

GC-SIM에 의한 두종의 gibberellin 유도체의 분석

朴 根 亨

전남대학교 농과대학 식품가공학과
(1985년 4월 27일 수리)

Comparative Studies on Two Types Derivatives of Gibberellins for the Gibberellin Analysis by Gas Chromatography-Selected Ion Monitoring

Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chonnam National University, Kwang-ju 500, Korea

Abstract

Aiming at the improvement of accuracy and sensitivity of gibberellin analysis by gas chromatography-selected ion monitoring(GC-SIM), the mass spectra of two types of 29 gibberellin derivatives, methyl ester-trimethylsilyl ethers and trimethylsilyl ester-trimethylsilyl ethers, were obtained and their advantages and disadvantages in GC-SIM analysis are discussed.

서 론

식물체에 존재하는 극미량의 gibberellin(GA)을 동정, 정량하기 위해서는 gas chromatography-selected ion monitoring(GC-SIM)방법이 신뢰성이 높고 고감도의 분석법¹⁾으로 알려져 있다.

GC-SIM에 의한 분석은 하나의 화합물에 대해 2개이상의 특징적인 ion을 선택하여, GC의 retention time과 ion강도의 상대비로 동정을 행하게 된다. 이때 monitor하는 ion은 어느정도이상의 강도와 질량수가 기준질량수의 200%이내, 가능하면 150%이내 일 것이 요구된다.

GA의 분석은 GC의 liquid phase로 OV-1, OV-101, QF-1, SE-52 등이 널리 사용되고 있는데, 이들은 m/z 207, 355, 429, 503등의 ion을 back-

ground로 나타내므로 이들 ion을 기준질량 ion으로 사용하고 있다.

통상 GC-SIM에 의한 GA의 분석은 GA-methyl ester-trimethylsilyl ether (GA-Me-TMS) 유도체로 분석되어 지는데, GA-Me이나 GA-Me-TMS의 mass spectra는 MacMillan등²⁾에 의해 보고되어 GC-SIM의 monitor ion선택에 이용되고 있다.

그러나 어떤종의 GA-Me-TMS는 기준질량수이상의 질량범위에 어느정도의 강도를 갖는 2개 이상의 ion peak를 나타내지 않는 것이 있다. 즉 GA_{1,3,5,8,29,34}등은 각각 m/z 506, 504, 416, 594, 506, 506에 강한 분자 ion peak를 나타내나, m/z 355이상에서는 분자 ion peak의 20%이상의 강도를 갖는 fragmentation ion peak는 관측할 수 없어 이들 ion을 monitor한 GC-SIM의 동정은 신뢰도가 떨어진다. 또 GA₁과 GA₃₄는 chromato-

phy상의 행동이 대단히 유사할 뿐만 아니라 GA₁-Me-TMS와 GA₃₄-Me-TMS의 GC의 Retention time이나 mass spectra에 있어서 명확한 차이를 인정할 수 없어 양자를 구별하여 동정하기는 지극히 어려운 일이다.

또 GA_{1, 3, 5, 20, 29, 34}의 Me-TMS는 각각 m/z 506, 503, 416, 418, 506, 506에 monitor할 수 있을 정도의 강도를 갖는 ion이 존재하나, 이들 ion은 OV-1의 background peak인 m/z 415나 503의 ion 및 이들의 isotope peak의 방해로 받아 극미량 GA의 동정, 정량을 곤란하게 한다.

이상 열거한 문제점들은 식물의 내생 GA에 관한 일련의 실험³⁻⁶⁾에서 대두되었던 것으로, 이 과정에서 몇 종의 GA는 Me-TMS보다 trimethylsilyl ester-trimethylsilyl ether(TMS-TMS) 유도체가 유리하다고 보고⁶⁾한 바 있으나, 본 보고서에서는 GC-SIM에 의한 전반적인 GA분석의 정확성과 검출감도의 향상을 목적으로 29종의 GA를 TMS유도체로 만들어 mass spectra를 측정하여 monitor할 수 있는 ion에 대한 정보를 제공하고, 두종의 유도체가 GC-SIM에 의한 GA분석에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. Authentic GAs

GA는 日本 東京大學 農學部の 高橋信孝교수 연구실에서 *Gibberella fujikuroi* 및 식물체에서 분리한 것을 사용하였다.

2. 기기

Hitachi M60형 및 M80A형 Gas chromatograph

-mass spectrometer(GC-MS)를 사용하였다.

3. GC-MS분석

GC는 2% Silicon OV-1 on Chromosorb W(80-100mesh)의 Column(1m×3mm)을 사용하여 Carrier gas 유속 45ml/min(He), 온도 180~225°C(isocratic)에서 분석하였다.

질량분석은 ion화전압 21eV, ion화실온도 200°C에서 행하였다.

4. 유도체의 조제

건조시킨 시료에 pyridine-bis-trimethylsilylac-etamide-trimethylchlorosilane(10 : 5 : 1, v/v/v)의 혼액을 직접 가하여 TMS유도체화 하였다.

결과 및 고찰

GA를 GC-SIM을 포함한 GC-MS에 의해 분석하기 위해서는 GA를 보다 큰 휘발성을 갖는 유도체로 만들 필요가 있다. 특히 GC-SIM에 의한 동정 및 정량분석을 하기 위해서는 불순물이나 column의 역상에 의한 background의 방해를 줄이기 위해서는 고질량영역에 강도가 큰 peak를 갖는 유도체가 바람직하다. 또 유도체의 반응은 간편하고 정량적일것도 요구된다. 종래 사용되었던 GA-Me-TMS 이외의 유도체로는 GA-methyl ester-methyl ether(GA-Me-Me)이나 GA-TMS-TMS를 생각할 수 있으나 상기 조건에 부합한 유도체는 GA-TMS-TMS가 최적일 것으로 생각된다. 그것은 반응이 간편하고 정량적이며, 질량수도 이득가운데는 가장 크기 때문이다.

대표적인 GA 29종을 TMS-TMS 유도체화하여 GC-MS에 의해 측정하였다. Table 1에는 탄소수

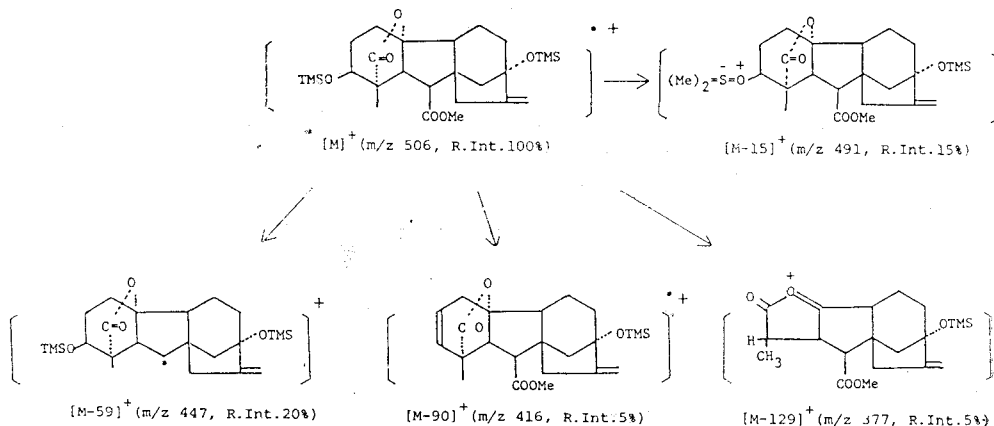


Fig.1. Fragmentation pattern of GA₁-Me-TMS

Table 1. Fragment ions and their relative intensities(%) of C₁₉-GA-TMS-TMS derivatives

	A ₉	A ₄	A ₇	A ₂₀	A ₅	A ₅₁	A ₄₀	A ₁	A ₃	A ₃₄	A ₂₆	A ₃₀	A ₁₆	A ₂₉	A ₈
M ⁺	388(10)	476(29)	474(7)	476(100)	474(100)	476(7)	476(0)	564(100)	562(100)	564(100)	578(100)	562(16)	564(15)	564(100)	652(100)
M ⁺ -15	373(33)	461(49)	459(23)	461(20)	459(53)	461(36)	461(33)	549(21)	547(21)	549(28)	563(23)	547(36)	549(46)	549(21)	637(11)
M ⁺ -43				433(22)											
M ⁺ -90	298(86)	386(48)	384(24)			386(63)	386(36)		472(8)	474(16)	488(4)	472(36)	474(59)		
M ⁺ -105							371(48)				473(3)				
M ⁺ -117/118	270(100)	358(14)	356(49)	359(46)				447(47)	445(34)		460(6)	444(10)	448(100)	447(41)	
M ⁺ -120/121		356(11)			343(11)		343(100)								535(39)
M ⁺ -123															
M ⁺ -129		347(31)													
M ⁺ -133-135		342(33)	339(95)			342(15)			428(19)	430(8)	445(3)	427(68)			
M ⁺ -137		339(25)							427(11)						
M ⁺ -146	242(11)												418(25)		
M ⁺ -162/163	226(31)		311(33)		312(15)		314(25)								506(7)
M ⁺ -175				299(29)	299(29)					389(25)				389(3)	
M ⁺ -177						296(6)	299(79)			401(3)					
M ⁺ -179/180			295(15)			268(100)	268(5)					382(20)	384(10)		
M ⁺ -206-208		268(15)								356(9)	371(5)		358(91)		
M ⁺ -224/225										340(6)		337(52)	340(48)		
M ⁺ -234/235											343(4)		330(21)		
M ⁺ -251-253							225(35)			311(5)		310(42)	312(20)		
M ⁺ -265-267									297(14)			295(13)		299(4)	
M ⁺ -314									296(13)				250(20)		
M ⁺ -323/324										229(14)			241(68)		
229 227		229(10)				227(27)				223(11)			240(80)		
224 221		224(100)	221(100)							207(100)		221(100)	227(33)		
207					207(100)	207(100)	207(21)			207(100)		207(71)			

Table 2. Fragment ions and their relative intensities(%) of C20-GA-TMS-TMS derivatives

	C-10 Me				δ-lactone					C-10 CHO				C-10 COOH	
	A ₁₂	A ₁₄	A ₅₃	A ₁₈	A ₁₅	A ₃₇	A ₄₄	A ₂₇	A ₂₄	A ₃₆	A ₁₉	A ₂₃	A ₁₃	A ₁₇	
M ⁺	476(3)	564(5)	564(51)	652(51)	402(21)	490(39)	490(61)	578(100)	490(0)	578(12)	578(20)	666(8)	666(6)	666(61)	
M ⁺ -15	461(32)	549(54)	549(35)	647(46)	387(19)	475(38)	475(14)	563(23)	475(41)	563(53)	563(47)	651(20)	651(78)	651(79)	
M ⁺ -28									462(22)	550(18)	550(85)	638(28)			
M ⁺ -56/57		507(4)											610(9)		
M ⁺ -90	386(26)	474(78)	474(30)	562(54)	312(100)	400(100)	400(4)	488(69)	400(24)	488(69)	488(18)	576(11)	576(81)	576(89)	
M ⁺ -105/106							384(68)								
M ⁺ -117/118	358(100)	446(63)	447(100)	535(100)	284(40)	372(10)			372(100)	460(48)	460(92)	548(25)	548(39)	549(45)	
M ⁺ -129														548(36)	
M ⁺ -133-135	343(9)							444(6)			443(56)		532(11)		
M ⁺ -146-148						342(12)		432(12)		432(25)	432(100)	520(13)		504(13)	
M ⁺ -162/163					239(73)	327(14)									
M ⁺ -174-176					226(11)	316(27)									
M ⁺ -180		384(21)		472(12)		310(62)			310(28)	398(44)		486(5)	486(12)	486(16)	
M ⁺ -191													475(14)		
M ⁺ -194							296(14)								
M ⁺ -208/209	268(12)	356(100)	356(15)	444(49)		282(51)		370(27)	281(52)	370(55)	370(39)	458(16)	458(100)	458(99)	
M ⁺ -219		345(99)		433(28)									447(27)		
M ⁺ -223				429(15)											
M ⁺ -235/236	241(51)	328(26)	328(34)	416(17)		254(7)		343(33)	254(31)	342(100)	343(24)	431(17)	430(64)	430(65)	
M ⁺ -246/247	240(45)	317(63)		405(22)								430(14)			
M ⁺ -261/262								316(20)			316(41)	405(8)			
M ⁺ -264									226(95)	314(12)					
M ⁺ -275		289(37)		377(16)											
M ⁺ -297/298			267(9)	355(22)						280(19)			368(47)	368(48)	
M ⁺ -325/326		340(44)	239(35)	327(55)						252(11)		341(9)	340(44)	340(9)	
M ⁺ -353												313(11)		313(22)	
224/223						224(30)				223(49)					
218/217							218(35)								
207			207(82)			207(50)	207(100)				207(71)			207(74)	

가 19인 GA(C19-GA), Table 2에는 탄소수가 20인 GA(C20-GA)의 TMS유도체에 대해, base peak에 대한 상대강도가 5%이상인 ion으로 m/z 200 이상의 ion과 이들의 상대강도를 나타냈다.

측정한 29종의 GA에서 GA₂₄-TMS-TMS 유도체는 GA_{24,40}-Me-TMS 처럼 분자 ion peak는 관측되지 않았으나 다른 모든 GA의 TMS-TMS 유

도체는 분자 ion이 관측되었다.

GA-TMS-TMS와 GA-Me-TMS의 mass spectra를 비교하여 보면 Me ester가 TMS ester로 바뀌어져 있음을 인정할 수 있다. 즉 GA₁의 경우 GA₁-Me-TMS의 fragmentation pattern은 Fig. 1과 같이 설명되어진다,²⁾ 이것에 대해 GA₁-TMS-TMS의 mass spectra는 Fig. 2와 같이 Me ester

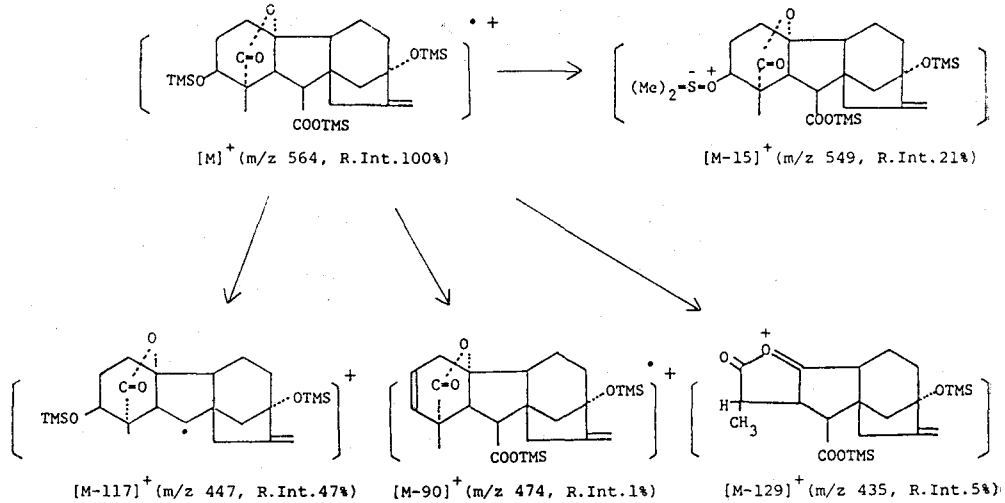


Fig. 2. Fragmentation pattern of GA₁-TMS-TMS

기를 TMS ester기로 바꾸어줌으로 설명될 수 있는 fragmentation ion이 관측된다. 즉 GA₁-Me-TMS와 GA₁-TMS-TMS의 fragmentation pattern은 기본적으로 동일 함을 나타내고 있다.

그러나 각 fragment ion의 상대적강도는 차이가 인정된다. GA₁-Me-TMS의 경우는 m/z 200 이상에서 M⁺(m/z 506)이 base peak가 되며 이 강도를 100%로 할때 m/z 491은 15%, m/z 447은 20%, m/z 416 및 390은 5%를 나타낸다. 한편 GA₁-TMS-TMS에서는 m/z 200 이상에서 M⁺(m/z 564)가 base peak로 되는 점에서는 동일하나, m/z 549는 21%, m/z 447은 47%, m/z 416 및 390은 4%를 나타내, m/z 549(M-15)⁺과 m/z 447(M-117)⁺ ion의 강도가 대응하는 GA₁-Me-TMS의 ion인 m/z 491(M-15)⁺, m/z 447(M-59)⁺ 보다 훨씬 높은 강도를 나타낸다. 특히 m/z 447의 상대강도가 GA₁-TMS-TMS에 있어서 크게 나타난 것은 6위치의 carboxyl기에 ester결합한 TMS기가 커다란 관능기임으로 이탈되기 쉽게 되었기 때문이라고 생각된다.

이와같이 GA₁-TMS-TMS에 있어서 m/z 549, 449의 상대강도를 높여주었다는 것은 두세개의 ion

peak를 monitor하여 이들의 상대강도비 및 retention time으로 동정을 행하는 GC-SIM에 있어서는 동정의 신뢰도를 높여주는 결과가 된다. 더욱, 분자 ion peak(GA₁의 경우는 base peak)가 m/z 564가 되어 액상의 background(m/z 503)의 영향을 벗어 남으로써 GA₁-TMS-TMS가 GA₁-Me-TMS보다 동정, 정량에 있어서 accuracy가 높아졌다고 말할 수 있다. 또 검출감도도 GA₁-TMS-TMS쪽이 background의 방해를 벗어남으로써 약간 높아져 20~30pg 이상에서 정량가능하게 된다.

이와같은 경향은 GA_{3,5,8,20,29}와 같이 13위치에 hydroxy기를 갖는 GA에 있어서는 일반적으로 인정된다. 특히 m/z 504에 base peak이면서도 분자 ion peak를 갖는 GA₃-Me-TMS와 m/z 562에 base peak이면서도 분자 ion peak를 갖는 GA₃-TMS-TMS와의 비교, 또 m/z 416에 base peak이며 분자 ion peak를 갖는 GA₅-Me-TMS와 m/z 474에 base peak이며 분자 ion peak를 갖는 GA₅-TMS-TMS와의 비교에 있어서, TMS-TMS유도체가 background영향을 벗어난다는 것은 커다란 장점이 된다.

문제되었던 GA₁과 GA₃₄는 Me-TMS의 경우, m/z 447의 상대강도가 GA₁은 47%, GA₃₄는 4%를 나타내 양자를 완전히 구별할 수 있다.

한편 13위치에 hydroxy기를 갖지않는 C19-GA에서는 GA-TMS-TMS가 GA-Me-TMS보다 고질량영역에 fragmentation ion peak를 나타냄으로서 저분자분순물에 의한 방해를 피할 수 있다는 것 밖에는 커다란 장점은 없다.

C20-GA에 있어서는 일반적으로 GA-TMS-TMS 쪽이 GA-Me-TMS보다 고질량영역 상대강도비가 큰 fragmentation ion peak를 나타내므로 GC

-SIM분석에서는 유리하다. 그러나 10위치에 aldehyde기를 갖는 GA(C-10 CHO GA)는 GC-SIM에 의해 분자 ion을 monitor하여보면 두개의 peak가 관측된다. 이것은 C-10 CHO GA가 용액중에서 aldehyde형과 lactol형이 평형상태로 존재하기 때문으로 생각된다. GA₁₉를 예들들면, Fig. 3과 같은 두 종의 유도체가 생성되기 때문이라고 생각된다.

따라서 C-10 CHO GA에 한해서는 GA-Me-TMS로 분석하는 것이 GA-TMS-TMS로 분석하는 것보다 바람직하다고 하겠다.

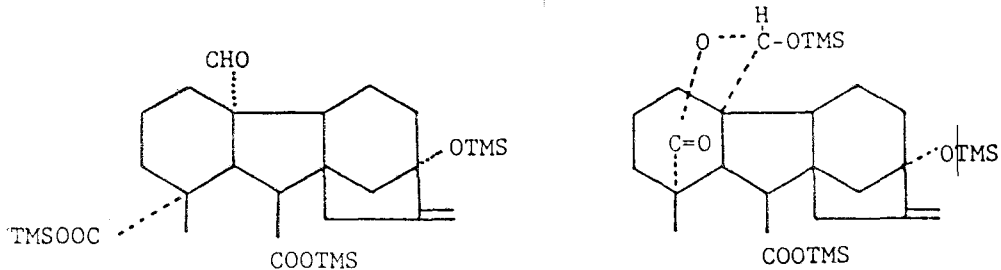


Fig. 3. Aldehyde and lactol forms of GA₁₉-TMS-TMS

이러한 사실을 바탕으로 식물배양세포의 endogenous GA에 관한 저자의 일련의 연구에서, 초기³⁾에는 Me-TMS로만 분석을 시도하였으나 후기^{4,5)}에는 목적 GA에 따라 유도체의 종류를 선택하여 분석을 행함으로써 극미량의 GA를 동정, 정량할 수 있었다.

초 록

GC-SIM분석법에 의한 GA의 동정 및 정량분석에 대한 정확성과 검출감도의 향상을 목적으로, 29종의 GA를 Me-TMS와 TMS-TMS유도체를 만들고, GC-MS에 의해 이들 유도체의 mass spectra를 측정하였으며, GC-SIM분석에 있어서 Me-TMS유도체와 TMS-TMS유도체의 장단점에 대해 검토하였다.

사 사

본 연구를 수행함에 있어서 지도하여 주신 일본 東京大學의 高橋信孝교수와 山口五十麿박사 그리고 실험을 도와준 藤澤祥子양에게 감사한 사의를 표하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Yokota, T., N. Murofushi and N. Takahashi: In 'Hormonal regulation of development I, Encyclopedia of Plant Physiology,' J. Mac Millan(ed.), 9: 113~201, Springer, Berlin. (1980)
2. Binks, R., J. MacMillan and R.J. Pryce: Phytochemistry, 8: 271(1969)
3. Park K.-H., A. Sakurai and N. Takahashi: Agric. Biol. Chem., 45: 2955 (1981)
4. Park K.-H., S. Fujisawa, A. Sakurai, I. Yamaguchi and N. Takahashi: Plant & Cell Physiol., 24: 1241 (1983)
5. Park K.-H., S. Fujisawa, A. Sakurai, I. Yamaguchi and N. Takahashi: Plant & Cell Physiol., 25: 1303 (1984)
6. Fujisawa S., I. Yamaguchi, K.-H. Park, M. Kobayashi and N. Takahashi: Agric. Biol. Chem., 49: 27 (1985)