mean | | | | 110.8 |

5. α -solanine의 定量

각종 濃度の α -solanine 溶液을 사용하여 作成된 standard curve는 Fig. 5와 같다.

한편, 이 方法의 신뢰도를 檢證하기 위해 實施한 회수를 검정 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 平均 110.8%이었다. 따라서 감자로부터 α -solanine의 分離는 Fig. 1과 같이 여러 단계를 거치는 동안에도 손실량이 거의 없다는 것을 알 수 있다.

抄 錄

Thin-layer chromatography을 利用하여 감자 中の α -solanine의 分離, 定量方法을 모색하였다.

Methanol-chloroform (2 : 1, v/v) 혼합용매를 이용한 감자 추출액에 0.2N HCl 용액을 加하여 色素物質을 비롯한 不純物을 제거한 후 진한 암모니아 溶液을 加하여 生成된 침전을 遠心分離 (25,000rpm, 4°C, 10min.) 함으로써 solanine의 침전을 얻었다. 얻어진 solanine 침전을 1% NH₄ OH-absolute ethanol-chloroform(1 : 2 : 2, v/v)의 용매 system을 使用한 TLC로 α -solanine과 α -chaconine을 分離하였다.

分離된 α -solanine은 Infrared spectrophotometry에 의해서 純度가 確認되었다.

分離된 α -solanine을 진한 황산-1% paraformaldehyde (2 : 1, v/v) 溶液과 反應시킨 다음 310 nm에서 吸光度를 測定하여 定量하였다. α -solanine의 진한 황산-1% paraformaldehyde에 의한 發色溶液의 molar absorptivity는 2,090이었다.

參 考 文 獻

1. Jadhav, S.J. and Salnnkhe, D.K.: Adv. Food Res., 21 : 342 (1975)
2. McMillan, M. and Thompson, J.C.: Quart. J. Med., 48 : 227 (1979)
3. Orgelle, W.H., Kunda, A. Vaidya and Paul, A. Dahm.: Science, 128 : 1136 (1958)
4. Willimot, S.C.: Analyst, 58 : 431 (1933)
5. Herb, S.F., Fitzpatrick, T.J. and Osman, S.F.: J. Agric. Food Chem., 23 : 520 (1975)
6. Bushway, R.J. nad Ponnampalam, R.: J. Agric. Food Chem., 29 : 814 (1981)
7. Coxon, D.T.: J. Sci. Food Agric., 32 : 412

- (1981)
8. Allen, R.J., Marlal, R.J., Chesney, G.F., Helgeson, J.P., Kelman, A., Weckel, K.G., Traison, E. and White, J.W. Jr.: Teratology, 15 : 17 (1977)
9. Keeler, R.F., Brown, D., Douglas, D.R., Stallknecht, G.F. and Young, S.: Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15 : 522 (1976)
10. Keeler, R.F., Douglas, D.R. and Strallknecht: Am. Potato J., 52 : 125 (1975)
11. Mun, A.M., Barden, E.S., Wilson, J.M. and Hogan, J.M.: Teratology, 11 : 73 (1975)
12. Renwick, J.H.: Br. J. Prev. Soc. Med., 26 : 67 (1972)
13. Bushway, R.J., Bardn, E.S., Bushway, A. W. and Bushway, A.A.: Am. Potato J., 57 : 175 (1980)
14. Baker, L.C., Lampitt, L.H. and Meredith, O.B.: J. Sci. Food Agric., 6 : 197 (1955)
15. Gull, D.D. and Isenberg, F.M.: Am. Soc. Hort. Sci. 75 : 545 (1959)
16. Bretzloff, C.W.: Am. Potato J., 48 : 158 (1971)
17. Coxon, D.T., Price, K.R. and Jones, P.G.: J. Sci. Food Agric., 30 : 1043 (1979)
18. Fitzpatrick, T.J., Mackenzie, J.D. and Gregory, P.: Am. Potato J., 55 : 247 (1978)
19. Mackenzie, J.D. and Gregory, P.: Am. Potato J., 56 : 27 (1979)
20. Sizer, C. E., Maga, J.A. and Craven, C.J.: J. Agric. Food Chem., 28 : 578 (1980)
21. Smittle, D.A.: Am. Potato J., 48 : 410 (1971)
22. Wang, S.L., Bedford, C.L. and Thompson, N.R.: Am. Potato J., 49 : 302 (1972)
23. Fitzpatrick, T.J. and Osman, S.F.: Am. Potato J., 51 : 318 (1974)
24. Bushway, R.J., Barden, E.S., Bushway, A.W. and Bushway, A.A.: J. Chromatogr. 178 : 533 (1979)
25. Sanford, L.L. and Sinden, S.L.: Am. Potato J., 49 : 209 (1972)
26. Jellema, R., Elema, E.T. and Malingré, Th. M.: J. Chromatogr., 176 : 435 (1979)
27. Paquin, R. and Lepage, M.: J. Chromatogr.,

- 12 : 57 (1963)
28. Silverstein, R.M., Bassler, G.G. and Morrill, T.C.: Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & Sons. Inc., (1974)
29. Dalton, D.R.: The alkaloids-The fundamental chemistry-Marcel Dekker, Inc., (1979)
30. Bergers, W.W.A.: Food Chem., 6 : 123 (1980)
31. Schreiber, K., Hammer, U. Itahl, E. Rippenberger, H., Rudolph, W. and Weisenborn, A.: Deut. Akad. Landwirtschaftwiss., Berlin, 27 : 47 (1961)