

Direct Inlet/MS를 이용한 잎담배중 폴리페놀 化合物의 熱分解에 관한 研究

朴 晋 佑

韓國人蔘 煙草研究所

(Received April 26, 1982)

Jeen Woo Park

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul 110, Korea

Study on the Pyrolysis of Polyphenols from Tobacco by Direct Inlet/MS

Abstract:—Direct inlet/MS was used to investigate the pyrolysis pathway and the pyrolyzates of tobacco polyphenols as precursor of catechol which has been known as one of the most potent co-carcinogen from cigarette smoke. Caffeic acid, catechol and quercetin, catechol were detected from the pyrolyzates of chlorogenic acid and rutin, respectively. Interrelationship between polyphenols from tobacco leaf and catechol from cigarette smoke was investigated by using HPLC and GC. These results reveal that chlorogenic acid is the most significant precursor of catechol in cigarette smoke.

잎담배의 polyphenols는 향기, 품질과 관련성이 크고 특히 chlorogenic acid는 색상과 밀접한 관계가 있음이 알려져왔으며¹⁾ 껍연시 열분해되어 연기성분중 phenols의 전구체로 작용함이 보고 되어 왔다²⁾.

담배연기 성분의 약산성 분획중 catechol은 mouse skin에 tumor를 발생시키는등의 강력한 조발암물질로 최근 그 분리 및 발암과의 관련성이 활발히 연구되고 있어³⁻⁵⁾ 잎담배 polyphenols의 열분해에 관한 연구는 독물학적으로도 중요성을 가진다.

polyphenols는 caffetannins, flavonoids, coumarins 및 관련화합물로 분류되는데 잎담배에서는 chlorogenic acid 및 이성체등의 caffetannins⁶⁾, rutin, quercetin, naringenin등 flavonoids⁷⁾, scopolin, scopoletin 등 coumarins와⁸⁾ phenolic acids, eugenol등 관련화합물이⁹⁾ 알려져 왔다. 이 가운데 chlorogenic acid와 rutin이 양적으로 가장많아 catechol 전구체로서 현저한 작용을 할 것으로 추정할 수 있다.

열분해 방법으로는 Vycor tube 등을 이용하여 열분해에 의해 얻어진 열분해 산물을 분리하여 확인하는 방법¹⁰⁾, pyrolyzer/GC에 의한 방법¹¹⁾ 등이 사용되어 왔으나 열분해 산물을 분리 확인하는 方法은 그 분리방법이 복잡하고 많은 시료가 소요되며 pyrolyzer/GC에 의한 方法은 열분해 산물들이 GC의 column에 응축되거나¹²⁾ GC에 의해 직접 분리가 용이치 않는 열분해 산물의 확인이 곤란한 단점이 있다. 이제까지 잎담배 성분과 연기 성분의 상관성은 잎담배를 furnace에서 태워 그 응축물의 분획과정을 거쳐 분리, 分析하는 方法이 주로 利用되어 왔다¹³⁾. 그러나 이 方法은 전구체와 그 열분해 산물의 관련성을 용이하게 파악할 수 없는 단점이 있다.

본 研究에서는 direct inlet/MS로 polyphenols를 열분해하여 직접 열분해산물을 확인하였고 HPLC로 전구체로 추정되는 잎담배의 polyphenols를 分析한 후 그 잎담배를 태운 연기成分의 catechol양을 GC로 정량하여 열분해 경로 및 전구체와 열분해산물인 catechol과의 상관성을 추적하였다.

實驗方法

試料 및 試藥—잎담배 시료로는 오리엔트산 향kick미종인 Turkish Izmir(B/G), Greek Basma (Ⅲ)과 국내산인 향초(Tip) 및 소향(Tip)을 sun-cured 한후 60°C에서 재건조하고 각초로 제조한 것과 분쇄하여 16 mesh체를 통과한 분말을 갈색병에 보관하여 사용하였다. 시약으로 catechol, chlorogenic acid, rutin 및 quercetin등은 Sigma 제품을 methanol은 Merck제 GR급을 Pyridine 및 bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)+1% trimethylchlorosilane (TMCS)는 pierce 제품을 사용하였다.

Direct inlet/MS에 의한 polyphenols의 熱分解—사용기기로는 SS MAT 188 data system이 부착된 Varian MAT 212 double focusing MS를 利用하였다. Chlorogenic acid, rutin을 direct inlet probe의 aluminium crucible에 넣고 crucible 온도를 20°C에서 450°C까지 100초 또는 500초 동안에 자동적으로 증가시켰다. MS의 조건으로 ion source pressure는 3×10^{-7} torr, emission current는 1mA, ionizing voltage는 70 eV, 그리고 ionization mode로 electron impact(EI) ionization을 使用 하였다.

잎담배로 부터 polyphenols의 分離—4품종 잎담배 분말 5g을 150ml의 80% methanol을 추출 용매로 하며 soxhlet 장치에서 6時間동안 추출하였다. 추출물을 celite에 통과시킨후 용매를 날려 보내고 HPLC 分析時 methanol에 녹여 분석시료로 利用하였다.

HPLC에 의한 잎담배 polyphenols의 分析—기기는 Model 6000A Solvent Delivery System, Model 440 UV detector등이 부착된 Waters Assoc. Model ALC/GPC 200 HPLC를 使用하였고 分析조건으로 column은 μ Bondapak C₁₈(30cm×3.9mm I.D.), mobile phase로는 methanol-0.1M KH₂PO₄ (40:60), flow rate는 1.0ml/min, 그리고 각 잎담배 추출물을 20ml의 methanol에 녹인 후 3 μ 를 注入하였다. 표준용액으로는 chlorogenic acid와 rutin 각 50mg을 20ml methanol에 용해하여 methanol로 2, 4, 6, 8배 희석한 후 동일한 方法으로 分析하여 검량선을 얻었다.

담배煙氣로 부터 phenolic fraction의 分離—4 품종 잎담배의 각초를 cigartte로 제조하여 23±3°C에서 65% 상대습도를 유지하면서 48時間동안 방치후 시료로 利用하였다. 5 cigarettes를 20 channel smoking machine (Phillip Morris 제)으로 태워 cambridge filter에 연기의 전입자상 物質을 흡착시켰다. 이때 使用된 條件으로는 표준 puff parameters (35ml volume, 2 sec duration, 1 puff/min)를 利用하였고 cigarette 길이가 10mm가 남을때 까지 태웠다. 흡착된 cambridge filter를 5ml의 dry pyridine에 넣고 12時間동안 溶出시켰다. 溶出된 pyridine 추출물 0.2ml와 BSTFA +1% TMCS 0.2ml를 넣고 60°C에서 30分間 反應시켜 trimethylsilyl(TMS) 유도체로 만들었다.

GC에 의한 catechol의 定量—使用기기로는 microprocessor가 부착된 Hewlett-Packard Model 5840A GC를 利用하였다. GC 條件으로 column은 100/120 mesh chromosorb W에 10% OV-17로 coating된 glass packed column(6'×1/8")을 使用하였고 carrier gas인 nitrogen의 flow rate는 25ml/min, detector는 FID, injection 양은 2 μ l, oven 온도는 90°C에서 15分동안 유지시킨후 220°C까지 5°C/min로 증가시켰다. 定量을 위해 catechol 2mg을 10ml pyridine에 녹인후 pyridine으로

2, 4, 6, 8배 희석하고 연기시료의 경우와 同一한 方法으로 유도체화하여 GC로 分析한 뒤 농도에 따른 peak area로 검량선을 作成하였다.

實驗 結果 및 考察

열분해의 적정조건을 찾기위해 crucible의 온도증가 時間을 100초와 500초로 한 結果 100초동안 열분해하는것이 그 열분해 경로가 명확하여 100초 동안에 온도를 증가시켰다. chlorogenic acid를 direct inlet/MS로 열분해한 후 mass spectra로 열분해 產物을 확인하고 그 化合物에 해당하는 molecular ion의 selective ion monitoring으로 얻어진 pyrogram을 Fig. 1에서 볼 수 있다. chlorogenic acid의 열분해 結果 step II에서는 caffeic acid (M=180), step III에서는 catechol (M=110)을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 同一한 方法으로 rutin을 열분해한 結果 Fig. 3과 같은 pyrogram을 얻을 수 있었다. 여기서는 step II에서 rutosyl(1-rhamnosido-d-glucosyl)-이 떨어져나간 aglycon인 quercetin (M=302), step III에서 catechol (M=110)의 生成을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

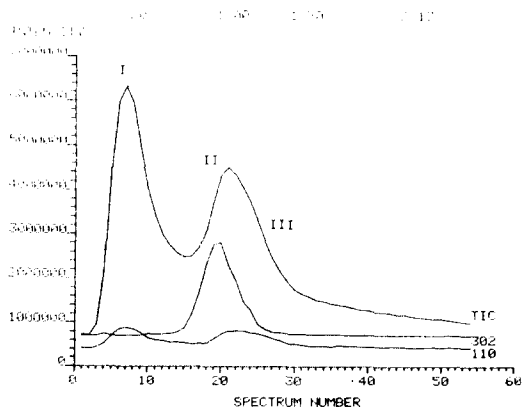


Fig. 1- Pyrogram for chlorogenic acid obtained by direct inlet/MS. Key-*: Retention time; TIC: Total ion current.

- (I) M=354, chlorogenic acid
- (II) M=180, caffeic acid
- (III) M=110, catechol

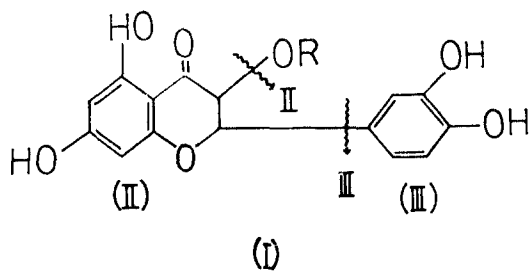


Fig. 2- Pyrolysis pathway of chlorogenic acid.

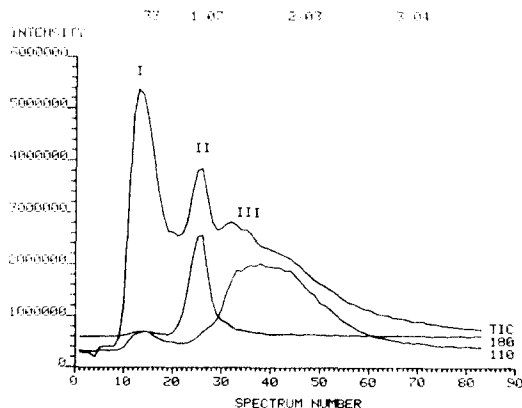


Fig. 3- Pyrogram for rutin obtained by direct inlet/MS. Key-1: Retention time; TIC: Total ion current.

- (I) M=610.6, rutin
- (II) M=302, quercetin
- (III) M=110, catechol

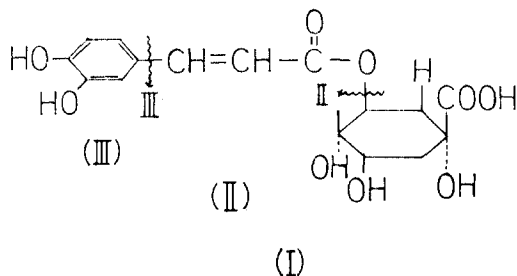


Fig. 4- Pyrolysis pathway of rutin. Key-R: rutosyl (1-rhamnosido-d-glucosyl).

chlorogenic acid와 rutin의 pyrogram에서 볼 수 있는 step I의 M=110, 180, 302에 해당하는 monitoring의 적은 peaks는 열분해에 의한 것이 아니라 chlorogenic acid와 rutin의 electron impact ionization에 의해 생성된 mass fragments이다. 또한 pyrogram상에서 볼 수 있듯이 chlorogenic acid에서의 catechol 생성은 rutin의 경우에 비해 현저하였다.

Direct inlet/MS에 의한 열분해 방법은 열분해 후 sampling 과정을 거쳐 열분해 산물을 확인하는 방법보다 매우 적은 시료양(mg range)으로도 열분해 경로의 추적 및 열분해 산물의 확인이 가능하다. 또한 pyrolyzer/GC에서는 열분해 產物중 극성이 크고 휘발성이 적은 化合物은 직접 분석이 곤란하나 이 방법으로는 caffeic acid, quercetin, catechol등이 직접 MS로 확인가능 하였다. 이러한 방법은 여러 化合物의 pyrolysis 경로 추적 및 열분해 產物의 확인에 효과적으로 응용될 수 있을 것이다.

이러한 열분해 결과를 토대로 HPLC와 GC를 利用하여 잎담배 polyphenols와 연기成分중 catechol의 상관관계를 추적하였다. 잎담배의 polyphenols를 HPLC로 분석하는 여러가지 방법이 알려져 왔으나¹⁴⁻¹⁵⁾ 여기서는 신속하고 간단한 방법으로 methanol-0.1M KH₂PO₄ (40 : 60)를 용출용매로 利用하였다. Fig. 5의 chromatogram에서 볼 수 있듯이 잎담배 polyphenols의 주종을 이루는 物質은 chlorogenic acid와 rutin이므로 2 化合物이 catechol의 가장 중요한 전구체로 作用한다는 것을 추정할 수 있다. 그 밖의 polyphenols는 정량적으로 미량이며 그 구조역시 chlorogenic acid, rutin의 구조와 유사한 것이 대부분이므로 2 化合物에 대한 열분해 추적만으로도 관련성추적이

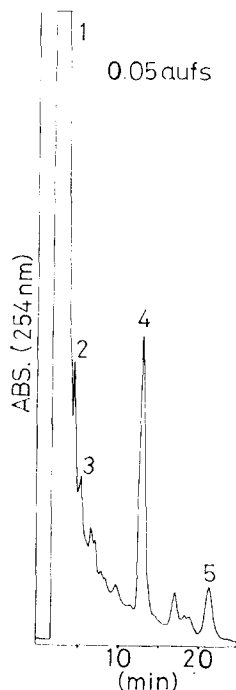
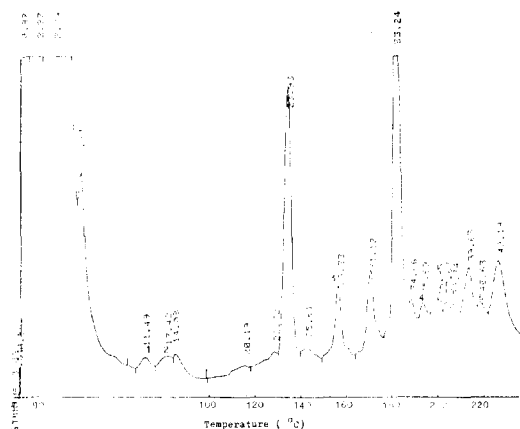


Fig. 5- HPLC chromatogram of polyphenols from tobacco (Hyangcho). Key-1: Chlorogenic acid; 2: Esculin; 3: Scopolin; 4: Rutin; 5: Quercetin.



타당성을 가진다. HPLC 分析 시료와 同一한 잎담배에 의해 제조된 cigarette의 전입자상 물질중 phenolic fraction의 GC 分析 結果 얻어진 chromatogram을 Fig. 6에서 볼수 있다. 여기서 phenol, cresol, hydroquinone, resorcinol, pyrogallol 등의 phenols도 확인되나 catechol이 양적으로 가장 많으며 catechol을 제외한 다른 phenols의 발압과의 관련성은 미미하다고 보고되어 있으므로 catechol 만을 대상으로 상관성을 추적하였다. pyridine 추출法 및 유도체화에 의한 catechol 정량은 이제까지 주로 利用되어 온 연기응축물의 분회에 의한 方法¹⁶⁾에 비해 간단하고 신속하였다.

4품종에 대한 chlorogenic acid, rutin과 catechol의 상관성을 도시한 것을 Fig. 7에서 볼수 있다. 여기서 chlorogenic acid, rutin과 catechol 간에 상관성이 존재함을 알 수 있고 특히 chlorogenic acid가 담배연기중 catechol의 전구체로 가장 현저한 作用을 함을 알 수 있다.

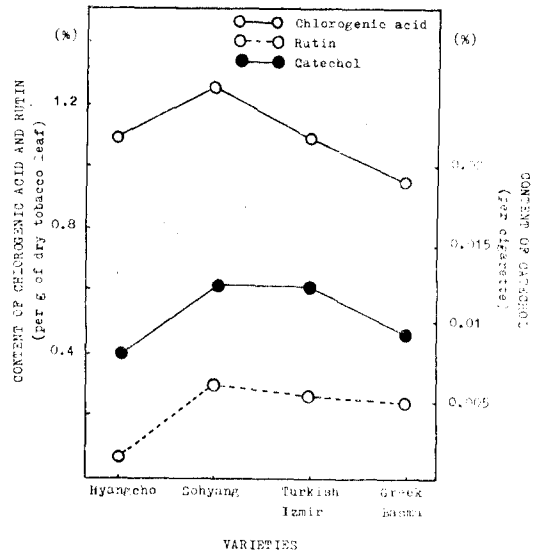


Fig. 7—Interrelationship between chlorogenic acid and rutin in tobacco leaf and catechol in cigarette smoke.

結 論

연기成分중 발암물질로 알려진 catechol의 전구체로 추정되는 잎담배成分중 chlorogenic acid와 rutin을 direct inlet/MS를 利用하여 열분해 경로 및 열분해 産物을 확인한 結果 caffeic acid, quercetin, catechol 등의 열분해 産物이 확인되었다.

또한 HPLC 및 GC를 利用하여 전구체인 chlorogenic acid, rutin과 열분해 産物인 catechol을 잎담배 및 연기의 전입자상 물질로부터 分析한 結果 catechol의 가장 주요한 전구체는 chlorogenic acid임을 發見할 수 있었다.

文 獻

1. J.S. Jacobson, *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 580 (1961).
2. W.S. Schlotzhauser and O.T. Chortyk, *Tob. Sci.*, **24**, 25 (1981).
3. W.J. Chambelain, D.B. Walters, M.E. Snook and O.T. Chortyk, *Bert. Tabakforsch.*, **8**, 133 (1975).
4. M.R. Gverin and G. Olerich, *Tob. Sci.*, **19**, 44 (1976).
5. S.S. Hecht, S. Carmella, H. Mori and D. Hoffmann, *J. Nat. Cancer Inst.*, **66**, 163 (1981).
6. A.C. Weaving, *Tob. Sci.*, **2**, 1 (1958).
7. W.A. Court, *J. Chromatogr.*, **130**, 287 (1977).
8. B.C. Winkler and W.J. Dunlap, *J. Chromatogr.*, **35**, 570 (1968).
9. E.R. Blakely, *Anal. Biochem.*, **15**, 130 (1966).
10. E.B. Higman, R.F. Severson, R.F. Arrendale and O.T. Chortyk, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 5 (1977).
11. A. Davis and J.H. Golden, *European Polymer J.*, **4**, 581 (1968).

12. R.C. Levy and D.L. Fanter, *Analyt. Chem.*, **41**, 1465 (1969).
13. W.S. Schlotzhauser, R.F. Severson, O.T. Chortyk, R.F. Arrendale and H.C. Higman, *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 992 (1976).
14. R.M. Cassidy and D.S. LeGay, *J. Chromatographic Sci.*, **12**, 85 (1974).
15. R. Galensa and K. Hermann, *J. Chromatogr.*, **189**, 217 (1980).
16. I. Schmeltz, C.T. Dooley, R.L. Stedmann and W.J. Chambelain, *Phytochem.*, **6**, 33 (1967).