

마늘로부터 Allithiamine의 합성 및 정제

김인환* · 이영철 · 김현구 · 박무현

*고려대학교 보건전문대학 식품영양과, 한국식품개발연구원

Synthesis and Purification of Allithiamine from Garlic

In-Hwan Kim*, Young-Chul Lee, Hyun-Ku Kim and Moo-Hyun Park

*Department of Food & Nutrition, College of Allied Health Sciences,
Korea University, Korea Food Research Institute

Abstract

Allithiamine was synthesized when thiamine was mixed with fresh garlic extract made with ethanol at a alkali medium. Allithiamine was isolated and purified using solvents such as ethyl acetate, diethyl ether and benzene. Purified allithiamine was identified by determination of melting point, elemental analyzer and LC/Thermospray/Mass-spectrometer. On the other hand, synthetic conditions of allithiamine from fresh garlic, pH, temperature and ratio of garlic to ethanol were investigated. Synthetic rates of allithiamine under alkali conditions were rapidly increased while those under acidic conditions very slowly increased. The synthetic rates of allithiamine increased as temperature increased, but decreased above 70°C as reaction time increased. There was no significant difference in synthetic rate of allithiamine when garlic was mixed above 4 times of ethanol. Therefore, optimum condition of pH, temperature and ratio of garlic to ethanol for synthesis of allithiamine were 8, 60°C and 1 : 4, respectively.

Key words: Garlic, allithiamine, pH, temperature, ethanol

서 론

마늘은 우리 나라에서 매우 중요한 부분을 차지하고 있는 향신료 중의 하나로서 여러가지 용도로 식품에 사용되고 있다. 과거 수십년 동안 마늘의 성분 및 약리효과에 있어서는 많은 연구가 수행되어져 왔으며 일부 성분은 그 효과를 입증하는 결과를 보여주고 있다^(1,3). 마늘에는 다른 종류의 백합과 식물보다 alliin (*S-allyl cysteine sulfoxide*)을 다량 함유하고 있다. 파쇄 과정에서 마늘에 존재하는 alliin은 allinase의 작용을 받게되어 alliin이 allicin (*diallyl disulfide oxide*), pyruvate 및 ammonia 상태로 분해되며 이렇게 생성된 allicin 역시 매우 불안정한 화합물로서 여러 형태의 함황화합물로 쉽게 전환된다. 그 중 diallyl disulfide (60%), diallyl sulfide (14%), allyl propyl disulfide (6%), methyl trisulfide (4~10%)가 주요 화합물로서 allicin과 더불어

이들 함황화합물이 마늘의 매운맛을 나타내는 주된 화합물로서 알려져 있다⁽⁴⁾. 이상의 과정에서 생성되는 allicin이 thiamine과 반응을 하게되면 allithiamine 또는 TAD (thiamine allyl disulfide)라고 불리는 thiamine 유도체가 만들어 진다고 보고되어 있다^(5,6). Fig. 1은 마늘로부터 합성된 allithiamine의 구조식이다. Allithiamine은 섭취하였을 때 기존의 vitamine B₁이 체내에서 쉽게 배출되는 것에 비하여 오랫동안 그 효과가 지속될 뿐만 아니라 보다 높은 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 건조성 피부염인 아토피성 피부에도 효과가 있는 것으로 알려져 있는등 활성 비타민으로 불리워지고 있다^(7,8). 따라서 본 연구에서는 국내산 마늘을 이용하여 이미 보고된 합성방법으로 부터 allithiamine을 합성 및 분리정제한 후 원소분석, 용점측정 및 LC/Thermospray/Mass spectrometer를 이용하여 분리정제된 allithiamine을 확인하였다. 아울러 합성과정의 최적조건을 조사하기 위해 pH, 온도 및 에탄올 첨가량에 따른 allithiamine 합성량을 HPLC로 측정하여 최적 합성조건을 조사하였다.

Corresponding author: In-Hwan Kim, Department of Food and Nutrition, College of Allied Health Sciences, Korea University, Chungneung 1-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-703, Korea

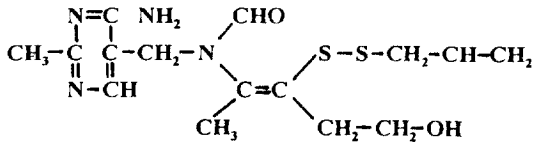


Fig. 1. Molecular structure of allithiamine.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용된 마늘(*Allium Sativum* L.)은 전라남도 지역에서 1995년에 생산된 난지형 마늘로서, 인경부위만을 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. Thiamine HCl은 Aldrich사 제품을 사용하였으며 그 이외에 사용된 모든 시약은 특급이상의 시약을 사용하였다.

Allithiamine의 합성 및 분리정제

Allithiamine은 Taizo 등⁽⁶⁾의 방법에 따라 합성 및 분리정제를 하였다. 즉 박피한 마늘 100 g을 waring blender로 분쇄하고 200 mL의 에탄올을 가하여 균일하게 섞은후 원심분리 또는 여과하여 얻어진 여액을 pH 7.0으로 맞추었다. 이 여액을 reflux condensor를 부착하여 50°C까지 가온 한후 5 g의 thiamineHCl을 3 mL의 증류수에 녹여 반응액에 첨가 하였다. 이상의 조건에서 1시간 동안 반응시킨 반응액을 50°C 감압하에서 에탄올을 제거하였다. 에탄올이 제거된 반응액은 pH를 2로 맞춘 후 diethyl ether 200 mL를 가하여 separatory funnel을 이용하여 상층부를 제거함으로써 반응액에 존재하는 유분(oily compounds)을 제거하였다. 유분이 제거된 용액을 다시 pH 7.0으로 맞추고 separatory funnel에서 ethyl acetate 150 mL를 가하여 2~3회 추출과정을 반복하였다. 여기서 얻어진 ethyl acetate층을 sodium sulfate anhydrous를 가하여 수분을 제거하고, 50°C 감압하에서 ethyl acetate를 제거하였다. Ethyl acetate가 제거된 농축물에 뜨거운 benzene을 가하여 용해시킨 후 0~4°C 냉장실에서 24시간 방치하여 황색의 조결정을 얻었다. 여기서 얻어진 조결정에 또다시 뜨거운 benzene을 가하여 녹인후 재결정화 시켜 백색의 순수한 allithiamine을 얻을 수 있었다.

DSC를 이용한 allithiamine의 용점 측정

본 실험에서 분리정제한 allithiamine의 용점을 측정하기 위해 시료 약 20 mg을 O-ring type stainless steel fan에 넣고 DSC (Perkin Elmer-4)로 용점을 측정하였

다. 이때 분석조건은 승온속도(scan rate) 20°C/min, 온도범위 25~200°C였다.

원소분석

본 실험에서 분리 정제한 allithiamine의 탄소(C), 질소(N), 수소(H), 황(S), 산소(O)의 질량 %를 분석하기 위해 elemental analyzer (Model EA 1108)를 이용하여 분석을 실시하였고, 이때 combustion temperature와 pyrolysis temperature는 1000°C와 1080°C였다.

LC/Thermospray/Mass-spectrometer를 이용한 allithiamine의 확인

본 실험에서 분리정제한 allithiamine의 분자량을 측정하기 위해 시료를 일정량의 메탄올에 녹인후 분석에 사용하였다. 이때 사용한 HPLC (Model HP-1090N)의 interface는 thermospray 방식이었고 mass detector의 model은 HP-5988A mass spectrometer였다. 분석조건은 column을 사용하지 않고 직접 injector에 투입하였고 이때 flow rate는 0.8 mL/min, eluent는 75%의 0.1 M ammonium acetate와 25%의 methyl alcohol이었다. Mass spectrometer의 Source temperature는 200°C, electron voltage는 1055 eV인 LC/Thermospray/Mass-spectrometer를 사용하여 분석하였다.

HPLC를 이용한 allithiamine의 합성량 측정

마늘로부터 합성과정 중 생성되는 allithiamine량을 측정하기 위해 마늘 반응액(garlic reactant)을 취하여 메탄올로 희석시킨 후 Microfilter kit로 여과시켜 불용성 물질을 제거한 후 실험에 사용하였다. 이때 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

Allithiamine의 확인

마늘과 thiamineHCl로 부터 합성된 allithiamine을 정제한 후 용점, 원소분석 및 LC/Thermospray/Mass-spectrometer 등의 분석을 통하여 allithiamine의 순도

Table 1. HPLC conditions for analysis of allithiamine in the garlic extract

Instrument	Waters
Column	Nova-Pak C ₁₈ (3.9×150 mm, particle size 5 μm, part No 86344)
Eluent	MeOH: Acetonitrile: Water (49:30:21)
Detector	UV detector (232 nm)
Flow rate	1 mL/min

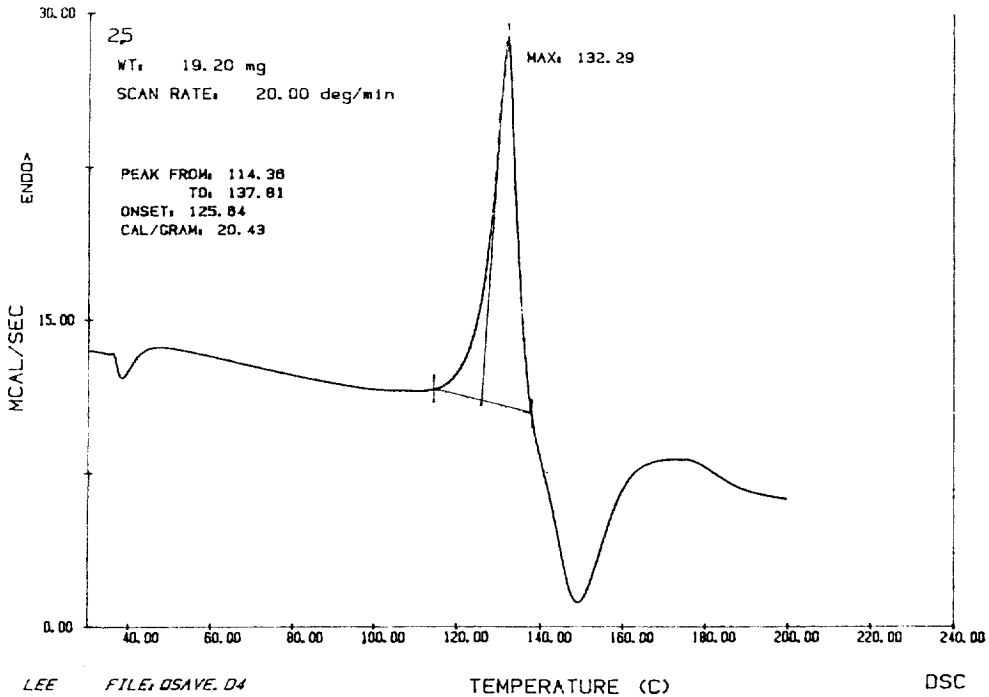


Fig. 2. DSC thermogram of purified allithiamine.

를 확인을 하였다. Allithiamine의 확인방법의 하나로써 DSC를 이용하여 분리정제된 allithiamine의 용점을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 최대 peak를 나타내는 온도가 132.29°C인 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 얻은 allithiamine 분말의 용점이 132.29°C인 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 Yoshihiro 등⁹⁾이 마늘로부터 합성된 순수한 allithiamine의 분석결과와도 일치하는 결과를 보여주었다. 한편 분리정제한 allithiamine의 각 원소별 질량%를 원소분석기를 이용하여 탄소, 수소, 질소, 산소, 황의 질량%를 분석해 보았을때 Table 2와 같은 결과를 얻을 수 있었다. Allithiamine의 분자식으로부터 탄소, 수소, 질소, 산소, 황의 이론값(theoretical values)은 50.82, 6.26, 15.81, 9.03, 18.09%로 나타났으며, 원소분석기로 부터 얻어진 실험값(experimental values)은 50.97, 6.40, 15.56, 9.02, 17.90%로 각 원소의 이론값과 일치함을 보여 주었다. 분리정

Table 2. Elemental analysis of purified allithiamine

Items	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Oxygen	Sulfur
Theoretical values	50.82	6.26	15.81	9.03	18.09
Experimental values	50.97	6.40	15.56	9.02	17.90

제된 allithiamine의 총 분자량을 측정하기 위해 LC/TSP/Mass-spectrometer를 이용하여 조사하여 보았다. 그 결과 Fig. 3과 같이 총 분자량은 [MH]⁺으로 나타났을때 355인 것으로 나타나 본연구에서 합성된 allithiamine의 분자량이 분자구조로 부터의 분자량 354와 일치함을 나타내었다. 따라서 이상의 분석결과들로부터 본 연구에서 합성분리 정제된 물질이 allithiamine임을 확인할 수 있었다.

합성조건에 따른 allithiamine의 생성량 변화

마늘로부터 allithiamine의 최적 합성조건을 조사하기 위하여 pH, 온도 및 에탄올량에 따른 allithiamine 합성량을 조사하여 보았다. 반응과정 중 allithiamine 합성량의 변화는 HPLC를 이용하여 분석해 보았을때 Fig. 4와 같이 마늘 추출액에 thiamineHCl을 첨가한 시료 A와 동일 마늘 추출액에 thiamineHCl을 첨가한후 50°C, pH 7에서 30분간 반응시킨 시료 B 및 순수한 allithiamine인 시료 C를 HPLC로 분석한 결과 thiamineHCl을 첨가한후 합성반응을 시킨 시료 B와 순수한 allithiamine인 시료 C의 경우에는 1.70분에 allithiamine으로 추정되는 peak를 관찰할 수 있었으나 단순히 thiamineHCl만을 첨가한 경우에는 이 peak를 관찰할 수 없었다. 이러한 결과로부터 1.70분에 나타나는 peak

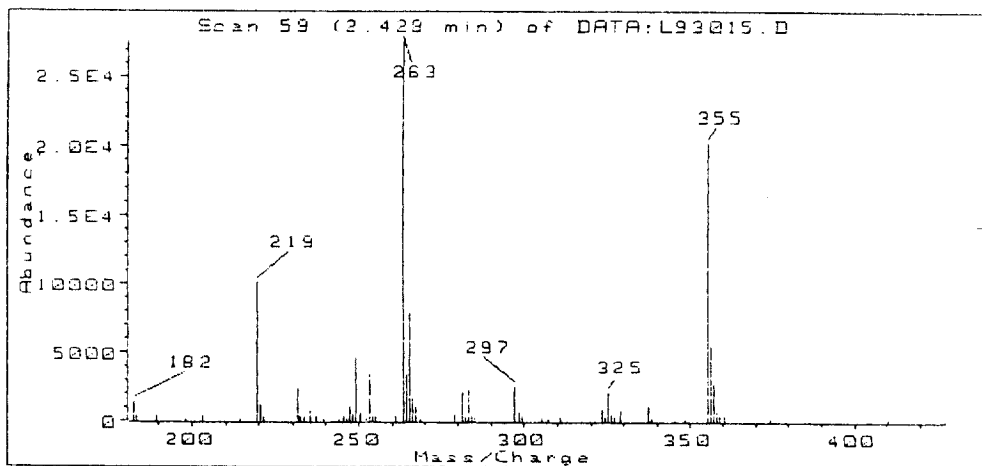


Fig. 3. LC/Thermosparry/Mass spectrum of purified allithiamine.

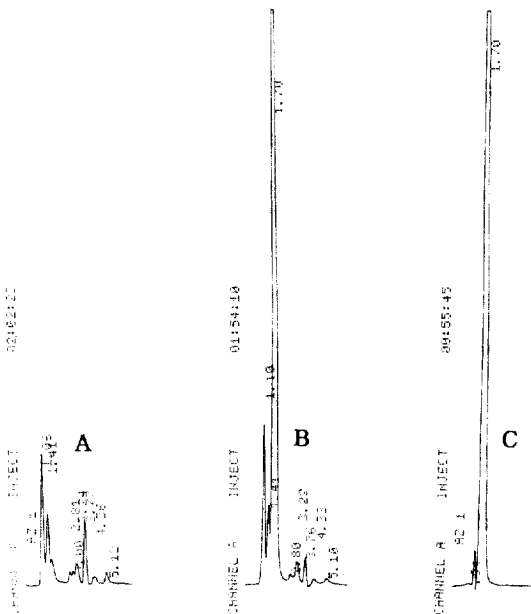


Fig. 4. HPLC chromatograms of garlic extracts and allithiamine. A: Before reaction, B: After reaction, C: Allithiamine

가 allithiamine peak라는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 반응 과정 중 생성되는 allithiamine 함량을 측정하기 위해 합성분리 정제된 순수한 allithiamine을 농도 별로 하여 표준곡선을 구한 후 각 조건별 allithiamine 함성량을 측정하였다. Fig. 5는 pH 변화에 따른 allithiamine 함성량의 변화를 나타낸 결과로서, 마늘에 대한 에탄올 첨가량을 1:2로하고 반응온도를 60°C 하였을때 반응시간 5분까지 pH 5와 pH 6에서는 allithiamine

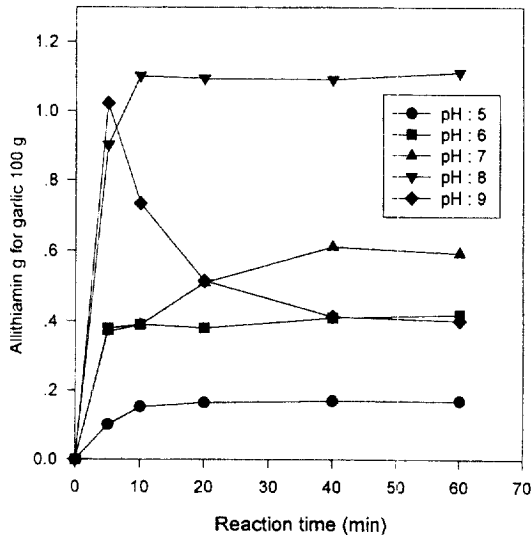


Fig. 5. Content of allithiamine in garlic extracts as a funtion of reaction time at various pH.

mine합성량이 마늘 100 g 당 각각 0.25 g과 0.38 g이 었고 반응시간에 따라 최대 0.42 g과 0.61 g으로 합성 된 반면에 pH 8과 9에서는 반응시간 5분까지 마늘 100 g당 allithiamine 합성량이 각각 0.90 g과 1.02 g으로 합성속도가 매우 빠른것으로 나타났다. 그러나 pH 9의 경우에는 반응시간이 경과함에 따라 생성된 allithiamine이 점점 파괴되는 경향을 나타냈다. 따라서 마늘로부터 allithiamine을 합성하는 과정에서 pH 8이 최적 pH인 것으로 나타났다. 한편 반응온도별 allithiamine 함성량을 조사하기 위해 마늘에 대한 에탄올 첨가량을 1:2, pH를 8로 하였을 때 30°C부터 80°C까

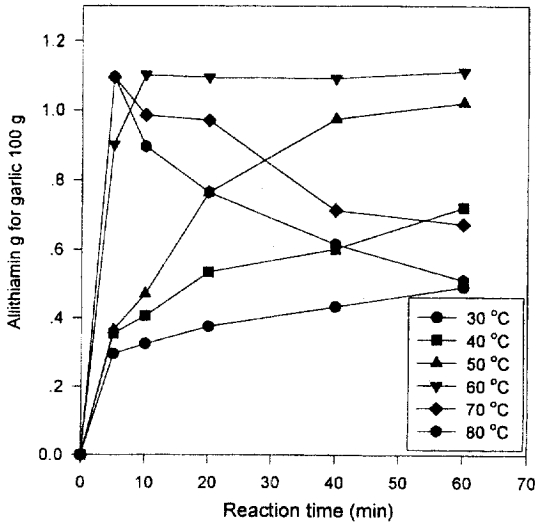


Fig. 6. Content of allithiamine in garlic extracts as a function of retention time at various temperatures.

지의 온도 범위에서 allithiamine의 합성량을 측정하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 온도에 따른 allithiamine 합성량은 60°C까지 반응시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 70°C와 80°C의 경우에는 초기 10분까지 합성량이 60°C와 유사한 경향을 나타낸 반면에 반응시간 10분 이후부터는 오히려 감소되는 경향을 나타내어 생성된 allithiamine이 70°C 이상의 온도에서는 불안정하다는 결론을 얻을 수 있었다. 한편 50°C 이하의 온도에서는 반응 시간에 따라 allithiamine 합성 속도가 매우 느린 것으로 나타났다. 예로서 60°C에서 10분동안 반응시킨 반응액의 allithiamine 합성량이 마늘 100 g당 1.10 g 이었으나 같은조건에서 30°C와 40°C 그리고 50°C에서의 allithiamine 합성량은 0.33, 0.41, 0.47 g으로 나타났다. 따라서 allithiamine 합성을 위한 최적합성 온도는 60°C인 것으로 나타났다. 한편 반응 용매로 사용되는 에탄올의 최적 첨가량을 조사하기 위해 pH 8과 60°C에서 마늘과 에탄올의 비를 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8로 하였을 때 합성량의 변화를 측정한 결과 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 마늘과 에탄올의 비가 1:1과 1:2 이었을 때 반응시간 10분 경과후 allithiamine 합성량이 마늘 100 g에 대하여 0.92 g, 1.10인 반면에 1:4, 1:6, 1:8인 경우에는 각각 1.25, 1.23, 1.22 g으로 마늘과 에탄올의 비가 1:4 이상에서는 큰 변화를 나타내지 않았다. 위 결과 중 allithiamine의 합성에 가장 크게 영향을 주는 요인으로는 pH와 온도로서 pH의 경우에는 산성보다 알칼리 상태에서 합성이 쉽게 일어나는 것으로 나타났으나 pH

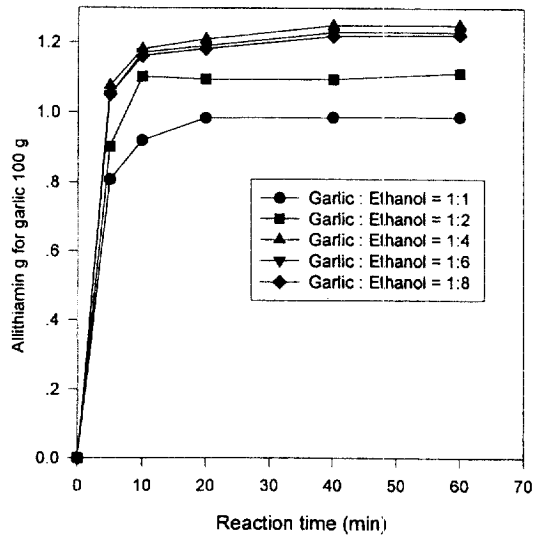


Fig. 7. Content of allithiamine in garlic extracts as a function of reaction time at various ratio of garlic:ethanol.

9이상의 강 알칼리 상태에서는 안정성이 떨어지는 즉 반응시간이 길어짐에 따라 합성된 allithiamine이 다시 파괴되는 경향을 나타냈으며 온도에 있어서는 60°C까지 온도가 증가함에 따라 합성속도가 티레적으로 증가한 반면 70°C 이상의 온도에서는 pH에서와 유사하게 합성된 allithiamine이 반응시간에 따라 오히려 파괴되는 경향을 보여주었다. 따라서 이상의 결과로부터 allithiamine의 최적 합성조건으로 pH 8, 온도 60°C 그리고 마늘과 에탄올의 최적비는 1:4인 것으로 나타났다.

요 약

수용성 비타민인 thiamine과 에탄올 마늘 추출물을 알칼리 상태에서 반응시켜 allithiamine을 합성하였다. 합성반응이 끝난 반응액으로 부터 ethyl acetate, diethyl ether, benzene 등의 용매를 사용하여 99% 이상의 순도를 갖는 allithiamine을 분리정제한 후 DSC 분석, 원소분석, LC/Thermospray/Mass-spectrometer 분석을 통하여 확인하였다. 한편 allithiamine의 최적 합성조건을 조사하기 위하여 pH, 온도, 에탄올 첨가량 등이 조사되었다. pH의 경우에는 알칼리 영역에서는 반응시간에 따라 allithiamine 합성속도가 급속히 증가되는 경향을 나타낸 반면 산성영역에서는 매우 느린 것으로 나타났다. 온도의 경우에는 60°C까지 온도가 증가함에 따라 증가되는 경향을 나타낸 반면 70°C 이상에서는 반응 시간이 경과됨에 따라 오히려 감소되는 경

향을 나타내었다. 한편 마늘에 대한 에탄올 첨가량에 있어서는 4배 이상 에탄올을 첨가 하였을 때는 allithiamine 합성량에 큰 변화를 나타내지 못하였다. 따라서 allithiamine 합성을 위한 최적 합성조건으로는 pH 8, 온도 60°C, 마늘:에탄올의 비가 1:4인 것으로 나타났다.

문 헌

1. Raghavan B., Abraham K. O. and Shankara Narayana M. L.: Chemistry of garlic and galic products. *J. Scientific and Industrial Research*, **42**, 401-409 (1983)
2. Jamaluddin M. P., Krishnan L. K. and Ancy T.: Ajoene inhibition of platelet aggregation : possible mediation by a hemoprotein. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 479-486(1988)
3. Wagner H., Wierer M. and Fessler B.: Effect of garlic constituents on arachidonate metabolism. *Planta Medica*, **152**, 305-306 (1987)
4. Herwig J., Bernd M., and Karl K.: Characterization of an alliin lyase preparation from garlic. *Planta Medica*, **55**, 434-439 (1989)
5. Taizo M. and Shojiro Y.: Studies of vitamine B₁ and related compounds (isolation of allithiamine) (*in Japanese*). *Yakugaku Zasshi* **72**, 502-506(1952)
6. Motonori F.: Allithiamine and its properties. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 57-62(1976)
7. Hideo S.: Cardiac action of thiamine derivatives in guinea pig. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 29-34 (1976)
8. Motonori F.: Discovery of allithiamine. *Proc. Jpn. Acad.*, **23**, 857-862 (1947)
9. Yoshihiro H. and Minoru Y.: A study of the garlic extract-vitamine B₁ complex-A study of its characteristics and clinical application in the treatment of atopic dermatitis. *Skin*, **33**(2), 172-186 (1991)

(1998년 1월 6일 접수)