

잎담배중 α, β -4, 8, 13-Duvatatriene-1, 3-diols의 분리확인

이 문 수 · 이 운 철 · 박 진 우

한국인삼연초연구소 화학분석실

The identification of α, β -4, 8, 13-Duvatatriene-1, 3-diols in fresh tobacco leaves(Nicotiana Tobaccum L.)

Lee Moon-Soo, Lee Un-Chul, Park Jeen-Woo

Lab. of Chemical analysis,

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Seoul, Korea

(Received Apr. 16, 1982)

Abstract

4, 8, 13-Duvatatriene-1, 3-diols have been identified in the cuticular lipid of fresh Sohyang (aromatic cultivar) tobacco leaves. Their α, β -isomers were directly separated by SE-54 glass capillary column and identified by mass spectrometry. Gas chromatographic analysis revealed that the duvatatrienediols are major components in the cuticular lipid of Nicotiana Tabacum.

緒 論

잎담배의 표피세포가 분화되어서 毛茸(Trichomes)과 氣孔이 생성된다고 한다. 이 trichomes는 Solanum, Petunia, Physalis 또는 Lycopersicum屬 식물과 腺의 構造가 비슷하다고 1932년 Netolitzky¹⁾에 의해 보고 되었으며 그는 trichomes의 起源, 構造, 分類, 生理, 生態 등에 관해서는 보고한 바 있다. 그리고 1944년 Wolf와 Jones²⁾는 담배의 香과 trichomes에서 분비되는 물질과 관계가 깊다고 하였으며, Garner³⁾는 담배 香의 強度는 분비물의 量에 지배를 받고 있다고 하였다. 또한 田中⁴⁾은 trichomes의 선단에서 분비되는 물질의 量을 현미경적으로 관찰한 바도 있다. 이러한 관점에서 몇몇 연초학자^{2, 12, 14)}에 의해서 trichomes의 분비물을 연구하던중 1962년 Donald와 Rowland⁵⁾가 macrocyclic diterpene계통의 화합물인 Duvatatrienediols을 처음 분리하였다. 그후 Reid⁶⁾는 몇가지 品種에 대해서 diterpene계통 화합물의 소재를 확인한 바 있으며 1976년 Chang¹⁰⁾은 Burley 잎담배로부터 duvatatrienediols을 gaschromatography로

분리 확인하는 실험을 시도한 바 있다. 그러나 우리나라에서는 잎담배로부터 diterpene 계열의 화합물에 대한 연구가 활발하지 못한 실정이며 여러가지 경험적인 지견으로 볼 때 잎담배 trichomes에서 분비되는 duvatatrienediols의 분리확인 방법을 모색한다면 잎담배가 갖는 향격미 성분연구에 유용한 분석적 가치를 갖는다고 생각되어 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 표면지질의 추출

잎담배 생엽시료(Nicotiana Tobaccum L. Cultivar So-Hyang)100g을 취하여 chloroform(Wako, E.P. Japan) 1000ml에 30초간 침지시켜 추출하고, 다시 500ml chloroform에 먼저 추출한 시료를 10초간 침지시킨 후 위 두 용액을 합하여 Whatman No. 1 filter paper로 거른다음 50 ± 1 °C에서 rotary evaporator (Büchi 101, swiss)로 감압농축하고 -4 °C의 암소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. α, β -4, 8, 13 Duvatriene-1, 3-diols의 분리

실험 1에서 얻은 표면지질을 Chang¹⁰⁾의 방법에 준하여 100ml의 methanol (Wako E.P Japan)을 가하고 50°C에서 10분간 보온하여 농축물을 녹이고 상온까지 냉각시켜서 Whatman No. 1 filter paper로 거른다. 이 액을 질소기류하에서 20ml까지 농축하고 0°C에서 2시간동안 정치시킨 다음 침전물을 거르고 cold methanol 5 ml을 가하여 2회 세척한 다음 이 용액을 완전히 농축한다. Hexane-chloroform 1 : 1 (v/v) 혼합용액 10ml을 가하여 농축물을 녹이고 Silicic acid column을 사용하여 분리하였다. Silicic acid column (2 cm×15cm)은 Silicagel (Sigma type I, size 60~200 μ)을 사용하여 chloroform과 함께 충전한 후 chloroform 400ml을 사용하여 column을 세척한다. 앞에서 얻은 hexane-chloroform 혼합용액 5 ml을 column에 흡착시키고 hexane:chloroform 1 : 1 (v/v) 용액 300ml을 사용하여 용출시킨다. 다시 hexane:chloroform 1 : 2 (v/v) 용액 400ml로 yellow band를 완전히 용출시킨 다음 극성을 증가시켜 hexane:chloroform 1 : 3 (v/v) 용액 500ml로 용출시킨다. 이 hexane:chloroform 1 : 3 (v/v) 용액을 감압농축하고 -4°C 암소에 보관하면서 GC 및 GC/MS 분석에 사용하였다.

3. Gas chromatography에 의한 duvatrienediols의 분석 Gas chromatography는 flame ionization detector가 장비된 Hewlett Packard 5840A GC와 model 5840 A GC terminal을 사용하였다. Column은 3% OV-101 100/200 WHP (1.2m×6mm O.D, 2mm I.D.glass)을 사용하였고 분석조건은 injector temp. 300°C, detector temp, 300°C, column oven temp는 150°C에서 2분간 유지한 후 300°C까지 6°C/min.로 programing 하였다. carrier gas는 30ml/min.의 N₂ gas를 사용하였다.

4. GC/MS에 의한 thunberganoids의 분석

Gas chromatography-Mass spectrometer는 Varian 3700 GC가 장비된 Varian MAT 212 system을 사용하였으며 column은 SE-54 glass capillary (20m×0.25 mm ID)을 사용하였고 mass condition은 아래와 같다.

ion source : E.I
ionization voltage : 70eV
ion source temp : 250°C
emission current : 1 mA
vaucum : 1.8×10^{-5} Torr

분석조건으로는 1 μ l splitless mode를 이용하여 injection하고 column oven temp는 150°C에서 1분간 유

지한 후 240°C까지 10°C/min.으로 programing하였다. carrier gas로는 1.2ml/min.의 He gas를 사용하였다.

결과 및 고찰

실험에서와 같이 생엽을 30초간 chloroform에 침지시켜 추출한 표면지질은 엽육에서 추출된 chlorophyll의 영향으로 녹색을 띠고 있었으며 약 5% 정도의 농축물을 얻을 수 있었다. 그리고 silicic acid column에 흡착시켰을 때 column의 상부로부터 green band와 yellow band로 분리되었다. 용출액을 hexane : chloroform 1 : 1 (v/v) 용액으로 용출시켰을 때 green band가, hexane : chloroform 1 : 2 (v/v) 용액에서는 yellow band가 각각 용출되었다. 그 후 극성을 증가시킨 hexane : chloroform 1 : 3 (v/v) 용액에서 무색의 점성물질을 얻었다. 이 액의 GC chromatogram은 Fig. 1과 같다.

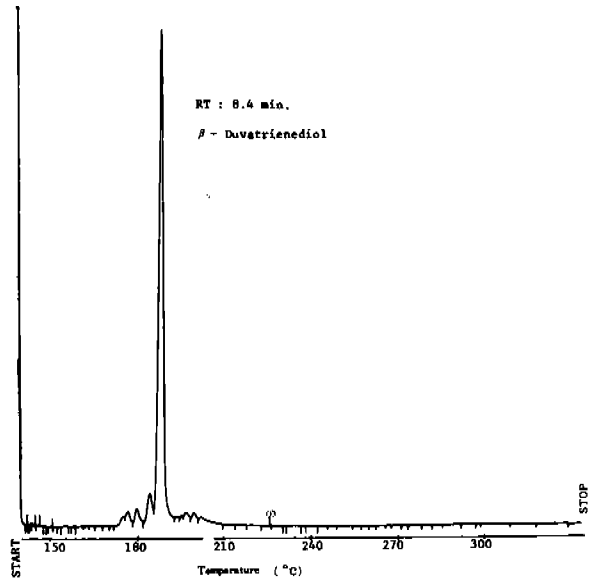


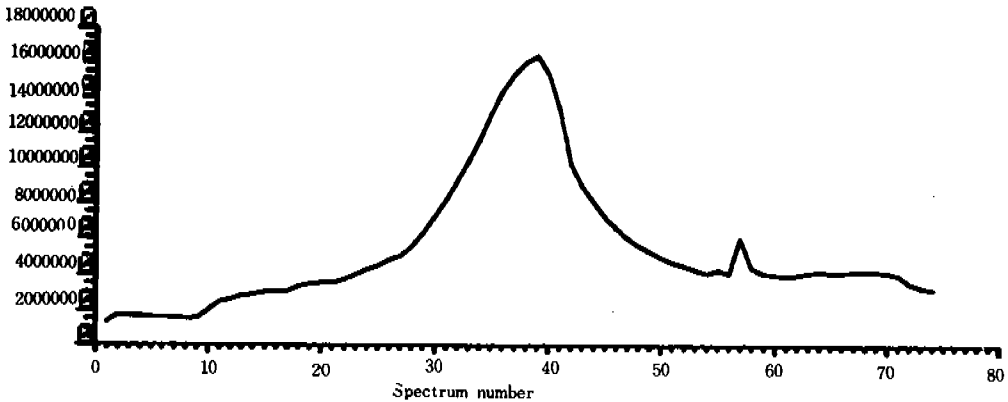
Fig. 1. GC chromatogram of β -4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diol. Conditions in text.

그림에서 알 수 있듯이 RT(retention time)가 8.4 min. 온도는 188°C에서 major peak를 분리할 수 있었다. 이 때 major peak의 area percentage는 용매 peak를 제외하고 약 70%이었다. 그리고 같은 GC조건에서 medium polar인 3% OV-17(50% phenyl methyl silicone) 100/120 chromosorb WHP column을 사용하였을 때는 RT가 13.2min. 온도는 217°C에서 major

peak가 분리되었으며 area percentage는 약 63%이었다. 이러한 결과를 3% OV-101 column과 비교할 때 RT가 4.8min. 늦게 major peak가 분리되었고 area percentage도 약 7% 정도 적게 나타났다. 이러한 결과로서 본 실험에서는 3% OV-101 column을 사용하였다. 또한 green band와 yellow band의 용출액에서는 duvatrienediols로 생각되는 major peak가 분리되지 않았다. 담배중에 존재하는 4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diols는 α , β form의 이성체가 있는것으로 Donald⁹⁾에 의해서 보고되었는데 앞의 3% OV-101 column에서 분리된 major peak가 어떠한 form의 duvatriene diols인가를 확인하기 위해서 Donald⁹⁾의 방법에 따라 silicic acid column에서 분리된 무색의 물질에 pentane을 가하고 -76°C에서 5시간 동안 정지시킨 후 결정 생성물을 분리하여 Fisher-Johns melting point (Model 4308 U.S.A) 측정기로 용점을 측정한 결과 127.0°C-127.5°C로 나타났다. 이 물질을 chloroform 녹인 후

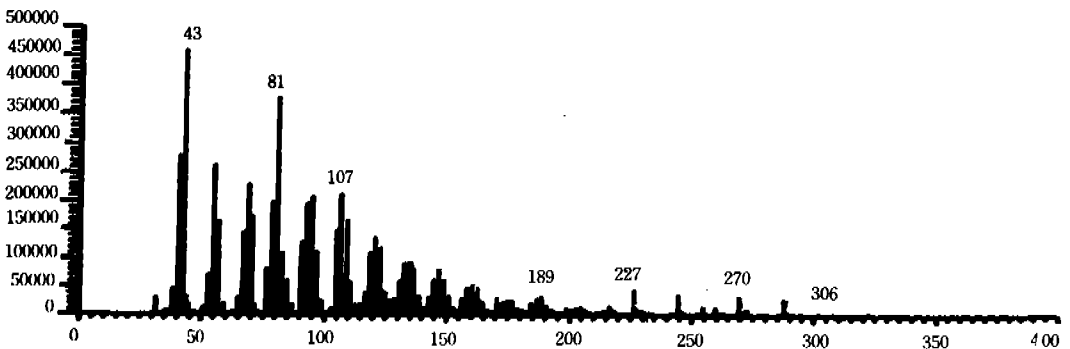
앞에서와 같은 GC조건으로 분리한 결과 Fig. 1에서 분리된 major peak와 같은 RT와 온도에서 분리되었다. 즉 이러한 결과로서 Fig. 1에서 분리된 major peak가 β -form인 것을 알 수 있었다. 또한 α -form으로 추정되는 결정물은 24시간 후에 석출되었으며 용점은 65.0~66.0°C로 나타났다. Gamou¹⁰⁾ 또는 Chang¹⁰⁾의 보고에 의하면 n-butylboronic acid로 유도체화시키지 않고서 직접 GC분석시에 α -form의 duvatrienediol의 분리가 용이하다고 보고한 결과와는 상반된 결과이었다. 이러한 결과는 앞으로 비교검토해야 할 것으로 생각된다.

Fig. 2는 chloroform:hexane 3 : 1 (v/v) 용액으로 분리한 물질을 direct inlet system으로 분석하여 얻은 mass spectrum이다. 본 spectrum에서 알 수 있듯이 4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diols (C₂₀ H₃₄ O₂ M.W. 306)의 분자량과 일치하였다.



ANALYSIS NAME : DUT. DAT : 10

MAR 4 82 15 : 03 : 47 U03.7



ANALYSIS NAME : DUT. DAT

SPEC# 31 NORM : A/SCALE : 500000

Fig. 2. Mass spectrum of duvatrienediol obtained by direct inlet / MS.

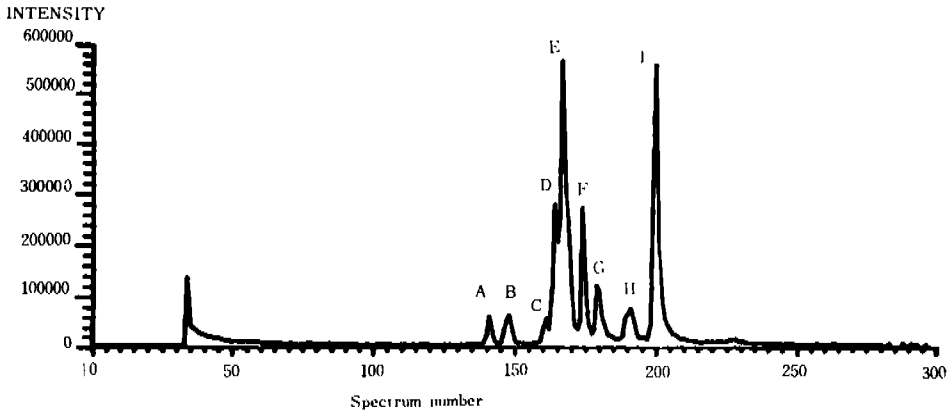


Fig. 3. Total ion current (TIC) chromatogram of thunberganoids.

Fig. 3은 SE-54 glass capillary column을 이용하여 분리한 spectrum이다. 그림에서 알 수 있듯이 9

개의 peak을 분리할 수 있었으며 그 중 E와 I와의 mass spectrum은 Fig. 4에 나타냈다.

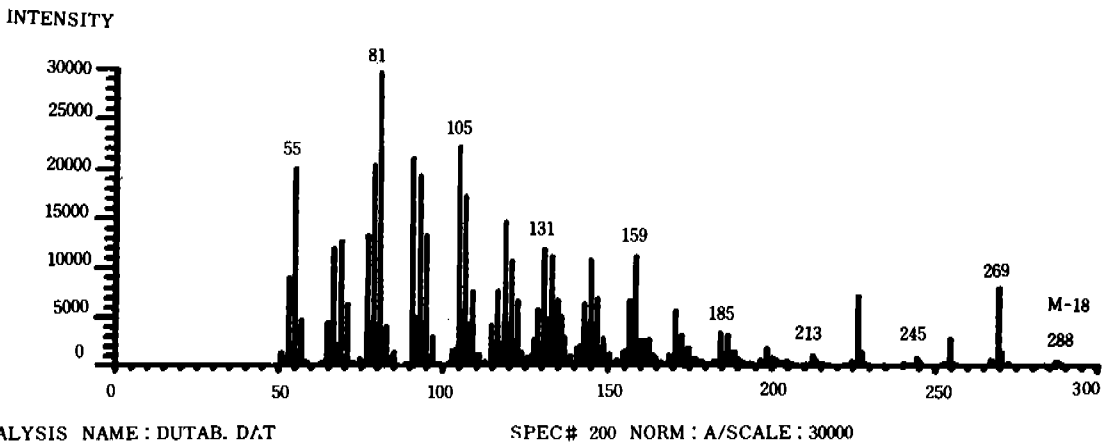


Fig. 4. Mass spectrum of α, β -4, 8, 13-divatriene-1, 3-diol.

이 mass spectrum에서는 한 분자의 H_2O 을 잃은 상태의 $288 m/e$ (M-18)의 분자량을 갖고 있었다. 이 mass spectrum은 EPA/NIH mass spectral data base 7220-78-2와 fragmentation pattern이 정확히 일치하였다. 이러한 점에서 Fig. 3의 E와 I가 α, β -4, 8, 13-divatriene-1, 3-diols인것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 α, β form의 이성체를 어떤 유도체화 과정이

없어도 분리가능 한 것으로 나타났다. 결정화 방법에 의하여 분리한 β -form의 divatrienediol을 같은 조건에서 GC/MS로 분리한 결과는 Fig. 5에 나타냈다.

본 그림에서 Spectrum number 200 즉 I의 intensity가 현저히 감소한 현상으로 나타났다. 이 결과는 Fig. 3과 5의 I가 α -form인것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 보고¹⁰⁾와는 상반되는 결과이었던

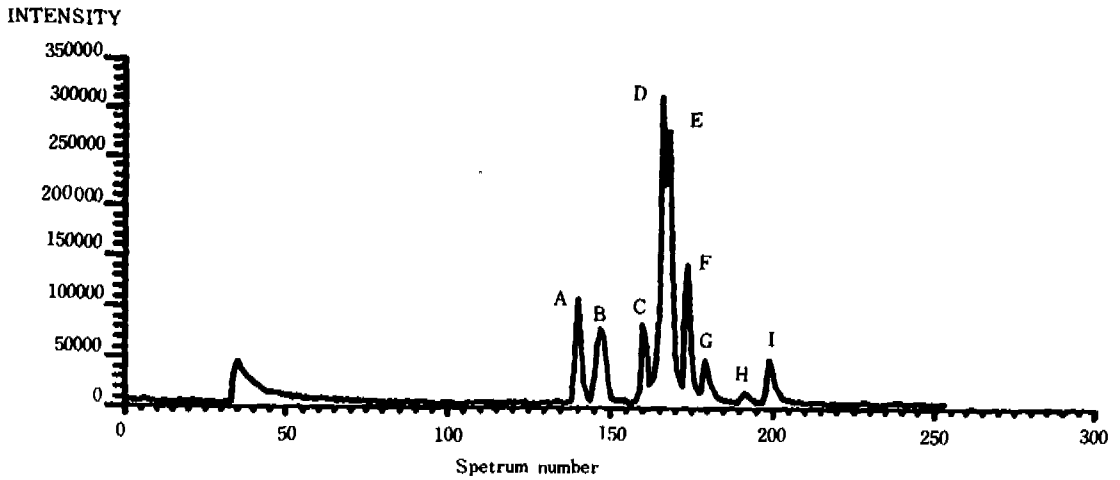


Fig. 5. Total ion current (TIC) chromatogram of purified β -4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diol.

다. 즉 *n*-butylboronic acid에 의한 duvatrienediols을 GC로 분리할 때 α -form이 β -form 보다 먼저 유출되는 것으로 알려져 있으나 본 실험조건에서는 β -form이 α -form 보다 먼저 유출되는 것을 발견할 수 있었다. Duvatrienediols 이 잎담배중에 존재할 때 α -form 보다 β -form이 빛이나 열에 대한 안정성이 강한 것으로 알려져 있으므로 β -form의 정확한 분리가 요구된다고 할 수 있다. 또한 위의 그림 3에서 spectrum number 141과 148 즉 A와 B도 서로 유사한 mass spectrum을 갖고 있었으며 이 화합물도 thunberganoids계통의 화합물로 사료된다. 이러한 thunberganoids의 화합물은 cembrene에서 유도되어 α , β -4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diols와 α , β -duvatriene-1.5-diols을 생성하고 이들은 curing이나 aging과정중에 분해되어서 solanone과 norsolanadione을 생성한다고 Fujimori¹¹⁾가 보고한 바도 있다. 이상과 같은 macrocyclic diterpene의 분리결과로 미루어보아 잎담배의 품종 및 건조과정 그리고 열분해과정에 대해서 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

향각미종인 소향의 생엽에서 표면지질층의 4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diols을 분리 확인하였다. 이 α , β -4, 8, 13-duvatriene-1, 3-diols의 이성체를 SE-54 glass capillary column으로 분리 할 수 있었으며, α , β isomer을 mass spectrometer로 확인하였다. GC로 분리한 결과 잎담배 표면 지질층의 major components인것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Ascias, C. P. and L. S. Wolfe. J. Chromatogr. 56:129-133 (1971)
2. Bentley, N. J. and F. A. Wolfe. Bull. Torrey Bot. Club, 72:345-360 (1945)
3. Donald, L. R. and R. L. Row Land. J. Org. Chem., 27:3989-3595 (1962)
4. Enzell, C. R. 32nd TCRC report 32-60 (1978)
5. Garner, W. W. The production of tobacco (1950)
6. Genji Gamou and Nobumaro Kawashima. Agric. Biol. Chem., 43:2163-2168 (1979)
7. Masso Tanaka. Special Bulletin 6. The Hatamo na Tobacco Experiment Station (1955)
8. Netolitzky, F. Die Pflanzenhaare. In: Linsbauer, K. Handbuch der Pflanzenanatomia. 1-253 (1932)
9. Reid, W. W. and R. Russel. A. du Tabac-Sect. 2-12-Berac-SEITA, 33-37 (1975)
10. Sni Y. Chang and C. Grunwald. J. Lipid Research, 17:7-11 (1976)
11. Takane Fujimori. Beit. Tabakfors, 9:317-325 (1978)
12. Weybrew J. A. and M. K. Chakraborty. Tob. Sci., 7:122-127 (1963)
13. Wolf, F. A. and E. F. Jones. Bull. Torrey Bot. Club, 71:512-528 (1944)
14. Wolf, F. A. Bull. Torrey Bot. Club, 73:224-234 (1946)