

유리모세관칼럼에 의한 담배연기응축물중의 cis-trans형 지방산의 분리정량에 관한 연구

이문수, 이운철, 김찬호

한국인삼연초연구소 화학분석실

STUDIES ON THE SEPARATION & DETERMINATION OF CIS-TRANS FATTY ACIDS IN CIGARETTE SMOKE CONDENSATE BY GLASS CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY

Rhee, M.S., Lee, U.C., and Kim, C.H.

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute Dept. of Chemical Analysis

(Received for publication, April 20, 1985)

Abstract

Cis-trans forms of fatty acids in cigarette smoke condensate were separated and characterized using SP 2340 glass capillary gas chromatography.

The trans forms of fatty acids, palmitoeladic, t-vaccenic, eladic and linoeladic acid were identified.

These components were not present only 3% of the total fatty acid fraction, but they showed a very low transfer rate.

서 론

잎담배를 구성하고 있는 몇가지 중요한 성분중의 하나인 fatty acids는 smoking taste와 pH에 영향을 주기 때문에 smoking quality와^{18,20)} 밀접한 관계가 있다.

이러한 측면에서 fatty acids의 열적인 변화와 연기이행율에 관해서는 Haerberer⁶⁾ 그리고 Miyagawa¹³⁾와 그의 공동연구자들에 의해서 연구되었다. 이들은 fatty acids의 열분해생성물 중에서 몇가지 휘발성유기산을 확인하였다. 또한 Schlotzhauer¹⁶⁾는 담배제조시 가향료로 사용

되는 cocoa powder의 열분해 생성물중에서 palmitic acid와 stearic acid를 확인하였다. 한편 잎담배 및 담배연기응축물중의 fatty acids 조성을 조사하여 제품담배 맛과의 직접적인 관계를 유추하려는 시도¹¹⁾도 이루어졌다.

이상의 연구를 고찰하면 탄소수가 C₂에서 C₂₆까지의 포화지방산과 불포화지방산의 잎담배중 함량비율과 담배연기응축물중의 조성 및 이들의 연기이행율에 관해서 정량적인 분석연구가 이루어졌다.

여기에서 불포화지방산인 Palmitic, oleic, linoleic, linolenic acid는 cis와 trans

form의 기하학적 이성체가 존재할 수 있기 때문에 식품영양학적 측면에서의 연구^{9,10,12,22)}가 많이 있다. 그러나 현재까지 잎담배중에서는 trans form의 fatty acid는 존재가 확인된 바 없으며 다만 담배연기응축물 중에서는 1975년 Waters와 Chambelin²¹⁾에 의해서 처음으로 보고되었다. 담배연기응축물중의 trans form fatty acids는 다음의 몇가지 이유에서 흥미롭다.

첫째, 미묘한 분자구조의 변화가 tobacco flavor와 aroma에 영향¹³⁾을 줄것이며,

둘째, 깍연에 의한 cis와 trans form의 이성체가 체내에서 서로 다른 영양학적 평형¹⁴⁾을 가질것이며 아울러 생태학적 변화가 예상되며,

셋째, trans form의 fatty acids는 cancer와의 관계가 있다는 보고⁵⁾가 있기 때문이다. 이와같은 이유 때문에 많은 분석화학자들에 의해서 각종의 trans 이성체의 분리방법 및 정량법이 IR¹⁵⁾, TLC¹⁶⁾, GC¹⁷⁾, HPLC¹⁸⁾ 등의 분석기기를 이용하여 분석이 시도되고 있다. 따라서 본저자들은 이 연구에서 60 m SP2340 glass capillary column을 이용하여 담배연기응축물중에서 cis와 trans form의 fatty acids의 분리조건과 각 fatty acids의 분포 및 이행율에 관해서도 아울러 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 장치

표준품의 지방산 myristic(C_{14:0}), palmitic(C_{16:0}), palmitieladic(C_{16:1, t-7}), stearic(C_{18:0}), eladic(C_{18:1, t-9}), t-vaccenic(C_{18:1, t-11}), oleic(C_{18:1, C-9}), C-vaccenic(C_{18:1, C-11}), linoeladic(C_{18:2, t-9-12}), linoleic(C_{18:2, C-9-12}), α-linolenic(C_{18:3, C-9-12-15}), 등은 Sigma 특급을 사용하였으며 기타 시약들은 일반 화학실험실에서 사용되는 시약을 사용하였다.

Gaschromatography는 flame ionization detector가 장비된 Hewlett-Packard GC 5840 A와 GC 5840 GC terminal을 사용하였다. 이때의 분석조건은 다음과 같다.

Column : Length 60 m × 26 mm I.D. glass capillary coated with SP 2340

K value: 6.2

N EFF: Plates/meter: 3370

N Theoretical plates/meter: 4538

Oven temp. programming: Isothermally at 150 °C for 5min and programmed at 3 °C/min to 180 °C

Carrier gas flow: 1 ml/min N₂ gas

Detector: FID 250 °C, Inj. temp. 250 °C

Split ratio: 1/100

2. 연소조건

연소조건은 무게 0.72 ± 0.05 g, 흡인저항 40 ± 5 mmH₂O로 선별한 후 온도 20 ± 1 °C, 상대습도 60%의 조화실에서 48시간 조화시킨후 20 Port Henier Borgwaldt smoking machine RM 20/cs(West Germany)로 평균길이 30 mm까지 CORESTA¹⁹⁾ 표준조건으로 smoking하였다. 담배연기응축물의 포집은 두개의 dry ice trap장치를 이용하였다.

3. Silicic acid column을 이용한 fatty acids의 분리

잎담배와 담배연기응축물중의 지방산을 분획하기 위해서 다음 그림 1과 같이 조작하였다. 이 방법은 Serverson¹⁷⁾과 그의 공동연구자들에 의해서 개발된 방법을 약간 변형한 것이다. 잎담배 시료와 담배연기응축물을 250ml Saponification flask에 취하고 2N알칼성 KOH 용액 40ml을 넣은 후 2시간 동안 refluxing시킨 다음 실온까지 냉각시키고 증류수 50ml을 가한 후 진한 염산으로 친철키 pH 2로 조절하고 감압여과장치로 여과하였다. 거른액을 분액여두에 취하고 hexane 50ml을 사용하여 4회 반복해서 추출하였다. 추출액을 감압농축기로 잔사상

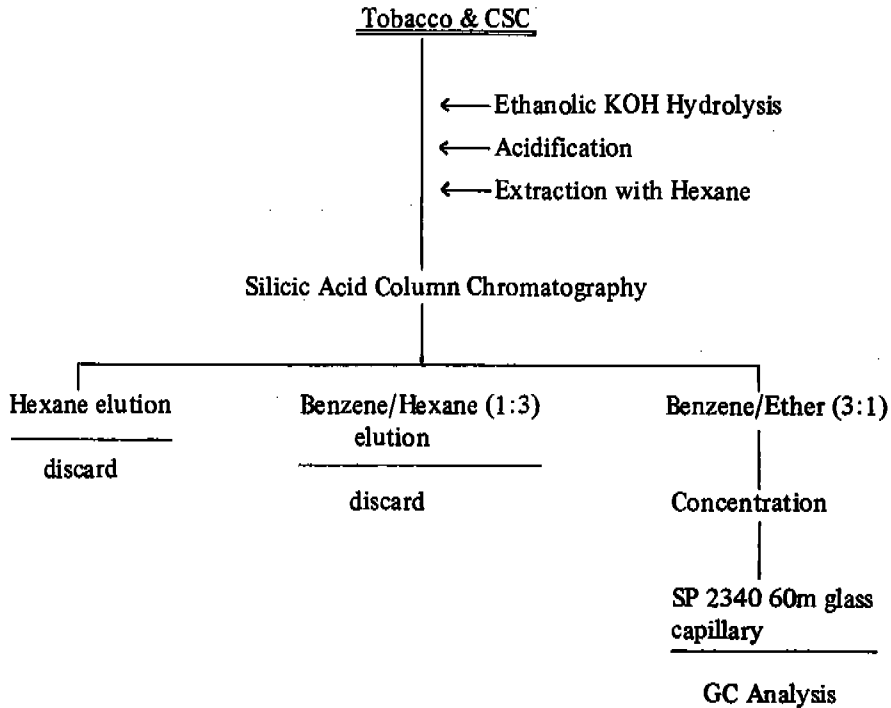


Fig. 1. Isolation scheme for hydrolyzed tobacco or CSC fatty acid.

태까지 농축하고 활성화 (150°C, 2hrs) 시킨 Silicic acid column을 이용하여 그림 1과 같이 분획한 후 BF₃-Methanol 용액으로 methylation 한 다음 GC 분석용 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

그림 2는 몇가지 cis form과 trans form standard fatty acid와 담배연기 응축물중에서 benzene/ether (V/V, 3:1) 용액에서 얻어진 시료의 15% argenation TLC chromatogram이다.

각 띠의 확인은 0.2% dichloro fluorescein ethanol 용액을 분무하여 정색반응을 이용하여 확인한 결과이다. 이 그림에서 알수 있듯이 표준품의 fatty acid는 분리가 용이하였지만 그림 2에서 보는 바와같이 시료중의 trans

form의 Rf 값이 linoeladic acid와 유사한 값을 보였지만 이 결과로서는 담배연기응축물중의 trans form 지방산을 확인하기에는 어려웠다.

다음 그림 3은 cis form과 trans form standard fatty acids의 GC chromatogram이다. 이 그림에서 알 수 있듯이 처음부터 myristic, palmitic, palmitoeladic, stearic, t-vaccenic, oleic, c-vaccenic, linoeladic, linoleic, linolenic acid 순으로 분리할 수 있었다. 이때의 GC 조건중 temp. programming는 initial temp. 150°C에서 180°C까지 3°C/min 증가시켰고 180°C 이상에서는 isothermal 이었다. 표 1은 표준지방산의 GC retention time을 carrier gas인 nitrogen flow rate와 column oven temperature을 변경시키면서 cis form과 trans form의 separation effect을 관찰한 것

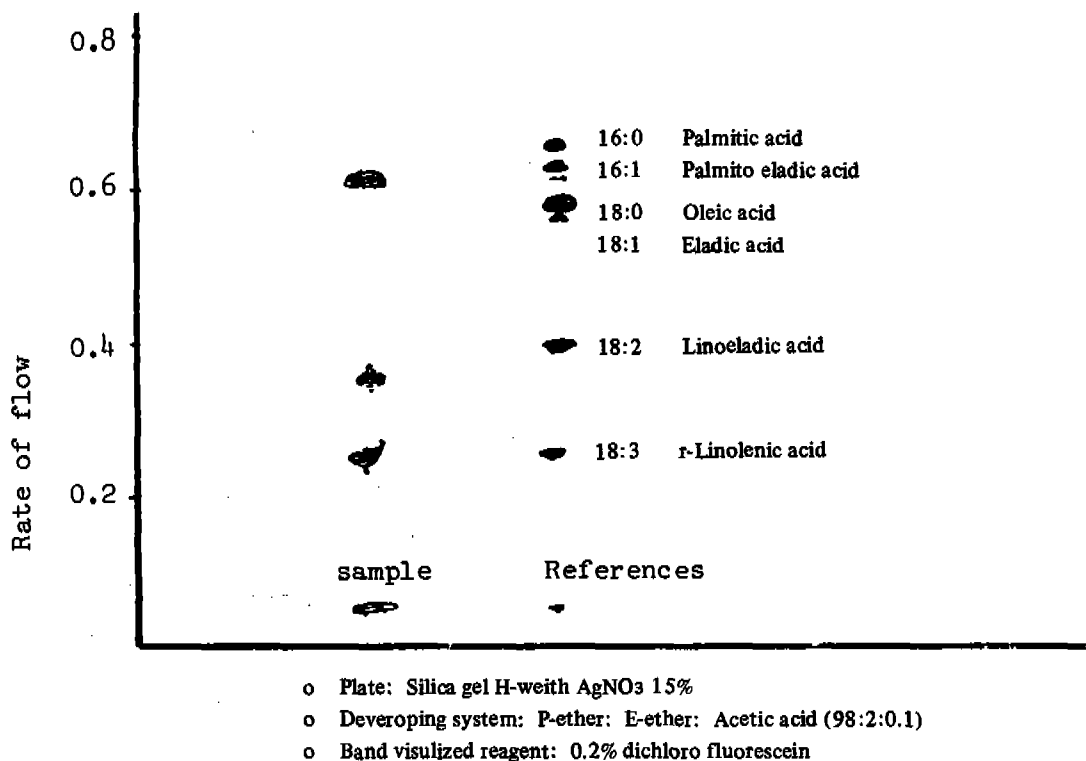


Fig. 2. Fractionation of CSC fatty acid methyl esters by argenation TLC.

이다. 최적의 분리조건은 그림 3의 peak No. 5인 eladic acid와 peak No. 6인 trans-vaccenic acid의 relative retention time의 차이로 고찰하였다. 이 표에서 알 수 있듯이 최적의 분리조건은 150°C에서 180°C까지 3°C/min으로 column oven 온도를 증가시키고 carrier gas인 nitrogen의 flow rate는 0.9ml/min.이 가장 우수하였다. 이때 C_{18:1}의 t-9과 t-11의 K' value는 1.004로 나타났다. 그리고 relative retention time (t-R value)은 7.55로 나타났다. 또한 100°C에서 220°C까지 3°C/min.로 programming 하였을 때는 C_{18:1}의 t-9과 t-11의 K' value는 1.004로 나타났지만 다른 trans form fatty acid isomer의 K' value는 상대적으로 표 1의 B 조건보다는 낮았다.

다음 그림 4는 담배연기응축물을 silicic

acid column chromatography에 의해서 benzene-ether 혼합용액으로 분획한 여액의 GC chromatogram이다. 이 그림에서 보는바와 같이 총 17개의 peak을 분리할 수 있었다. 각 peak의 확인은 standard fatty acids의 GC retention time과 GC-MS data에 의해서 이루어졌다. chromatogram상에 나타난 바와 같이 cis-vaccenic acid를 제외하고 모두 base line separation이 가능하였다. 이 중에서 trans form의 fatty acid는 palmito-eladic(C_{16:1}, t-9), eladic(C_{18:1}, t-9), linoeladic(C_{18:2}, t-9-12) acid를 분리 확인할 수 있었다. 이러한 정성적인 분석결과는 Walters²¹⁾와 그의 공동연구자들에 의해서 확인된 silar-10C packed column에 의한 것 보다도 분리능이 우수 하였을 뿐만 아니라 새로운 trans form의 fatty acid인 eladic acid

Table 1. Relative retention time of fatty acid by several GC condition with SP 2340 stationary phase.

Fatty Acid	A			B			C		
	Absolute R't	K value	t'R	Absolute R't	K value	t'R	Absolute R't	K value	t'R
16:0 (C)	39.01	1.033	—	21.36	1.059	—	28.31	1.048	—
16:1 (T)	40.31	1.112	1.30	22.64	1.278	1.28	29.67	1.154	1.36
18:0(C)	44.84	1.033	5.83	27.18	1.064	5.82	34.23	1.038	5.91
18:1 (T-9)	46.32	1.004	7.31	28.91	1.004	7.55	35.33	1.003	7.22
18:1 (T-11)	46.48	1.008	7.47	29.02	1.018	7.66	35.65	1.012	7.34
18:1 (C-9)	46.84	1.006	7.83	29.55	1.010	8.19	36.07	1.007	7.76
18:1 (C-11)	47.10	1.029	8.09	29.85	1.056	8.49	36.32	1.072	8.01
18:2 (T-9-T-12)	48.45	1.028	9.44	31.51	1.056	10.15	38.95	1.035	10.64
18:2 (C-9-C-12)	49.80	1.039	10.79	33.26	1.061	11.90	40.32	1.049	12.01
18:3(C-9, 12, 15)	51.72	—	12.71	35.29	—	13.93	42.29	—	13.98

A : Isothermally at 100°C for 10 min, and programmed at 1°C/min at 220°C.

B : Isothermally at 150°C for 10 min, and programmed at 3°C/min at 180°C.

C : Isothermally at 100°C for 10 min, and programmed at 3°C/min at 240°C.

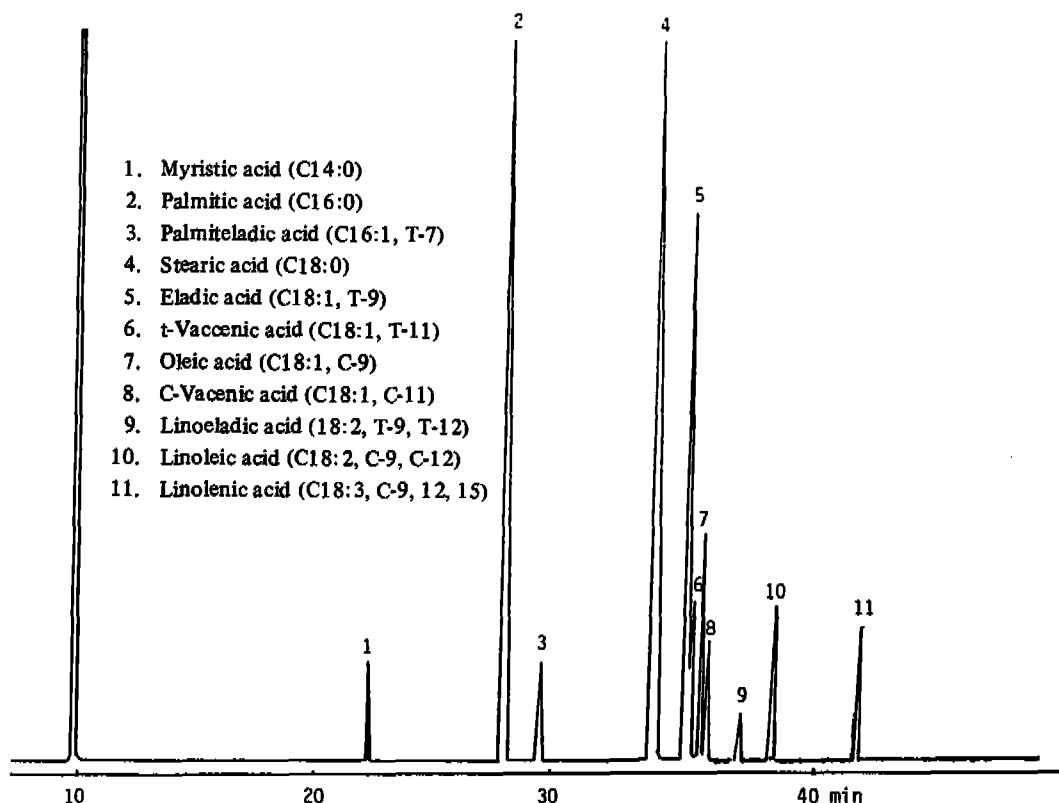


Fig. 3. GC Chromatogram of standard cis-trans fatty acid methyl esters.

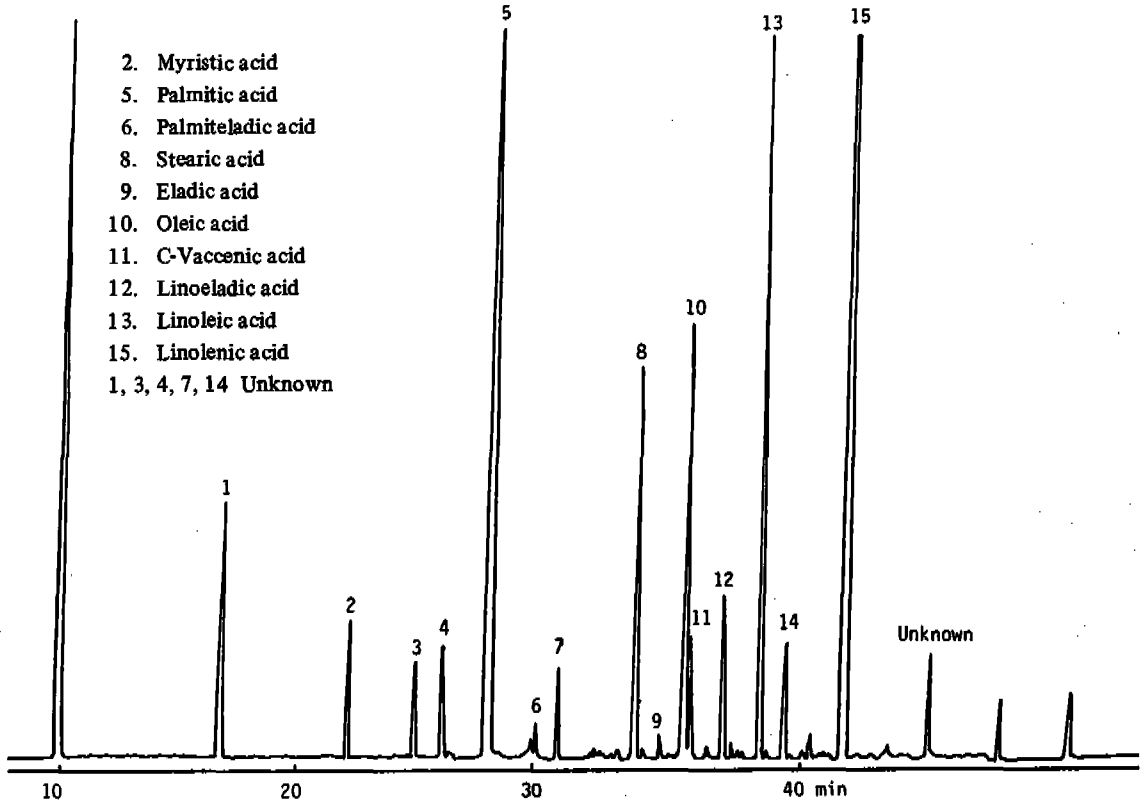


Fig. 4. GC Chromatogram of cis-trans fatty acids in cigarette smoke condensate.

(C_{18:1,t-9})을 확인 할 수 있었다.

다음 표 2는 그림 4에서 확인된 각 fatty acids의 absolute area 값과 이들의 조성비율을 살펴본 것이다. 이 표에서 알 수 있듯이 major fatty acids는 palmitic, α -linolenic, linoleic, oleic, stearic acid 순이었다. 이러한 조성비율은 benzene-ether 분획중 전체의 fatty acids 비율중 93.0% 정도였다. 또한 trans form의 fatty acids는 2.5%이었다. 이 중에서도 linoeladid acid는 전체의 2.4%로서 담배연기응축물중의 trans form fatty acids의 대표적인 산으로 밝혀졌다.

다음 표 3은 잎담배중에 존재하는 fatty acids의 이행율에 관해서 살펴본 것이다. 이 표에서 알 수 있듯이 각종의 fatty acids가 평균

11.0% 이행하는 것으로 나타났다. 이 값은 몇 가지 향료물질 (cocoa powder 등)에서 열분해 생성되는 fatty acids의 증가량을 고려하지 않는 값이다. palmitic acid는 15.1%가 이행하여 다른 fatty acids보다 많은 양이 이행하였는데 이러한 결과는 saturated fatty acids가 unsaturated fatty acid보다 물리적 특성과 분자구조적으로 안정하여 발생하는 결과로 생각된다. 또한 잎담배중에 존재하는 fatty acids는 다른 화합물과의 association structure 상태에 따라서 주류연으로의 이행율에 관여¹⁵⁾ 한다는 것을 시사해 주기도 한다. 또한 trans form fatty acids의 발생율은 linoeladid acid가 4.2% palmiteladid과 eladid acid는 각각 1%정도였다. 즉 이러한 결과는 잎담배중에 존재하는 fatty acid가 유

Table 2. Percent composition of some esterified saturated and unsaturated fatty acid found in Benzene-Ether fraction.

Fatty acid	Benzene-Ether fraction in CSC		Separation type
	Peak Area	Composition (%)	
14:0	6079	2.13	BB*
16:0	104152	31.52	BB
16:1 (T-9)	211	0.07	BV**
18:0	22954	8.05	BB
18:1 (T-9)	172	0.06	BB
18:1 (T-11)	tr	-	NS
18:1 (C-9)	24113	8.46	BV
18:1 (C-11)	5832	2.05	VV***
18:2 (C-9, C-12)	48721	17.09	BB
18:2 (T-9, T-12)	6813	2.39	BB
18:3 (C-9, 12, 15)	66087	28.18	BB
Total	285134	100	

* BB: Base line separation

** BV: Base line, valley separation

***VV: Valley, valley separation

리상태가 아닌 어떤 화합물과 연결되어 복잡한 구조를 갖고 있기 때문에 꺾연에 의한 cis form에서 trans form의 변화가 쉽게 일어나지 않는다는 것을 알 수 있었다. 본 저자들은 이러한 점을 간접적으로 확인하기 위하여 cis form의 fatty acid를 권련담배에 첨가하여 본 실험에서와 같은 연소조건으로 smoking한 후 그 변화율을 측정하여 대담히 높은 geometrical exchange가 발생하는 결과를 얻었다.

본 저자들은 이 연구를 토대로 꺾연에 의한 각종 화합물의 구조적변화가 담배 맛과 어떻게 영향을 주는가에 대해서 앞으로 연구할 것이다.

Table 3. Transfer rates for cis & trans fatty acids in to main stream smoke of brand cigarettes (Korean Sol.).

Fatty acid	Tobacco (ug/g)	Cigarette smoke condensate (ug/g)	Transfer (%)
16:0	1,345.7	202.8	15.1
16:1 (T-9)	ND	12.9	0.9
18:0	570.2	59.4	10.4
18:1 (C-9)	681.0	72.3	10.6
18:1 (T-9)	ND	10.5	1.5
18:1 (C-11)	ND	12.4	1.8
18:1 (T-11)	ND	ND	-
18:2 (C-9-C-12)	642.3	69.4	10.8
18:2 (T-9-T-12)	ND	26.7	4.2
18:3 (C-9-12-15)	3,720.0	301.4	8.1
Total	6,959.2	767.7	11.0

참 고 문 헌

- Allen, P.R., J. Am. Oil Chem. Soc., 46, 552-559 (1969).
- Conacher, H.B.S., J. Chromatogr. Sci., 14, 405-411 (1976).
- CORESTA method, No. 10 (1968).
- Emken, E.A., Lipids, 7(7), 459-466 (1972).
- Enig, M.G. et al., Fed. Proc., 37, 2215-2221 (1978).
- Haeberer, A.F. et al., Beitrage zur Tabakforschung, 8(3), 141-144 (1975).
- Heath, R.R. et al., J. of chromatogr. Sci., 15, 10-13 (1977).
- Higman, E.B. et al., J. Agr. Food Chem., 21(2) 202-204 (1973).

9. Hill, E.G. et al., *J. Nutr.*, 109, 1759-1766 (1979).
10. Islam, M.N. et al., *J. of Food Sci.*, 48, 100-110 (1983).
11. Kitamura, K., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 44, 1606-1608 (1971).
12. Maga, J.A. et al., *J. of Food Sci.*, 42, 1669-1670 (1977).
13. Miyagawa, M. et al., *Yukagaku*, 18, 854-859 (1969).
14. Raccuglia, G. and O.S. Privett, *Lipids*, 5, 85-89 (1970).
15. Rhee, M.S. et al., *J. of the Korean Soc. Tob. Sci.*, 5 (1) 67-72 (1983).
16. Schlotzhauer, W.S., *Tob. Sci.*, 12, 32-33 (1978).
17. Serverson, R.F. et al., *Tob. Sci.*, 12, 130-133 (1978).
18. Shigeo, I. et al., *Agr. Biol. Chem.*, 40 (10), 2005-2011 (1976).
19. Teranishi, R. et al., *Flavor Research, Principles and Techniques*, M. Dekker, New York, 282 (1971).
20. Tso, T.C., *Physiology and Biochemistry of tobacco plants*, Dewden, Hutchenson and Ross, Inc., stroudsburg pa (1972).
21. Walters, D.B., and W.J. chamberlain, *Analytica chimica Acta*, 77, 309-311 (1975).
22. Wood, R. et al., *J. of Biological Chemistry*, 252 (6), 1965-1970 (1977).