

## RP-HPLC 법에 의한 무우의 매운 성분인 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate의 분리 및 정제

김 미 리·이 혜 수\*

충남대학교 식품영양학과 \*서울대학교 식품영양학과

### Purification of 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate the Pungent Principle in Radish Roots by RP-HPLC

Mee Ree Kim and Hei Soo Rhee\*

*Dept. of Food & Nutrition, College of Science, Chungnam National University*  
*\*Dept. of Food Nutrition, College of Home Economics, Seoul National University*

#### Abstract

The major pungent component from Korean radish roots was purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RPHPLC), and characterized as 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate on the basis of the sensory test(pungency), UV spectrum and mass spectrum analysis.

The purified isothiocyanate moved as a single peak(retention time, 5.2 min) in RP-HPLC analysis, and as a single spot(Rf, 0.9) in TLC analysis.

#### 서 론

무우의 매운 맛 성분인 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate는 thioglucoside의 가수분해산물로 오래전부터 알려져 왔지만 이 성분의 구조는 1966년에 비로서 Friis등<sup>1)</sup>에 의해 규명되었다.

예전부터 분리방법으로 수증기 증류법<sup>2)</sup>과 사염화탄소 추출법이 사용되어 왔지만, 전자의 경우 회수율이 낮고 재현성이 없는 반면에 후자의 경우 회수율이 높은 것으로 평가되었고 이어서 김등<sup>3)</sup>은 수증기 증류법과 사염화탄소 추출법에 있어서 회수율의 차이점을 설명한 바 있다.

이 물질의 정제방법에 관해서는 Friis 등<sup>1)</sup>이 최종적으로 가스크로마토그래피법에 의해 순수분리했다고 보

고하였으나, 사용상 불편한 점이 있어 간편하고 실용적인 정제방법이 요구되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 RP-HPLC 법<sup>4)</sup>을 도입시켜 무우시료로부터 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate를 단시간내 간편하게 분리정제하고자 본 실험을 수행하였다.

#### 1. 실험 재료 및 방법

##### 실험 재료

주재료인 무우(Taebak)는 대전시내 시장에서 구입하여 사용하였고, acetonitrile은 Tedia에서 구입하였으며, 증류수는 이온교환수지처리와 재증류를 통한 후 여과(0.45 $\mu$ m millipore)시켜 사용하였고 기타시약은 GR grade이었다. 또 Sep-Pak column은 Waters Assoc.에서, reverse phase TLC plate는 Baker(20 $\mu$ m particle size, 5 $\times$ 20cm, 254nm fluorescence)에

서 구입하여 사용하였다.

매운 성분의 추출: 무우 300g을 잘게 썰어 300ml의 끓는 사염화탄소에 넣고 reflux condenser 장치하에 30분간 계속 가열하면서 매운 성분을 추출하였다. 추출액을 rotatory evaporator에서 감압농축시킨후, 무수황산나트륨으로 건조시켜 황색의 oil상 잔사를 얻었다. 이 잔사를 ether에 용해시켜 1ml vial에 옮긴 후 질소가스를 주입하여 농축시켰다. 이때 얻은 oil상 추출액(20~30 $\mu$ l)을 30% acetonitrile 5ml에 용해시킨 후 RP-Sep Pak column에 투입시켜 동일한 용매(15ml)로 세척한 후 10ml의 70% acetonitrile을 통과시켜 매운 성분을 용출시킨 후 ether로 추출하여 감

압농축시켰다. 이 농축액을 100 $\mu$ l의 acetonitrile에 용해시켜 RP-HPLC법<sup>14)</sup>에 의한 성분분리 및 정제를 시도하였다.

RP-HPLC 법에 의한 정제: 사용된 column은 Radial-Pak C<sup>18</sup> Cartridge(5 $\mu$ m, 0.8 $\times$ 10cm, Waters) 이었고, detector는 Model 441 detector를 사용하여 254nm에서 흡광도를 측정하여 Model 730 Data Module에 의해 자동제산하였다. 이동상 용매로는 acetonitrile/water(70/30)이었고 유속량은 1.5ml/min이었다. 각 분획별로 자외선 흡수곡선을 분석하였고 동시에 판능검사를 실시하여 매운성분을 분리 정제하였다. 순도확인을 위해 같은 조건하에서 분리된 분

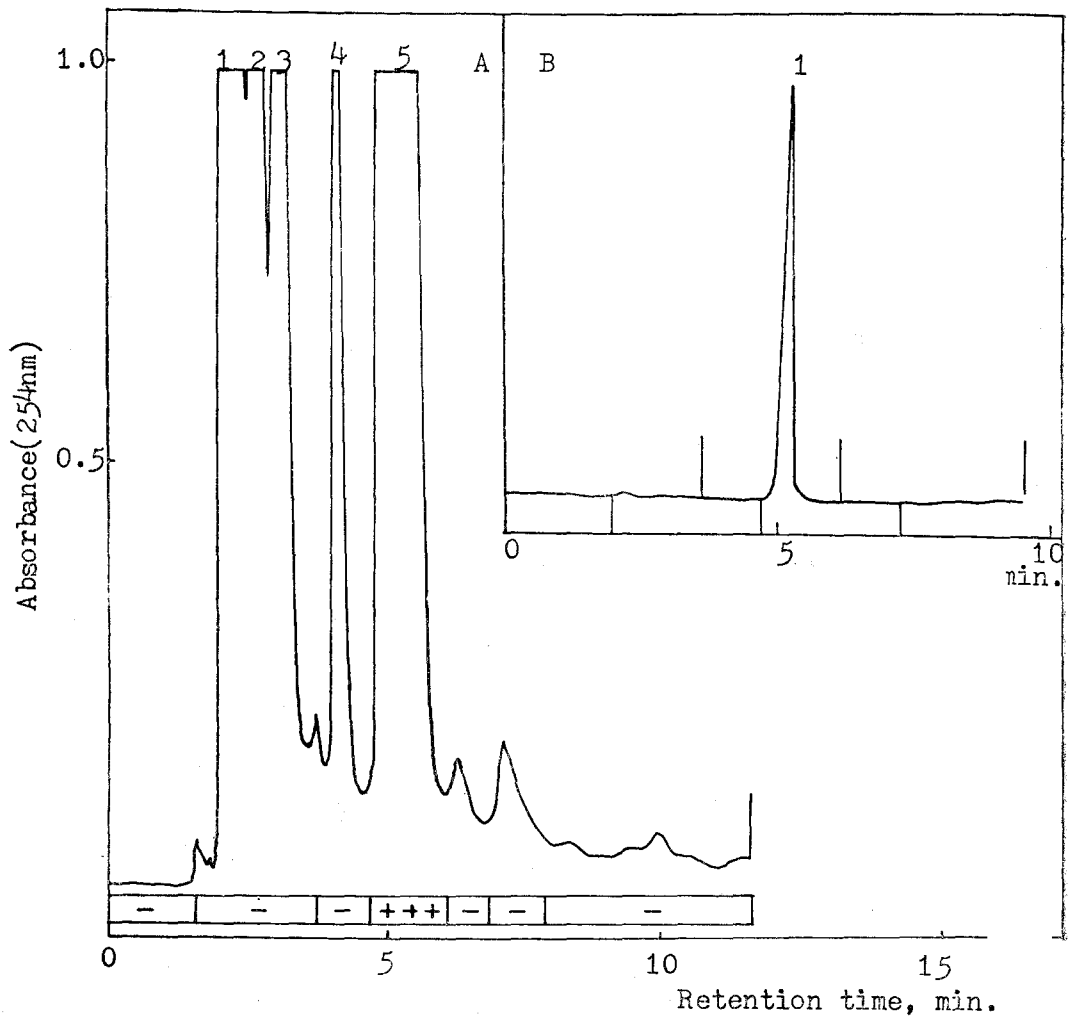


Fig. 1A. RP-HPLC profile of the partially purified 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate.

Fig. 1B. Rechromatography of peak 5 from Fig. 1A.

획을 다시 RP-HPLC 분석을 수행하였다.

UV spectrophotometry: 자외선 흡수곡선 측정은 Beckman Model 25 spectrophotometer 를 사용하여 이동상용매(acetonitrile: water=70:30) 또는 methanol 내에서 측정하였다.

GC/MS 분석: 사용된 gas chromatograph 는 Mar Model 로서 OV-101(0.2 mm×25 m)의 유리모세관 column 을 사용하여 분리하였다. 이때 column 의 온도는 50°C에서 230°C까지 10°C/min 의 속도로 상승시켰으며 검출기 온도는 220°C이었다. 최종적으로 mass spectrum 분석은 double focusing mass spectrophotometer(VG Micromass, England)에 의해 수행되었다.

TLC 분석: 2~3 μl 의 정제된 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate 를 RP-TLC plate(20 μm particle size, 5×20cm)에 점적한 후, 전개용매(methanol: water=70:30)에서 전개시킨 후 자외선 하에서 확인하여 Rf 치를 산출하였다.

결 과

생무우 속의 매운 성분을 scheme 1에서와 같이 사염화탄소로 추출하여 rotatory evaporator 를 사용하여 감압농축시켰을 때 얻은 oil 상의 잔사는 강한 독특한 냄새를 함유하였다. 이 잔사를 30% acetonitrile 에 녹인 후 C<sub>18</sub> Sep-Pak column 을 통과 시켰을 때 매운 성분은 주로 70% acetonitrile 분획에 존재하였다. 이 분획물에 과량의 에탄올을 넣어 37°C에서 감압농축하였는데, 이와같은 조건하에 매운 성분의 분해를 줄이고 쉽게 최소량의 volume 으로 농축시킬 수가 있었다. 이어서 RP-HPLC 에 의한 분리정제는 Fig. 1 A 에서와 같이 254 nm 에서 UV 흡수를 나타내는 여러 개의 peak 들 중 각 분획마다 관능검사를

Scheme 1

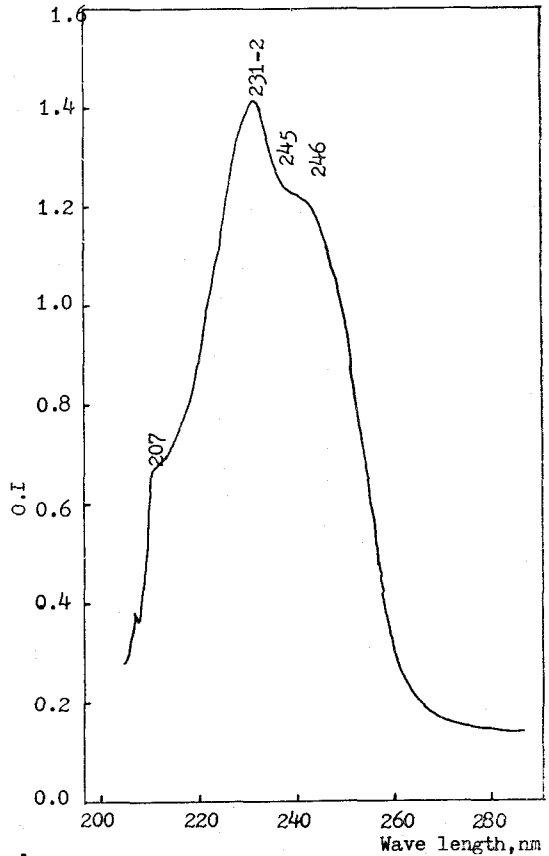
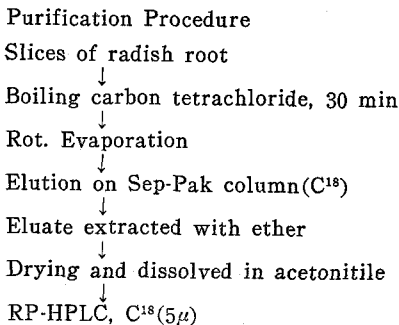


Fig. 2. UV spectrum of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate in methanol. (Fig. 1B, peak 1)

해 본 결과 peak 5 (retention time, 5.2min)가 강한 매운 맛을 나타내었다. 따라서 이 분획의 일부를 취하여 methanol 에 녹여 UV 흡수곡선을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서와 같이 231 nm에서 최대흡수파장, 207과 245 nm에서 shoulder 를 가진 자외선흡수곡선을 보여 Friis등<sup>1)</sup>의 보고서에서와 같이 특징적인 vinyl sulfide 기의 존재가 확인되었다. 또한 구조결정을 위해서 RP-HPLC 로 재분리시켰을때 Fig. 1B에서와 같이 단일성분 peak 를 얻었으며 최종적으로 이를 GC/MS 에 의해 분석하였을 때 Fig. 3에서와 같이 molecular ion 인 m/e 159, base peak 인 m/e 87 (CH<sub>3</sub>-S-CH=CH-CH<sub>2</sub>)가 관찰되었고 기타 특징적인 ion 으로 m/e 144(M<sup>+</sup>-15)와 alkyl isothiocyanate 의 특징적 ion 인 m/e 72등이 관찰되었다. 따라서 분리정제된 성분은 관능검사, UV 흡수곡선, GC/MS 분석결과를 통해서 4-methylthio-3-butenyl iso-

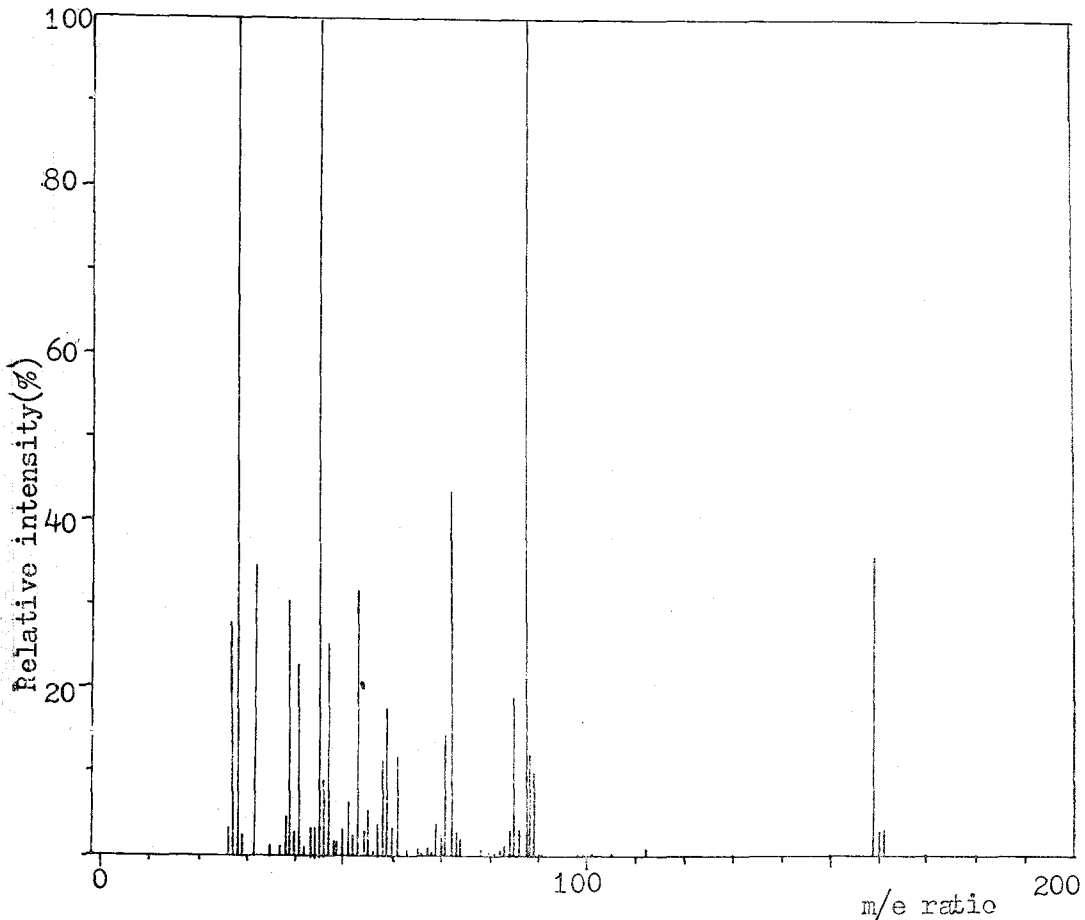


Fig. 3. Mass spectrum of the purified 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate.

thiocyanate 인 것으로 확정지을 수 있었다.

분리확인된 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate 성분을 RP-TLC 법에 의해 전개시켜 건조한 후 UV lamp 에 의해 Rf value 가 0.9인 지점에서 한 개의 spot 가 확인되었다(Fig. 4). 따라서 TLC 법의 사용도 이 물질의 분리 확인에 유용한 것임을 알 수 있었다.

### 고 찰

예전부터 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate 의 분리방법으로 수증기 증류법이 사용되어 왔으나 이 성분자체가 수용액에서 불안정한 반면에 유기용매에서는 안정하므로<sup>3)</sup> 본 실험에서도 유기용매(사염화탄소) 추출법이 사용되었다. 그러나 이 경우도 추출과 농축

시, 온도가 높거나 처리시간이 길수록 회수율이 크게 감소하였다. 특히, 농축시 수분의 존재는 회수율을 감소시키므로 무수황산소다에 의한 수분제거나 감압농축시 과량의 에탄올을 넣고 rotatory evaporator를 통해 감압증류함이 회수율 증가에 유리하였다. 본 RP-HPLC 에 사용된 70% acetonitrile 은 이 물질의 안정성에 별 영향을 주지 않았다. 사염화탄소추출액에서는 적어도 몇 가지 성분이 섞여 있는데 이중 일부는 친수 성분해산물로 추정되었다. RP-HPLC 에 의해 분리된 isothiocyanate 의 UV spectrum 과 mass spectrum 에 의한 분석결과는 다른 보고<sup>1)</sup>와 일치하였고, 가스분석기에서 분리하기 곤란했던 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate 의 잔류 fragment ion<sup>1)</sup>이 mass spectrum 에 나타나지 않았음은 이 RP-HPLC 의 분리능이 우수함을 보여주는 것이다. 이외에 이 RP-HPLC 의 용

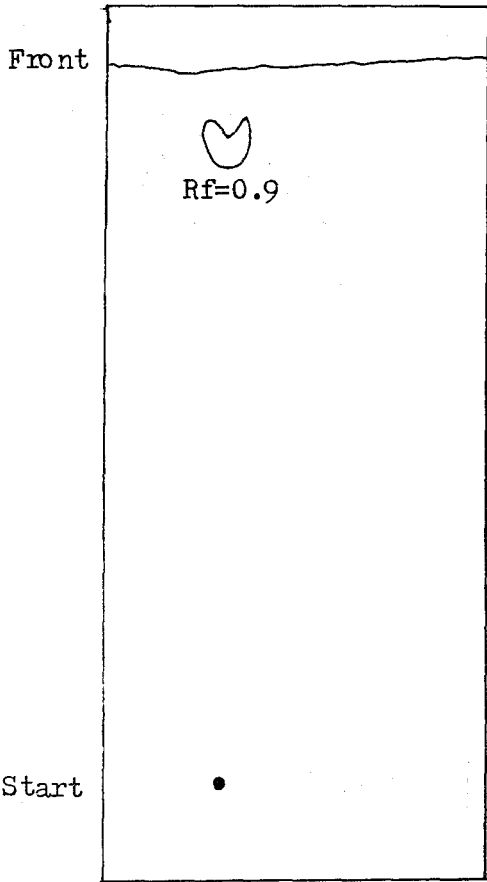


Fig. 4. Thin layer chromatography of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate plate: RP-TLC plate 5×20cm, Developing solvent; methanol: water=7:3

용<sup>5)</sup>으로는 소량( $n$  moles)에서부터 다량( $m$  moles)에 이르기까지 단시간 내에 쉽게 성분분리 및 정제가 가능함을 보여주며, 아울러 정량적인 평가에서도 사용될 수 있는 장점이 있다<sup>6)</sup>. 아울러 RP-TLC법에 의한 이 성분의 분리확인 은 시간적, 경제적 잇점을 더해 주는 것이다.

## 요 약

무우 속의 매운 맛 성분을 용매추출법( $CCl_4$  사용)으로 분리하여 RP-HPLC법에 의해 정제한 후에 관능검사에 의해 pungency test를 하고, UV spectrum분석, GC/MC 분석을 수행한 결과 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate임을 확인하였다.

RP-HPLC에서 mobile phase로 70% acetonitrile을 사용하였는데, 정제된 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate는 단일 peak로 분리되어 나왔고 이때의 retention time은 5.2분이었다. 아울러 RP-TLC에서 Rf치는 0.9이었다.

## 참 고 문 헌

1. Friis, P. and Kjaer, A., 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate, the pungent principle of radish root. *Acta Chem. Scand.*, **20**:698, 1966.
2. Kjaer, A. Madson, J.O., Maeda, Y., and Uda, Y., Volatiles in distillates of fresh radish of Japanese and Kenyan origin, *Agric. Biol. Chem.*, **42**(9):1715, 1978.
3. Kim, M.R., and Lee, H.S., Volatile sulfur components from fresh radishes of Korean origin, *Korean J. Soc. Food Sci.*, **1**(1):33, 1985.
4. Whang, K.S., Huh, W.D., Nam, Y.C. and Min, B.Y., Quality evaluation of sesame oil by high performance liquid chromatography, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**(3):348, 1984.
5. Ellin, R.I., Zvirblis, P. and Wilson, M.R., Method for isolation and determination of pyridostigmine and metabolism in urine and blood, *J. Chrom.*, **228**:235, 1982.
6. Kim, M.R. and Lee, H.S., Quantitative determination of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate in radish roots by RP-HPLC, Submitted to *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**(6), 1986.