

## GC/MS에 의한 잎담배중 Phenolic Acid의 分析

朴 晋 佑

韓國人蔘煙草研究所

(Received February 12, 1982)

Jeen Woo Park

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul 110, Korea*

### Analysis of Phenolic Acids in Tobacco Leaf by GC/MS

**Abstract**—A GC/MS method was developed to analyze phenolic acid extract from tobacco leaf. Extracted acids were converted to their methyl esters by refluxing with 3M hydrogen chloride in methanol, and the esters were reacted with bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide plus 10% trimethylchlorosilane to silylate the phenolic groups. Derivatives of standard salicylic, p-hydroxybenzoic, vanillic, gentisic, p-coumaric, syringic, ferulic, and sinapic acids prepared by this procedure were analyzed by GC/MS on 20m×0.2mm column of SE-54 glass capillary. GC/MS analysis of the extract from tobacco leaf revealed the presence of salicylic, p-hydroxybenzoic, vanillic, gentisic, protocatechuic, p-coumaric, syringic, gallic, ferulic, caffeic, sinapic, and quinic acids, respectively. The quantitative analysis of these phenolic acids were achieved by using multiple ion selection technique.

Phenolic acid는 대부분의 植物體에서 發見되는데 이것은 香氣, 색상등과 관련을 가짐으로써 관심의 대상이 되고있다. 특히 잎담배중의 phenolic acid는 담배의 연기成分중 조발암물질로 최근 많이 研究되고 있는 catechol의 전구체로 추정되어 毒物學的 研究의 대상으로서 중요시 되고 있다.<sup>1)</sup> 이러한 毒物學的인 研究를 위해 신속하고 분리가 좋으며 재현성이 우수한 分析方法이 요구된다.

Phenolic acids의 分析方法으로는 paper chromatography法<sup>2)</sup>, TLC法<sup>3)</sup>, column chromatography法<sup>4)</sup> 등이 알려져 왔으나 이러한 方法들은 많은 시간과 노력이 필요하고 재현성이 결여되어있다.

Phenolic acids의 gas chromatography에 의한 分析方法은 phenolic acids의 광범위한 분자량, 극성등으로 인해 bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide에 의한 유도체화<sup>5)</sup>, methyl ester化<sup>6)</sup>, ethyl ester化<sup>7)</sup> 등의 여러가지 方法들이 시도되어 왔으나 유도체화된 phenolic acids의 불안정성 등이 문제점으로 되어왔다. 최근에 cereal straws, sphagnum moss등의 phenolic acids 分析을 위해 개선된 유도체화 方法이 보고되고 있다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 잎담배에 잔존하는 미량의 phenolic acid를 分析하기위해 안정된 유도체 화물의 形成과 GC/MS에 의한 분리확인 및 data system을 利用한 정량등의 方法을 검토하였다.

### 實 驗 方 法

**試藥 및 試料**—표준물질인 salicylic, p-hydroxybenzoic, vanillic, gentisic, p-coumaric, syringic, ferulic, sinapic acid 등은 Sigma 제품을, 10% trimethylchlorosilane이 함유된 bis(trimethylsilyl)

trifluoroacetamide와 acetonitrile은 Pierce 재품을 사용하였다. 그의 ethyl acetate(和光, 특급), MeOH (F. Merck, GR), HCl(和光, 특급), sodium bicarbonate(和光재품을 감압下에서 300°C로 baking 한후 사용) 등의 시약을 사용했다. 일담배 시료는 1981년산 Turkish Izmir의 생엽을 건조시킨후 60°C에서 재건조하고 분쇄하여 16 mesh체를 통과한 분말을 사용하였다.

**Phenolic acids의 抽出**—일담배 분말 5g을 0.1% HCl이 포함된 100ml의 Me-OH에 넣고 2시간동안 reflux 한후 여과하였다. 여과물을 100ml의 1M HCl에 넣고 1시간동안 다시 reflux시키고 여과하였다. 이 여과물을 20ml의 ethyl acetate로 3번 추출하고 그 추출물에 20ml의 5% sodium bicarbonate를 가하여 다시 추출하고 HCl로 pH가 3.5되게한 뒤 25ml의 ethyl acetate로 2번 추출하였다. 이 추출물을 감압농축하여 잔사를 얻었다.

**Phenolic Acids 抽出물의 誘導體化**—잔사를 3M HCl이 함유된 MeOH 5ml에 넣고 30분 동안 reflux 시켜 ester化 하였다. 용매를 날려보낸후 잔사를 1.8ml의 acetonitrile에 녹여 10% trimethylchlorosilane이 함유된 bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide 0.2ml를 가하고 60°C에서 30분동안 反應시켜 trimethylsilylation하였다.

**GC/MS에 의한 分析條件**—사용기기는 Varian 3700 GC와 open split로 coupling된 Finnigan MAT 212 MS와 SS MAT 188의 data system이며 각 成分의 확인은 mass spectrum data와 표준物質의 retention time으로 결정하였다. 자세한 分析조건은 Table I 과 같다.

Table I - Conditions of GC/MS.

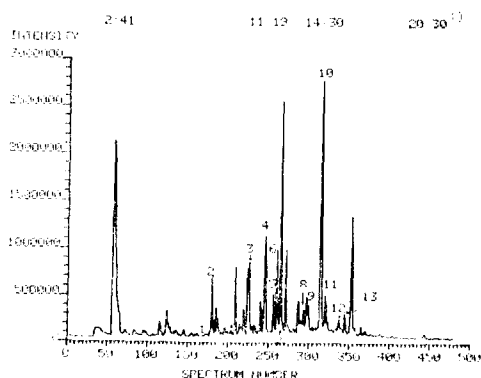
Column: SE-54 glass capillary (20m×0.2mm)
Flow rate: 1.2ml/min helium
Injection: 1 μl, splitless mode
Oven temperature: 50°C to 220°C, rate=10°C/min
Ion source pressure: 1.8×10 <sup>-5</sup> torr
Ionizing voltage: 70eV
Emission current: 1 mA
Interface: open split coupling

成分에 대해 얻어졌다. 이 검량선에 시료에서 얻어진 각 phenolic acid 성분의 peak area를 대비시켜 정량하였다.

**정량**: Salicylic, p-hydroxybenzoic, vanillic, gentisic, p-coumaric, syringic, ferulic, sinapic acids 각 표준물질 6, 4, 2mg을 3M HCl이 포함된 MeOH 5ml에 녹여 시료와 같은 방법으로 유도체화 하여 GC/MS로 分析하였다. GC/MS 分析에 의해 얻어진 scanned data를 multiple ion selection data로 전환하고 그 결과 각 molecular ion plot에 나타난 peak area를 data system으로 계산하여 검량선을 얻었다. 이러한 방법으로 양호한 직선성을 가진 검량선이 각

### 實驗結果 및 考察

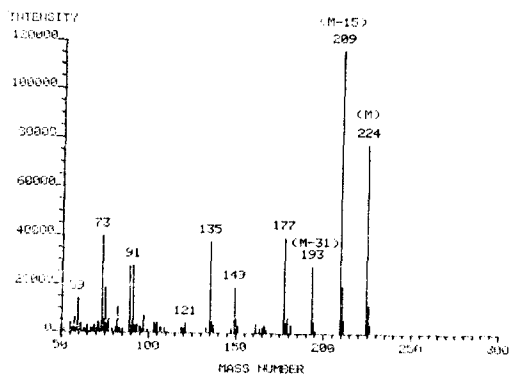
**Phenolic Acids의 確認**—GC/MS에 의한 分析으로 얻어진 일담배의 phenolic acid 추출등의 total ion current chromatogram은 Fig. 1과 같다. Phenolic acid methylesters는 가장 감도를 높여도 분수 없었고 silyl ether/ester 유도체만이 확인되었다. Phenolic acid 유도체들의 mass spectra는 유사성을 보였는데 m/e 73, M-31, M-15, M<sup>+</sup>등이 특징적인 ions로 나타났다. Fig. 2에서 p-hydroxybenzoic acid 유도체의 mass spectrum을 볼 수 있다. Salicylic acid와 p-hydroxybenzoic acid의 유도체는 molecular ion이 224로 같고, gentisic acid와 protocatechuic acid의 유도체 또한 molecular ion이 312로 동일하나 salicylic acid와 gentisic acid의 유도체들이 먼저 유출되었다. 여기서 polyphenolic compounds중 coumarin계열 化合物인 scopoletin도 확인할 수 있었으며 hydroxyl group이 4개로 극성이 상당히 큰 quinic acid등도 분석가능했다. 유도체화물의 안정



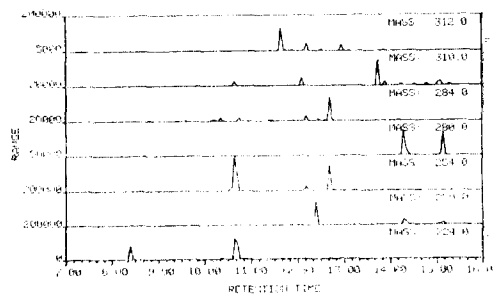
**Fig.1-** Total ion current chromatogram of ether/methyl esters of phenolic acids trimethylsilyl from tobacco leaf on a SE-54 glass capillary column. Key-1: retention time.

성은 유도체화 과정과 유도체화 후의 수분증재 여부에 의해 크게 좌우되는데, 무수시약들을 사용하고 소량의  $\text{NaSO}_4$ 를 유도체화물에 가한 후 1달간 밀폐용기에 보관한뒤 分析하여도 분해산물등을 볼수없어 유도체화물이 상당히 안정함을 확인할 수 있었다. (chromatogram생략)

**Phenolic Acids**의 定量—GC/MS 分析에 의해 얻어진 scanned data를 각 유도체의 molecular ion, mass tolerance, time window 등의



**Fig.2-** Mass spectrum of p-hydroxybenzoic acid derivative.



**Fig. 3-** Multiple ion selection plot of trimethylsilyl ether/methyl esters of phenolic acids from tobacco leaf.

**Table II** -Phenolic acids in tobacco leaf.

No. (Fig. 1)	Acid	Molecular ion of derivative	Retention time (min:sec)	Content ( $\mu\text{g/g}$ )
1	Salicylic	224	7 : 37	62.5
2	p-Hydroxybenzoic	224	8 : 24	206.9
3	Vanillic	254	10 : 35	400.1
4	Gentisic	312	11 : 32	700.2
5	Protocatechuic	312	12 : 02	
6	p-Coumaric	250	12 : 15	384.6
7	Syringic	284	12 : 32	181.8
8	Gallic	400	13 : 42	
9	Ferulic	280	14 : 12	365.3
10	Caffeic	314	14 : 30	
11	Scopoletin <sup>1)</sup>	264	14 : 52	
12	Sinapic	310	15 : 32	44.1
13	Quinic	494	15 : 51	

1) coumarins

parameter를 선택한 후 multiple ion selection data로 전환하여 얻어진 multiple ion selection plot은 Fig. 3과 같다. 얻어진 plot에서 각 phenolic acid 유도체의 peak area를 data system으로 계산하여 검량선과 대비 정량한 결과가 Table II와 같다.

재현성을 비교하기 위해 5회 반복시험을 microprocessor가 부착된 Hewlett Packard 5840 A GC로 6'×1/8" OV-17 column을 이용하여 시도한 결과, vanillic acid의 경우 표준편차가 ±3.21%였으나 이 방법에 의해서는 ±1.03%로 나타났다. 이러한 정량 방법으로 얻어진 data는 computer에 의해 직접 MS의 magnetic field, ion accelerating voltage가 변화되어 유도된 peak jumping으로 얻어진 real multiple ion selection data에 비해서는 그 재현성이 약간 부족하나 GC에 의한 정량에서 야기될 수 있는 인접 peaks 간의 분리문제, baseline drift등에 의한 문제점들을 제거할 수 있어 GC를 이용한 경우보다 재현성이 우수하였다.

### 結 論

1. 잎담배의 phenolic acid 추출물을 유도체화하여 GC/MS로 분석한 결과 12 phenolic acids를 확인할 수 있었다.
2. Phenolic acid의 정량에 있어 GC에 의한 방법보다 data system을 이용한 multiple ion selection 방법이 우수한 재현성을 보여주었다.

### 文 獻

1. S.S. Hecht, S. Carmella, H. Mori and D. Hoffmann, *J. Nat. Cancer Inst.*, **66**, 163(1981).
2. R.K. Ibrahim and G.H.N. Towers, *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 125(1960).
3. B.C. Winkler, W.J. Dunlap, L.M. Rohrbaugh and S.H. Wender, *J. Chromatogr.*, **35**, 570(1968).
4. M. Zucker and J.F. Ahrens, *Plant Physiol.*, **33**, 246(1958).
5. R.A. Anderson and T.H. Vaughn, *J. Chromatogr.*, **52**, 385(1970).
6. M. Erickson, S. Larsson and G.M. Miksche, *Acta Chem. Scand.*, **27**, 127(1973).
7. A. Salomonsson, O. Theander and P. Aman, *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 831(1978).
8. R.J. Hovat and S.D. Senter, *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1292(1980).