Journal of the Korean Society of
Tobacco Science. Vol.9. No.2 (1987)
Printed in Republic of Korea.

Duvatrienediol의 열변성화합물의 분리 및 확인

이 문 수 · 이 운 철 · 곽 재 진

한국인삼연초연구소 화학부

Identification of α,β-Duvatriene 1,3-diol derivaties in thermolyzates of Duvatriene from tobacco leaf by GC/MS

Moon-Soo, Rhee, Un-Cheoul, Lee and Jae-Jin Kwag

Division of Chemical analysis, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

(Received Sep. 13, 1987)

Abstract

α,β-4.8.13-Duvatriene-1,3-diols was identified as the major component of diterponoid extracted from *Nicotiana Tabacum* L.

The isolated duvatriendiol was thermolyzed at 300℃ under a stream of nitrogen. The approximately 20 compounds were separated from the thermolyzates and the 9 compounds of them were identified with GC/MS.

However, the therolyzates identified in this study differed in distribution from the products under the condition of a different temperature or photooxidation.

서 론

잎담배 표면에는 毛茸(Trichomes, leaf hair)이 표피세포로 부터 분화되어 장모, 단모로 발달하여 점성이 있는 물질을 분비하는데 이 현상에 대한 연구가 1932년 Netolitzky[14]에 의해서 시작되었다. 현재 trichomes을 구성하는 물질은 alkane 계열, labdanoids와 thunberganoids 화합물로 분류하고 있다. 이 중 thunberganoids 화합물 중 cembrane 형태의 diterpenoid 화합물인 α,β-4,8,13-Duvatrienediol(이하 DVT)은 Robert[18]와 Rowland에 의해서 그 화학적 구조가 처음으로 밝혀졌다.

그 후 SEITA의 Reid[16] 등이 이 DVT 화합물을 각종 식물속에서 검색한 결과 Nicotiana Sylvestris와 Nicotiana Tobaccum에서 많이 분리할 수 있었다고 보고하였다. 앞의 연구와 더불어 GC에 의한 분석법이 Chang[2] 등에 의해서 보고된 후 재배조건 및 잎담배의 건조방법[8] topping[4] 전후, insect resistance와의 관계등[19]이 잎담배의 품질과 관련하여 연구[11]가 수행되었다. 즉 담배 생육과정중 DVT의 함량수준 변화에 관한 연구[20]이며, 생합성된 DVT가 각종 biodegradation mechanism에 의해서 변화되어 isoprenoid 골격을 갖는 화합물로 전환되는 양상에 관한[5,6] 연구가 이루어졌다. 여기에서 tobacco like한 aroma와 taste를 발현하는 slanone 외 약 54종이 현재까지 밝혀졌다.[9] 또한 DVT의 인위적인 변성방법은 Aasen[1]의 ozonolysis가 있고 SO_2 gas에 의한 thio 화합물의 형성으로 담배 향기에 나쁜 영향을 주는 현상을 정성적으로 연구[15]한 바도 있다. 그러나 이러한 다양한 연구에도 불구하고 DVT의 열적인 분해과정 및 분해산물의 조성에 관해서는 많은 연구가 이루어지지 않았다. 다만 1982년 Katz[10]에 의해서 DVT를 250℃에서 열변성시켜 4종의 분해산물을 동정하였다.

이러한 미약한 연구는 DVT 및 그 분해산물에 대한 Smoke aroma와 taste 관련성을 밝혀내기에는 미흡한 점이 있으므로 본 연구에서는 열변성온도를 증가시켰을 때 그 분해산물의 분포와 조성, 그리고 DVT를 잎담배로 부터 분리 및 정제에 관해서 실험한 결과를 보고하고자 한다.

실험 및 방법

시 약

DVT의 열변성화합물의 흡착제는 Alltech Assoc사의 Charcoal(size 80~100μ)을 사용하였고 DVT의 분리 및 정제에 필요한 시약과 분해생성물의 추출용매는 Merck Co.(W.Germany) GR급을 사용하였다.

잎담배로 부터 DVT의 추출 및 정제

잎담배 시료로 부터 DVT의 추출은 Fig. 1과 같이 추출하였다. 이 방법은 Chang[3]의 방법과 저자들의 앞선 실험방법[17]을 변형한 것이다.

열변성 장치 및 방법

열변성 장치는 Mccamon[13]과 곽[12] 등의 방법에 준하였고 furnace는 shimazu(Japen)제 glass capillary drawing machine GDM-1B에 부착된 자동온도 조절장치 및 Pyrometer가 있는 furnace을 사용하였다.

시료는 재결정시킨 β-form의 DVT 약 100 mg을 석영관의 하단에 넣고 질소가스선과 활성화시킨 charcoal tube(92㎜/4.5㎜)을 2개 반복하여 연결한 후 석영관 내부의 시료가 farnace 중앙에 위치하도록 고정하고 300℃에서 질소를 90㎖/min의 유속으로 통과시키면서 열변성 시킨 후 그 분해생성물을 charcoal tube에 흡착시켰다.

흡착물의 추출은 ethanol:carbondisulfide (1:2, v/v) 혼합용액 10㎖씩 5회 반복하여 추출하였다. 추출된 용액은 질소기류하에서 농축하여 GC, GC/MS 분석시료로 사용하였다.

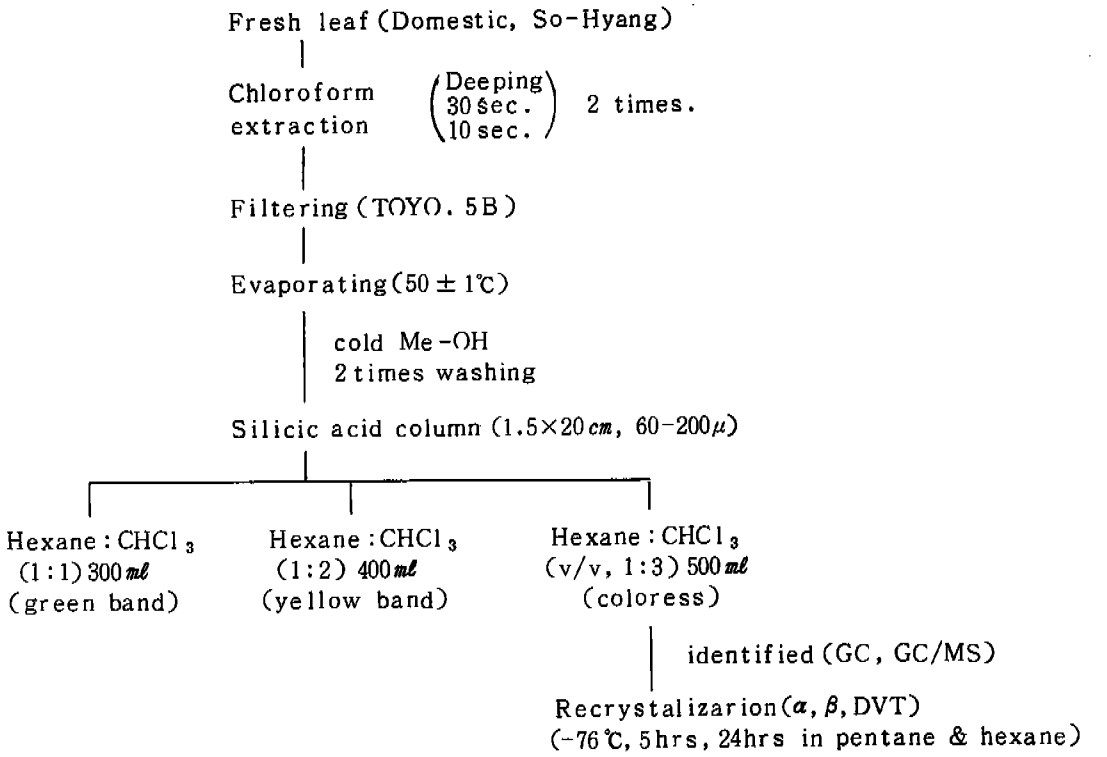

Fig. 1. Isolation scheme of D.V.T. in Nicotiana Tabacum L.

GC 및 GC/MS에 의한 열변성물질의 분리 및 확인

GC는 flame ionization detector가 장비된 HP 5840 A GC와 HP 5840 A GC terminal을 사용하였다. Column은 SE-54 fused silica capillary (50m×0.25mm I.D)을 사용하였고, 분석조건으로 column 온도는 80℃에서 5분간 유지한 후 220℃까지 4℃/min으로 programing 하였다. 운반기체는 0.9ml/min의 유속으로 질소를 사용하였다. 시료주입은 1μl splitless로 주입하였다.

GC/MS는 Varian MAT 212 MS를 사용하였고 GC/MS의 조건은 다음과 같다.

Column은 SE-54 fused silica capillary (50m×0.33mm I.D)을 사용하였고 운반기체인 helium은 1ml/min의 유속으로 조절하였다. Column 온도는 80℃에서 5분간 머문후 240℃까지 4℃/min으로 programing하였다. MS조건으로는 ionsource pressure는 1.8×10^{-5} torr, ionization Voltage는 70eV, emission current는 1mA, ionsource의 온도는 250℃이었다.

결과 및 고찰

Fig. 1과 같은 방법에 의해서 생엽잎담배로 부터 표면지질을 추출하고 silicic acid column을 이용하여 hexane : chloroform (1:3, v/v) 혼합용매로 용출시켜 무색의 용출액을 얻었다. 위 액을 감압농축기로 40℃에서 농축하고, n-butyl-

boronic acid($CH_3(CH_2)_3B(OH)_2$, M.W. 101.94)로 pyridine 용매와 같이 100℃ 에서 20분간 반응시켰다. 반응액을 3% OV-101 packed column(1.2 m × 2 ㎜ I.D.)에서 분리한 GC chromatogram은 Fig.2와 같다.

이 그림에서 알 수 있듯이 α-form과 β-form을 각각 분리할 수 있었으며 이러한 결과는 Chang[3] 과 Gamou[8] 등이 보고한 결과와 일치

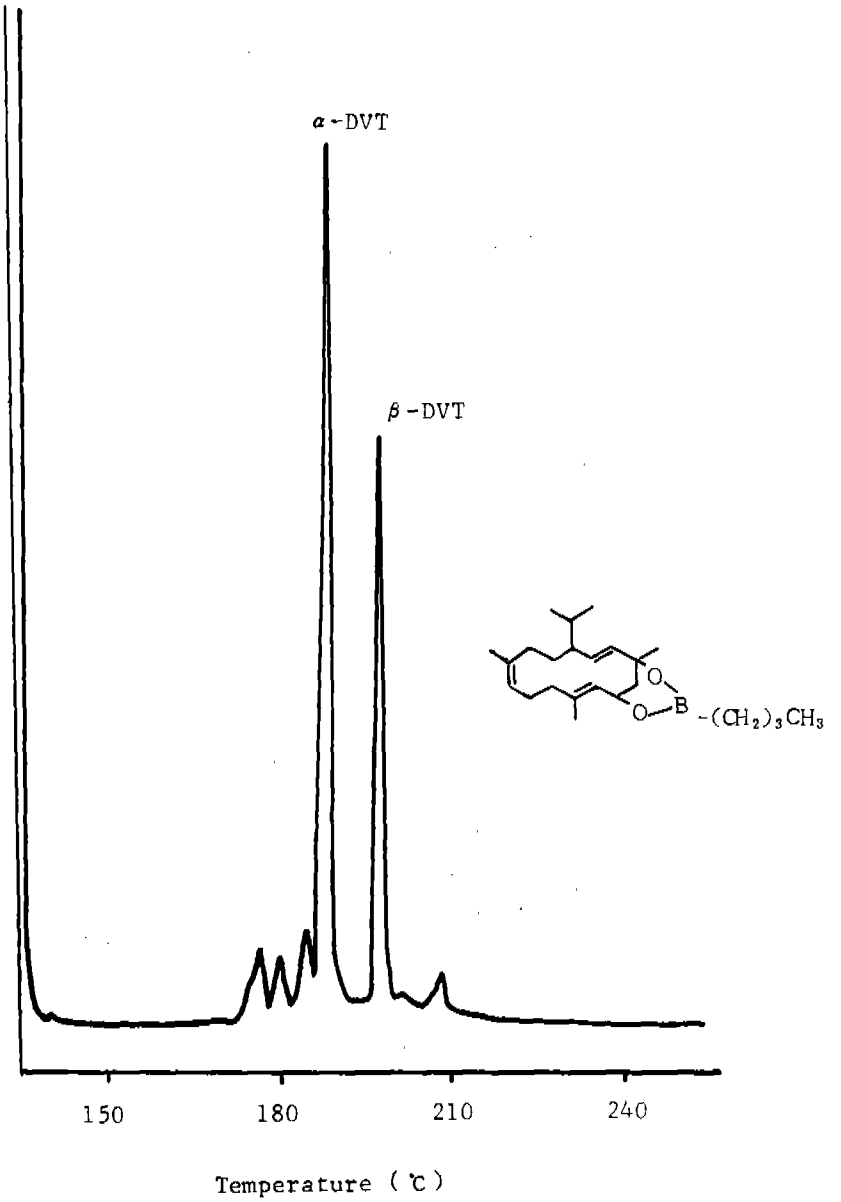

Fig 2. GC Chromatogram of α,β-DVT treated with butyl boronic acid.

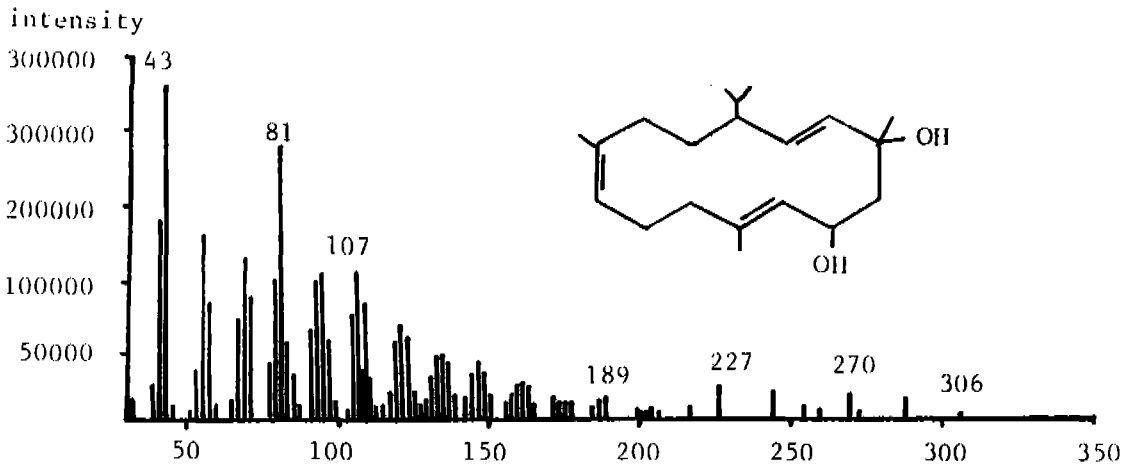

Fig. 3. Mass spectrum of duvatrienediol obtained by direct inlet/MS.

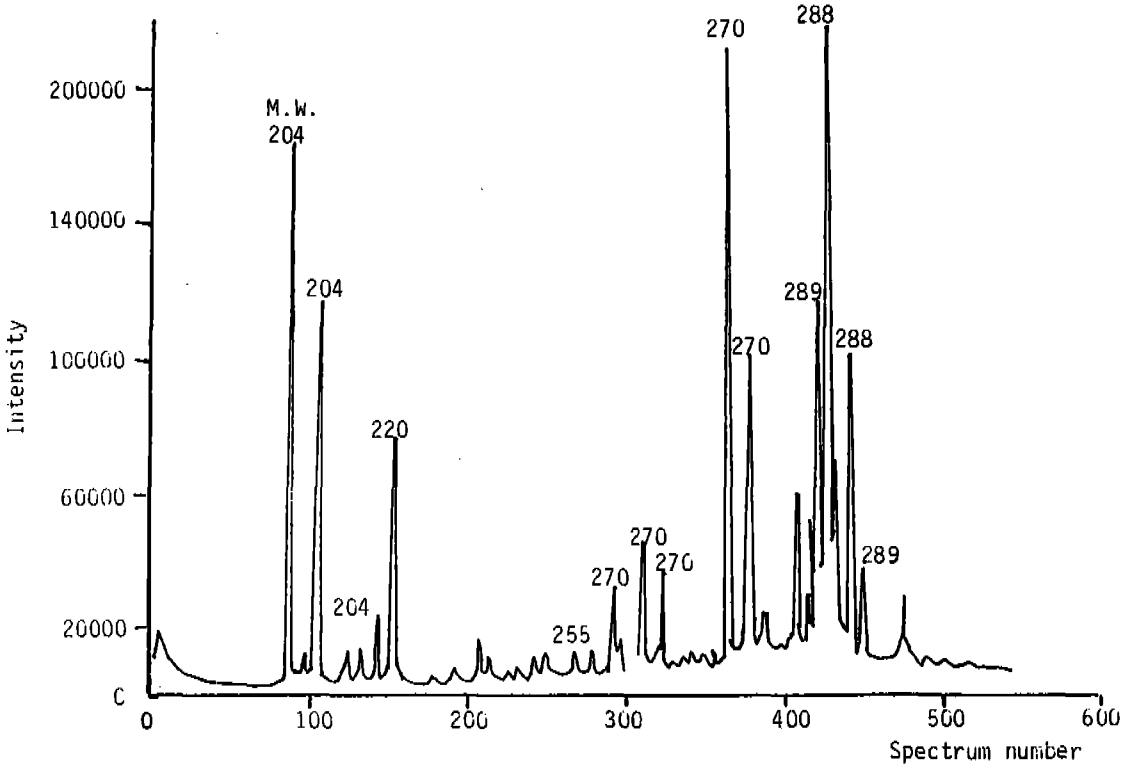

Fig. 4. Total ion current chromatogram for the thermolyzates of 4,8,13-duvatriene-1,3-diol

한다. 따라서 4,8,13-duvatriene 1,3-diol 의 α, β form의 이성체 분리는 저자들이 발표[17]한 SE-54 capillary column을 사용하거나 butylboronic acid로 유도체화한 후 분리하는 것이 바람직한 방법으로 생각된다.

또한 실험에서와 같이 -76℃ Hexane 용매하에서 5시간, 24시간 정치시킨 후 생성된 백색의 결정성화합물을 direct inlet system으로 분석하여 Fig.3과 같은 Mass spectrum을 얻었다. 이 Mass spectrum은 EPA/NIH mass spectral data base 7220-78-2와 fragmentaion pattern이 일치하고 molecular ion이 306으로 정확히 나타났다. 이러한 결과는 Chang[3]이 보고한 mass spectrum 즉 DVT의 molecular ion이 288 ($M-H_2O$, 18)로 보고한 것과는 차이가 있었다.

다음 Fig.4는 재결정된 DVT를 실험에서와 같은 조건에서 열변성시켜 얻은 분해생성물을 ethanol : carbondisulfide 혼합용매로 용출시켜서 얻은 물질의 GC/MS의 total ion current chromatogram이다. 이 그림에서 알 수 있듯이 약 25종의 peak를 분리할 수 있었다.

TIC Chromatogram상의 각 peak에 대한 mass spectrum을 토대로 확인한 결과 M.W. 288 네개의 peak는 미분해된 DVT의 이성체로 보여지며 M.W. 270이 6종, 그리고 M.W. 220이 1종, 204가 3종으로 나타났다. 이 중 각 peak에 대한 mass spectrum fragmentaion pattern과 EPA/NIH spectral data base와 비교하여 확인한 성분을 Table 1에 표시하였다. 12-isopropyl-1,5,9-trimethyl 4,8,13-cyclotetratriene diol (M.W. 270) 과 1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)-tricyclo (4,4)-dec-3 ene (M.W. 204) 및 drim 8-en-7-one (M.W. 220) 이었다. 주요 열변성물질의 mass spectrum을 fig.5에 나타냈다.

이상의 열변성물질의 분자량을 토대로 DVT의 분해과정을 추적해 보면 처음 DVT (M.W. 306) 가 열을 받게되면 H_2O 분자를 잃고 그 다음 ring opening이 일어나서 mono, di dehydration이 일어나는 것으로 해석할 수 있다. 즉 intermolecular elimination reaction과 sixcentered transition state에서 dehydration과 ring-opening이 발생한다고 생각된다.

이러한 결과는 Katz[10]의 연구결과와 분해생성물에서는 서로 다르지만 분해물질의 분자량은 일치하는 결과이다. 또한 Katz[10]의 실험조건인 250℃에서는 분자량이 270미만의 물질은 발견되지 않았으나 본 실험조건에서는 분자량 204를 갖는 물질을 3종 발견할 수 있었다. 이러한

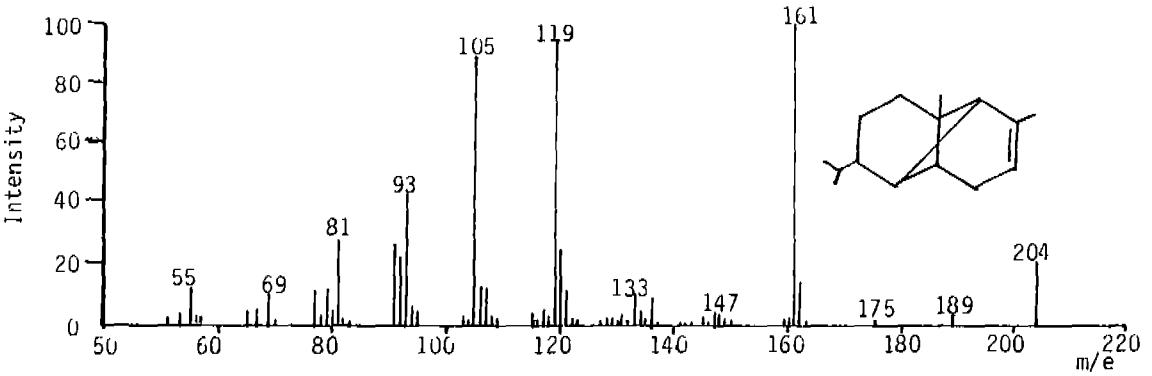

Fig. 5. Mass spectrum of 1,3-dimethyl-8-(1-methylethylethyl)-tricyclo(4.4.0.0)-dec-3-ene (spec #88) (14912-44-8)

Table 1. Identified thermolyzates of α,β-4,8,13-duvatriene-1,3-diols.

Spectrum No.	Thermolyzate	M.W.	Prominent ions (m/e)
88	1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)-tricyclo(4.4.0.0)dec-3-ene	204	161 (M), 119, 105
97	1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octachydro-1,1,4,7-tetramethyl-,(1aR-(1aα,4α,4aβ,7bα)-1H-cycloprop(e)azulene	204	204 (M), 57, 189
106	decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-,(1aR-(1aα,7α,7aα,7bα))-1H-cycloprop(e)azulene	204	69 (M), 93, 79, 133
120	decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-,(4aR-(4aα,7α,8aβ))-naphthalene	204	93 (M)
123	1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-,(1aR-(1aα,7α,7aα,7bα))-1H-cyclopropa(a)-naphthalene	204	91 (M), 105, 161
213	octahydro-1,9,9-trimethyl-4-methylene-,(1α,3a,7,8a)-1H-3a,7-methanozulene	204	95 (M), 55, 121
426	12-isopropyl-1,5,9-trimethyl-4,8,13-cyclotetradecatriene-1,3-diol (M-18)	288	81 (M), 71,107

결과는 열변성온도의 증가로 인한 결과로 보여진다. 따라서 이러한 열변성온도의 증가는 분해생성물의 분자량별로 살펴보면 분자량 255, 220인 물질이 생성되는 일련의 분해반응에 의해서 생성된 것으로 생각된다. 이러한 현상은 dehydration이 일어난 후 순차적으로 $C_4H_2^+$의 탈리, methane의 이탈로 추정할 수 있겠다. 이상의 분해반응을 도시해 보면 Fig.6과 같이 나타낼 수 있다.

이상과 같은 DVT의 열변성화합물의 조성은 Aasen[1], Kaneko[9], Enzell[5] 등이 보고한 DVT의 광산화분해물과 미생물적 분해생성물과는 현격한 차이가 있는 것이다.

또한 본 실험에서 얻은 결과를 미루어 생각하면 Duvatriene 화합물은 smoke taste나 aroma에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 DVT계통의 화합물은 잎담배의 건조, 숙성과정을 거치면서 tobacco like한 물질을 생성하는 중요한 물질로 잘 알려져 있다. 따라서 잎담배중에 함유된 DVT계통의 화합물을 단시간내에 tabacco like한 물질, 즉 isopropyl[6,7] 기를 갖는 화합물로 전환시킬 수 있는 방안이 앞으로 연구되어야 할 것이다.

결 론

생엽잎담배의 표면지질로 부터 Duvatriene diol을 분리하여 재결정한 후 300℃ 질소 기류하에서 열변성 시켰다. 이 때 열변성화합물은 약 20개의 성분을 분리할 수 있었으며, 그 중 9개의 성분을 GC/MS로 확인하였다. 이들은 mono 또는 di dehydration에 의해서 생성되었으며 기존의 광산화분해물의 조성과는 서로 달랐다.

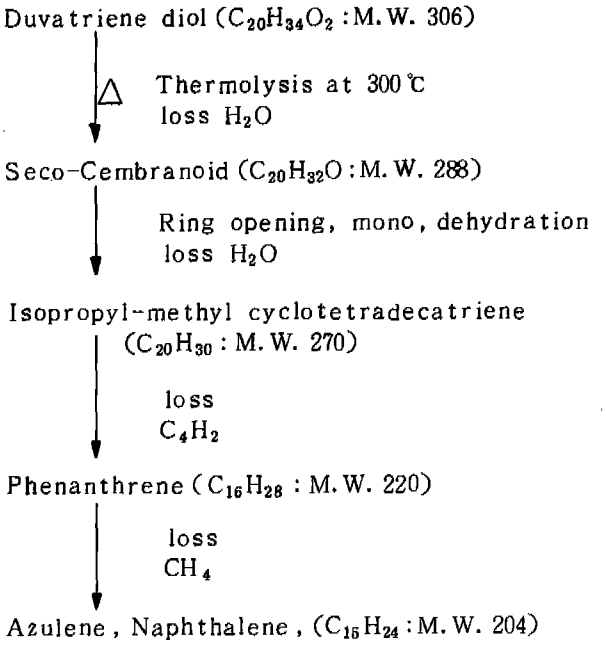

Fig. 6. Proposed thermolytic degradation pathway of D.V.T

References

1. Aasen, A. J. etal, Acta Chemica Scandina vica B 29, 51-55 (1975).
2. Chang, S.Y. etal. Phytochem 15, 961-967 (1976).
3. ibid., J. of Lipid research, 17, 7-11 (1976).
4. Court, W. A., Tob. Sci., 27, 40-43 (1982).
5. Enzell, C.R., Recent advances in Tobacco Science 36th TCRC, 32-60 (1982).
6. Fujimori, T., etal, Beitrage zur Tabakforschung, 9, 317 (1978).
7. ibid etal, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 53, (9), 95-121 (1979).
8. Gamou, K. etal : Agric. Biol. Chem., 43, 2163-2168 (1979).
9. Kaneko, H., Koryo, 128, 23-29 (1980).
10. Katz, T., 36th TCRC Report, (1982).
11. Kawashima, N. etal, Hatabako Kenkyu, 81, 89-91 (1979).
12. Kwag, J. J. etal, J. of the Kor, Soc. Tob. Sci., 6(2), 131-137 (1985).
13. Mccamon, C. S., The NIOSH Charcoal tube and other solid sorbent sampling tube certification program, Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 37, 489 (1976).
14. Netolitzky, F., Die Pflazenhaare, In Linsbauer, K. Handbuch der pflanzenanatoimia, 1-253 (1932).

15. Ogata, Y., 日本 鹿兒島たばこ試報, 25, 1-26 (1983).
16. Reid, W.W., etal, A du Tabac-sect., 2-12-Berac-SEITE, 33-37 (1975)
17. Rhee, M.S., etal, J. of the Kor. Soc. Tob. Sci., 4(1), 67-71 (1982).
18. Roberts, D.L., etal, J. Org. Chem. 27, 3989-3995 (1962).
19. Severson, R.F., etal, Tob. Sci., 27, 82-83 (1982).
20. ibid., etal, Recent advances in Tobacco Science, 39th TCRC, 105-174 (1985).