

잎담배중 Duvatrienediol에 관한 연구

지상운, 안기영, 이문수, 박영수, 정찬선*

Studies of Duvatrienediol in Tobacco Leaf (*Nicotiana tabacum* L.)

S. U. Ji, K. Y. An, M. S. Rhee, Y. S. Park, C. S. Chung*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, *Sangji University

ABSTRACT

It would be clear that the constituents of the leaf surface lipid is very important as an evaluation index of tobacco leaf quality since the quality of tobacco specific aroma with leaf species depends on the contents of the lipid and the strength of the aroma is determined by the amounts of the lipid secreted. For the reason, a rapid and reproducible method to quantify DVT, which is a kind of lipid, has been studied. The biosynthesis procedure of DVT in leaf growing processes, and the volatile or decompositional characters of DVT in leaf drying processes were also discussed. In consequence, it might be possible to get the data available to the cultivation of better tobacco leaf and the manufacture of cigarettes with better aroma and taste. The results obtained from this study are as follows.

1. Chloroform/dichloromethane solvent was better than chloroform alone for DVT extraction. The extraction yields of the leaf surface lipid were about 5%
2. The extractives with dichloromethane were treated by silylation with BSTrA and the quantitative analysis of DVT was carried out using SE-54 fused silica capillary column. It was found that rapid and reproducible data could be obtained from these methods.
3. In flue-cured tobacco species, DVT contents were $30.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the beginning stage of leaf drying processes and $12.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ corresponded to 30% levels of the beginning stage, in the end stage.
4. DVT contents in Burley were 2 times as large as those in fluecured tobacco. DVT in the upper stalk position of leaf was 3 times larger than that in the lower stalk position.
5. DVT of tobacco leaves was decomposed by SO_2 gas or the sun light. The decomposition rate was largest in the sample used methanol as a extraction solvent.

서 론

잎담배의 표면에는 모용(trichomes, leaf hair)과 기공이 있으며 잎담배의 표면세포가 분화되어 생성되는데 장모, 단모로 발달하여 점성이 있는 물질을 분비한다. 이와 같은 현상에 대한 연구는 1932년 Netolitzky¹⁷⁾에 의해서 처음으로 시도되었는데 그는 trichomes의 기원, 구조, 분류, 생리생태 등에 관하여 보고한 바 있다. 특히 1944년 Wolf와 Jones²⁸⁾는 모용에서 분비하는 물질이 담배향과 상란성이 매우 크다는 것을 처음으로 밝혔다. 1950년 Garner³⁰⁾는 담배향의 강도는 모용 분비물의 차이로 정의되며 분비물의 양에 지배를 받는다고 하였다. 1945년 Bentley와 Wolf¹⁾는 담배잎에서 모용의 형태적 구조를 연구하고 착엽밀도와 착엽위치, 품종간의 차이, 시비, 기타 재배조건에 따른 모용의 변동에 대하여 보고하였다. Wolf는 모용밀도의 유전적 관계를 고찰하고 담배향이 강한 품종을 육성하는등 실용적인 분야에 발전을 이룩하였다. 1955년 일본의 Masao Tanaka¹⁵⁾는 trichomes의 선단에서 분비되는 물질의 양을 현미경적으로 관찰한 바 있다. 이러한 관점에서 몇몇 연초학자^{3, 28, 30)}에 의하여 trichomes의 선단에서의 분비물을 연구하던중 1962년 Roberts와 Rowland¹⁹⁾가 macrocyclic diterpene 계통의 화합물인 DVT를 처음 분리하게 되었다. 지금까지 알려진 바에 의하면 trichomes을 구성하는 물질은 alkane계열의 labdanoids와 thunberganoids로서 cembrene 형태의 diterpenoid 화합물인 α, β -4, 8, 13-duvatriendiol과 fatty acid 등이다. 그후 Reid²⁰⁾등은 각종 식물에 대하여 DVT 화합물을 검색한 결과 *Nicotiana sylvestris*와 *Nicotiana tabacum*에 많이 존재함을 확인하였다.

또한 잎담배중 DVT 함량의 정량적 개념은 1976년 미국 Kentucky 대학의 Chang과 Grunwald^{2, 3)}에 의해 처음으로 이루어졌다. 1974년에 일본의 중앙전매기술연구소의 Gamou와 Kawashima^{9, 11)}가 잎담배의 재배조건, 착엽위치, 건조과정에 따른 DVT 함량변화는 황색종 잎담배의 건조초기에서 부터 건조 말기까지 DVT 감소는 60-75%이며 동시에 잎담배 표면지질 함량은 약 35%라고 보고하였다. Court⁴⁾는 좀 더 진보된 분석 방법으로 황색종중의 DVT를 정량하기에 이르렀다.

Severoson^{23, 24, 25, 26)}에 이해서는 DVT 함량과 해충에 대한 저항력의 관계가 연구되었고 분리 방법에 대한 연구결과 cuticular diterpenes에는 α 와 β -DVT외에 abienol, labdanoid 성분이 상당량 존재함을 밝혔다. DVT 함량과 잎담배 품질과의 관계를 구체적으로 표현한 보고로는 Kawashima¹⁴⁾의 연구를 들 수 있으며, 미 농무성은 황색종 잎담배의 생물학적 특성에 대하여 그리고 연기의 구성성분, 잎담배의 특성등 종합적인 상관관계를 연구 보고²⁷⁾ 하였으며 생엽 잎담배로부터 DVT를 분리하여 DVT의 열에 의한 변화를 확인한 바²²⁾ 있다.

국내에서도 재래종 잎담배의 소향의 생엽에서 DVT가 분리 확인²¹⁾ 된 바 있다. 잎담배에서 DVT에 관련된 주요 연구 분야중의 하나는 생합성된 DVT가 각종 biodegradation mechanism에 의해 변화되어 isoprenoids 골격을 갖는 화합물로 전환된다는 것이다^{7, 8)}, 또한 DVT는 알칼리성에서는 상당히 안정하지만 묽은 황산용액에서는 대단히 불안정하여 많은 분해 생성물이 발생하는데 thio 화합물을 상당량 포함하고 있다¹⁸⁾.

1982년에는 Katz¹³⁾가 DVT를 250°C로 가열하여

4종의 분해 생성물을 동정하였으며 Enzell⁷⁾ 그리고 Gamou⁸⁾은 엽면지질중 향각미에 관여하는 것은 terpenes 또는 그와 유사화합물이라고 명시하였고 잎담배 건조과정중에 DVT 화합물의 변화과정에 대해서도 연구되었다^{5, 6, 10)}. 따라서 본 연구에서는 모용에서 분리하는 성분을 재현성이 있고 신속 분석하는 방법을 연구함으로써 잎담배 생육과정중의 DVT의 생합성 과정 그리고 건조중 DVT의 휘발 및 분해현상을 밝혀 더 좋은 잎담배를 생육하고 각미가 풍부한 제품담배를 제조하는데 유익한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 담배시료

담배시료는 1991년도에 한국인삼연초연구소 수원경작시험장과 대구시험장에서 재배한 것으

로 황색종은 NC82와 KF109를 그리고 버어리종은 Br. 21을 사용하였다.

2) 시 약

DVT 분획에는 silica gel(size 70-230 μ , Germany)을 사용하였고, DVT의 추출, 분리 및 정제에는 특급의 용매를 사용하였다. 그 밖에 사용한 시약은 일반적으로 실험실에서 취급하는 것들이다.

3) 기 기

◦ Gas chromatography는 Hewlett packed 5890II GC와 Hewlett packed 3396II GC terminal을 사용하고 detector는 flame ionization detector (FID)을 사용하였다.

◦ Gas chromatography/Mass spectrometer는 Hewlett packed 5890II GC가 장비된 5970 mass selective detector System을 사용하였다.

◦ 녹는점 측정기는 Fisher-Johns(model 4308 U.S.A) melting 측정기를 사용하였다.

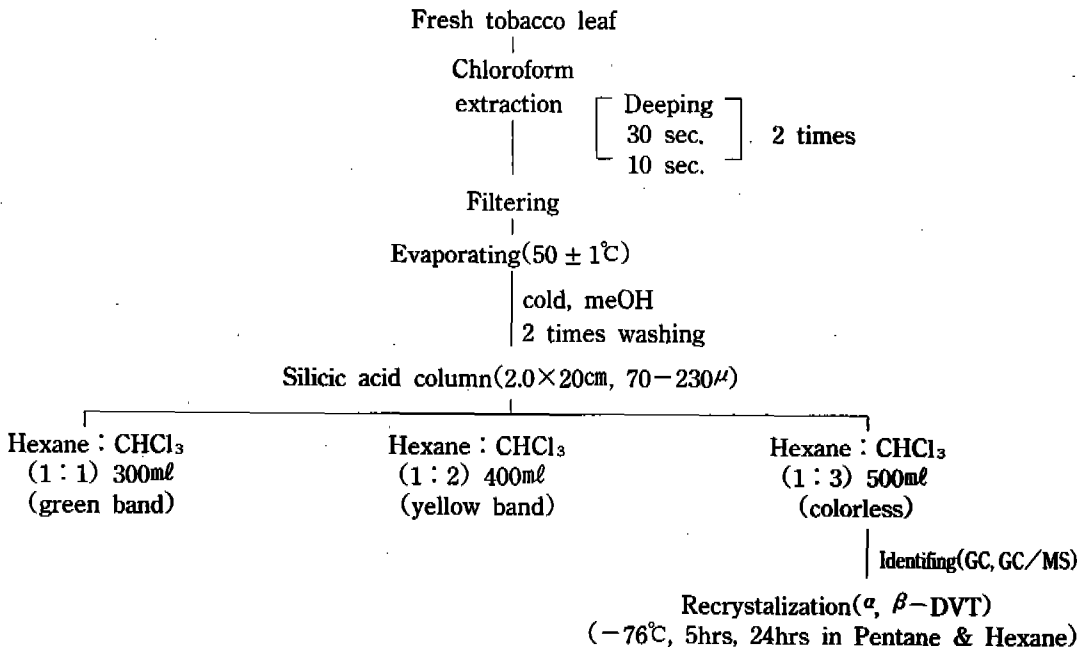


Fig. 1. Isolation scheme of DVT from *Nicotiana Tabacum* L.

2. 방 법

1) 잎담배로 부터 DVT의 추출 및 정제

잎담배 시료로 부터 DVT의 추출은 그림 1과 같이 추출하였다. 이 방법은 Chang²⁾의 방법과 저자들의 앞선 실험방법으로 부터 변형한 것이다.

2) 황색종 잎담배의 건조과정별 DVT 함량조사
황색종 잎담배의 건조과정에 따른 DVT 함량 변화를 조사하기 위하여 일반적인 건조과정인 생엽, 황변중기, 황변말기, 섶중기, 전엽 등 5 단계로 나누어 각각 5매씩 시료를 채취하였다. 채취한 잎담배 시료는 잎 선단부로 부터 15-18cm 범위에서 중꼴을 중심으로 좌우로 잎의 면적이 3.14cm² 되게 원형의 punch로 절단하여 DVT 추출시료로 사용하였다. 추출방법은 마개달린 20ml 시험관에 위에서 채취한 disk 시료 10매를 넣은 후 dichloromethane 10ml을 가하여 추출하고 여과한 후 잔사를 분리하여 dichloromethane 10ml로 재추출 하고, 내부 표준물질로 docosanol(C₂₂H₄₄O. M.W. 326.6) 0.2mg을 가하였다. 추출액을 감압 농축하고 pyridine 1ml, BSTFA[N, O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] 200μl을 가한 후 70°C 수욕상에서 30분간 반응시켜 silylation 하여 GC 분석시료로 사용하였다.

이때의 분석조건은 다음과 같다. Column은 SE-54 fused silica capillary(30m×0.32mm I. D.)이며, column 온도는 80°C에서 10분간 유진한 후 280°C까지 5°C/min으로 programming 하였다. 운반기체는 0.9ml/min의 유속으로 질소를 사용하였으며, 시료는 1μl를 splitless로 주입하였다.

3) 잎담배의 착엽위치별 DVT 함량조사

황색종 잎담배의 품종, 착엽위별에 따른 DVT 함량을 조사하기 위하여 NC82, KF109의 2 품종을 그리고 버어리종은 Br. 21 품종을 선택하여 지

상부에서 5-8번 사이의 잎을 하위엽, 9-13번 잎을 중위엽, 14-18번 잎을 상위엽으로 각각 취하고 실험 2)의 방법으로 추출하여 GC 분석용 시료로 하였다.

4) DVT 분해 생성물의 GC profile

실험 1)에서 분리한 DVT에 대하여 SO₂와 햇빛에 의한 각각의 변화를 조사하였다.

가) SO₂에 의한 DVT의 변화

앞에서 정제한 DVT를 약 10mg을 정확히 취하여 클로로포름 1ml에 용해한 다음 그림 2와 같이 충전한 silica gel(wako gel C-200) 3g에 흡착시켰다. DVT가 흡착된 유리관에 SO₂ gas을 10분, 30분동안 각각 통과시킨 후 silical gel이 완전히 잠기도록 5% 메틸알코올/클로로포름 용액을 가하고 초음파 추출기로 30분간 추출한 다음 농축하여 GC 분석용 시료로 사용하였다.

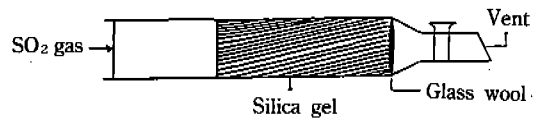


Fig. 2. Apparatus of DVT degradation tube.

나) 햇빛에 의한 DVT의 변화

앞에서 정제한 DVT를 0.2mg씩 4개의 3ml 유리관에 취하고 극성을 다른 용매를 3ml씩 각각 가하여 햇빛에 노출시켰다. 노출시간은 8시간, 16시간, 24시간으로 하였으며 햇빛에 노출시켰을 때 대기온도는 20~50°C였다. 이때의 분석조건은 실험 4와 같다.

결과 및 고찰

1. DVT 분리 및 정제

그림 1에서와 같이 클로로포름으로 30초간

추출한 다음 표면지질은 클로로필의 영향으로 녹색을 띠고 있었으며 약 5% 정도의 농축물을 얻을 수 있었다. 크로로포름 추출액을 silicic acid 컬럼에 흡착시키고 hexan:클로로포름 용매를 가했을 때 컬럼의 상부로부터 green band와 yellow band가 나타났다. 극성을 증가시킨 hexan:클로로포름(1:3, v/v) 용매의 용출액을 농축했을 때 무색의 점성물질이 생겼으며 더 농축한 다음 hexan을 가하고 -76°C에서 5시간 동안 정치시켜 무색의 결정생성물을 얻었다. 이 결정 생성물에 대하여 분석한 chromatogram은 3% OV-101 packed column을 사용한 결과인데 α -, β -form의 DVT, 즉 두 이성질체가 분리되지 않고 있음을 알 수 있었고 주 peak area를 제외하면 DVT의 area는 약 95%에 달한다(그림 3).

DVT를 확인하기 위하여 GC/MS를 mass spectrum을 얻고 그 결과를 그림 4에 나타냈다. 이 mass spectrum을 보면 EPA/NIH mass spectral data base No. 7220-78-2와 fragmentation pattern이 일치하고 있다. 그러나 그림 4의 mass spectrum에는 DVT의 분자량인 306을 나타내는 peak가 보이지 않는다. 즉, DVT는 한 분자의 H₂O를 잃은 상태인 288m/e(M-H₂O, 18)의 peak를 보여주고 있는데 이는 Chung²⁾의 보고와 일

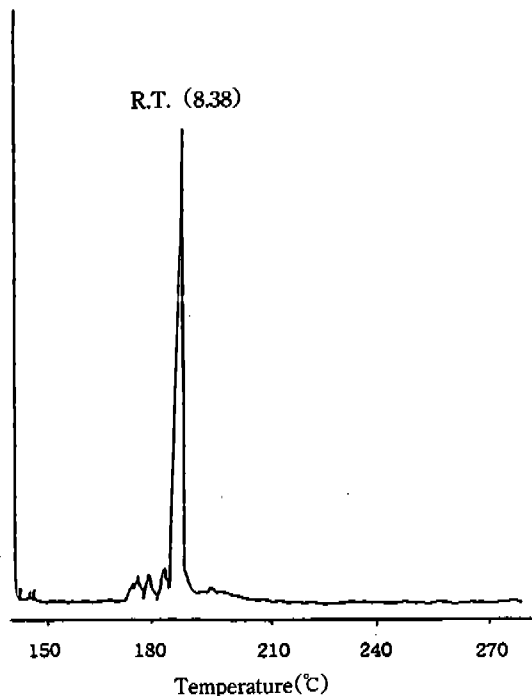


Fig. 3. GC chromatogram of 4, 8, 13- duvatriene-1, 3-diol.

치하는 결과로써 DVT가 GC 분석중 고온에서 물한 분자가 떨어져 나간 것으로 판단된다.

2. 황색증 잎담배의 건조과정별 DVT 함량변화
적숙기에 들어간 NC82 시료를 bulk 건조한 DVT 함량변화는 그림 5에서 보는 바와 같이 내부 표준물질인 n-docosanol을 포함하여 5개의 주요

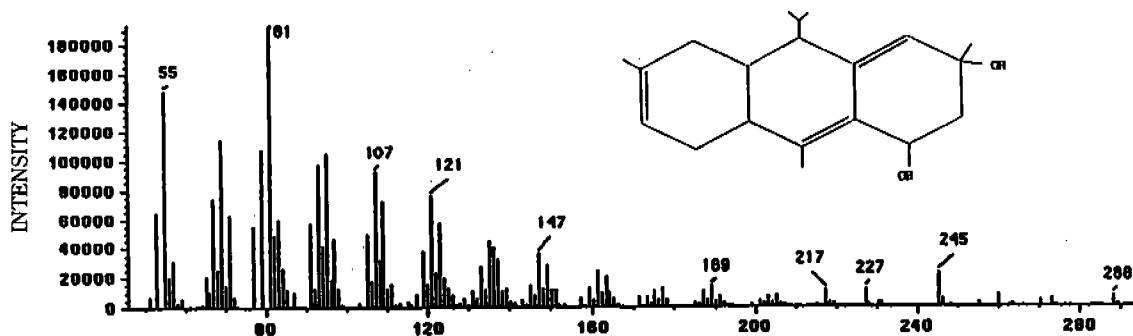


Fig. 4. Mass spectrum of 4, 8, 13- duvatriene-1, 3-diol.

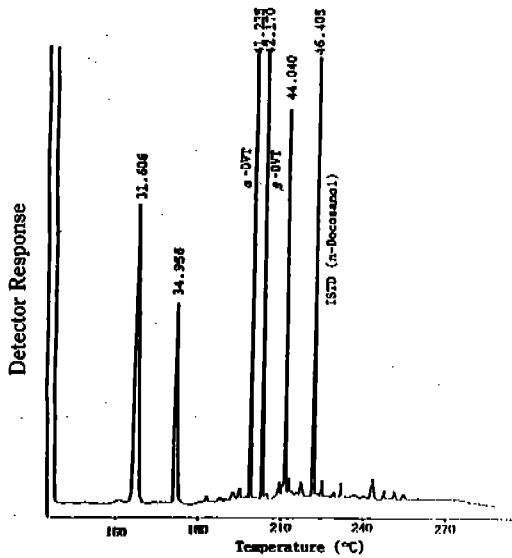


Fig. 5. Capillary gas chromatogram of the silylated leaf surface lipid.

peak을 보여 주며 이들 peak로부터 α -form과 β -form의 DVT을 확인하기 위하여 MS로 분석한 결과 Rt, 41.2와 Rt. 42.2의 peak가 각각 α -form과 β -form인 것을 알 수 있다.

이 분석조건에서 잎담배의 표면 지질성분은 디클로로메탄으로 추출하여 BSTFA로 유도체화 하면 SE-54 컬럼으로 α , β -form을 간단히 분리할 수 있으며 분리능도 매우 우수하였다. 내부 표준물질로 사용한 n-docosanol도 그 분리양상이 매우 우수하였다. 양적인 면에서는 α -form의 DVT가 β -form보다 많은 것으로 나타났다. 이는 Nielsen과 Severson¹⁶⁾의 연구결과와 일치하였다 위와 같은 실험조건으로 분석한 결과 황색종 잎담배 건조과정별 DVT이 함량변화를 도시하였다(그림 6).

그림 6에서 보는 바와 같이 α , β -form의 DVT가 건조초기에서 건조말기까지의 과정중 초기 농도보다 약 70%이상 감소한 것을 알 수

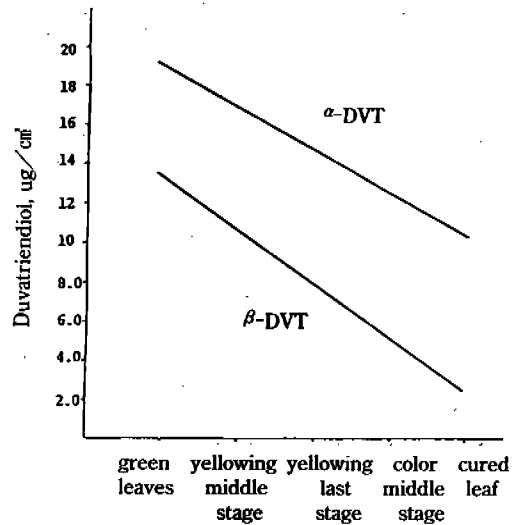


Fig. 6. Varieties of DVT contents in flue-cured tobacco during curing process.

있다. 특히 색택 중기부터 큰 변화폭으로 감소하는데 이것은 건조실내의 온도상승으로 수분이 제거되는 등 DVT의 분해가 촉진된 것으로 생각된다. 이러한 현상은 건조조건에 따른 당연한 결과로 여겨지지만 잎담배의 품질면에서 보면 DVT의 분해는 매우 바람직스럽지 못한 현상이다. Gamou와 Kawashima^{9, 11)}의 연구보고에서는 황색종 잎담배의 건조 초기에서부터 건조말기에 DVT 감소는 60-75%이며 동시에 잎담배 표면 지질함량은 35%이다. 또 중위엽과 상위엽 모두 비슷한 양상으로 건조가 진행됨에 DVT가 감소하는 것을 볼 수 있다. 이러한 감소현상은 DVT 자체의 분해 때문인데 향각미에 크게 영향을 주는 분해성분 즉 tobacco like한 성분으로의 변화가 촉진된다면 양질의 잎담배 생산에 크게 기여하리라 생각된다.

3. 잎담배의 품종별, 착엽위치별 DVT 함량

잎담배의 품종별, 그리고 착엽위치별 DVT 함량에 대하여 분석한 결과를 표1에서 보는 바와

Table 1. Duvatrienediol levels of the leaf with stalk positions

Stalk position Varieties	Upper		Middle		Lower	
	α -DVT	β -DVT	α -DVT	β -DVT	α -DVT	β -DVT
NC 82	84.96	32.71	59.08	22.93	58.78	22.21
KF 109	94.15	36.53	70.02	27.79	69.14	27.16
Br. 21	172.98	71.65	163.19	67.72	81.69	14.70

($\mu\text{g/g}$)

같이 품종의 엽분에 따라 큰 차이가 없었다. 품종별로는 Br.21의 α , β -DVT가 황색종의 NC82, 그리고 KF 109보다 약 2배정도 높다. 따라서 DVT의 전체 함량은 버어리종이 황색종보다 높은 것을 알 수 있다. 작엽위치별 DVT는 상위엽이 하위엽보다 약 3배 정도 높은 수준이며, 특히 Br. 21에서는 약 10배 정도의 높은 차이를 보였으며 이는 하위엽에서는 모용이 환경조건에 따라 이미 분해되었거나 우기에 씻겨 내려간 탓으로 사료되며 Gamou⁹⁾의 보고와 일치하였다.

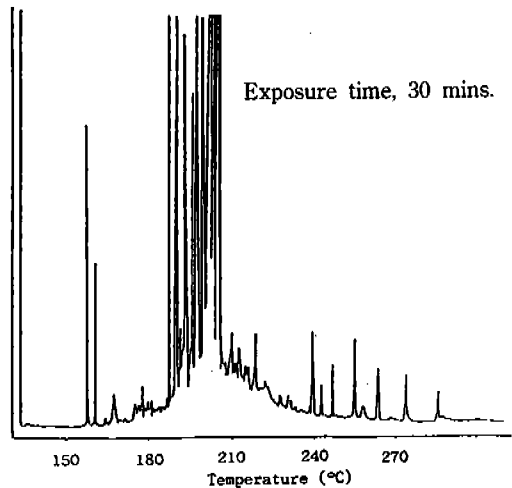
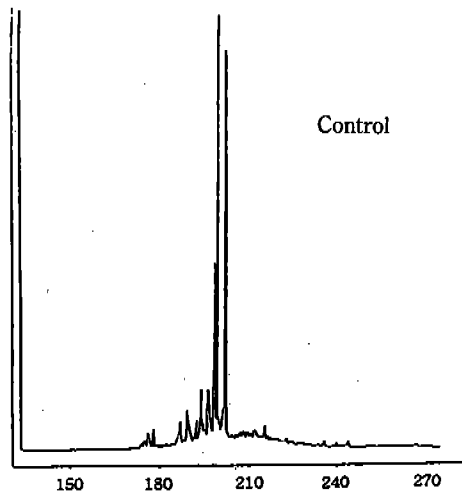


Fig. 7. GC profiles of DVT degradation products by SO_2 gas.

4. DVT 분해 생성물의 GC profile

가. DVT의 SO_2 에 의한 변화

그림 2와같이 유리관에 SO_2 기체를 통과시킨 후 DVT 분해 생성물에 대하여 GC로 분석하고 chromatograms을 얻었다. 그림 7은 SO_2 기체를 30분 동안 노출시킨 결과인데 peak로 보아 DVT의 분해로 20여종의 화합물이 생성되었음을 발견할 수 있다. 이러한 점으로 미루어 볼 때 담배의 재배과정중 DVT의 성분변화는 향후 대기오염의 정도를 예견할 수 있는 척도로서 주요 연구대상이 될 수 있을 것으로 생각된다.

나. 햇빛에 의한 DVT의 변화

앞의 실험에서 언급한 바와 같이 정제된 DVT

에 극성을 다른 용매, 즉 햇빛에 노출된 시간에 따라 각 시료를 GC로 분석하고 메틸 알코올의 24시간 노출 시료에 대하여 그림 8에 보였다. 이때의 GC 조건은 실험 4와 같다. 이 chroma-

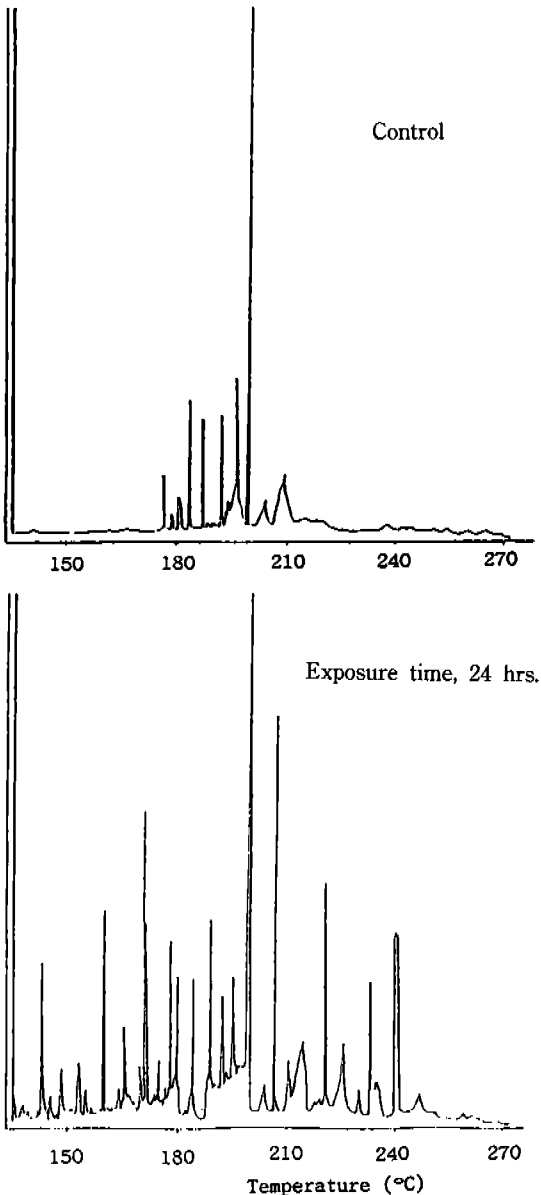


Fig. 8. GC profiles of DVT degradation products by sun light with methanol

togram은 DVT의 분해로 분자량이 적은, 즉 휘발성이 큰 화합물이 생성되었음을 보여준다. 이들 분해 생성물은 흡연시 향기와 짝미에 크게 관여하리라고 생각된다. 메타놀 용매를 사용할 때는 DVT의 분해가 매우 빨랐는데 ethyl ether의 경우 자연광에 의하여 DVT의 분해가 매우 느려 10 일간의 노출 후에도 큰 변화를 발견할 수 없었다. 이 결과 DVT는 비극성 용매보다는 극성용매에서 자연광에 의해서 쉽게 변성된다는 것을 알 수 있었다.

결 론

담배의 종류에 따른 향기의 질적차이는 엽면 지질의 조성에 따라, 향의 강도는 분비량의 많고 적음에 따라 좌우되기 때문에 엽면지질 성분은 담배제품의 품질요소로서 중요시되고 있다. 따라서 본 연구에서는 지질의 일종인 DVT 성분을 재현성이 있고 신속하게 분석하는 방법을 연구 함으로서 잎담배 생육과정중 DVT의 생합성과정 그리고 건조중 DVT의 휘발 및 분해현상을 밝혀 더 좋은 잎담배를 생육하고 짝미가 풍부한 제품담배를 제조하는데 유의한 자료를 얻고자 한 것이며 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) DVT의 추출용매로는 chloroform을 단독처리 할 때보다 chloroform과 dichloromethane의 두 용매를 사용한 때 더 양호하였고, leaf surface lipid의 추출 yield 5% 정도이었다.

2) DVT 정량은 dichloromethane 추출물을 BSTFA로 silylation한 후 SE-54 fused silica capillary column을 사용하면 신속하고도 재현성이 높은 분석값을 얻을 수 있었다.

3) 황색종의 DVT 함량은 건조초기에 32.3 μ g

/cm²였으나 건조말기에는 12.1^μg/cm²으로 약 30% 정도가 감소하였다.

4) 버어리종의 DVT 함량은 황색종보다 약 2배 높았고, 착엽 위치별 DVT는 버어리종의 상위엽이 하위엽보다 약 3배 높았다.

5) DVT는 SO₂ 기체나 햇빛에 의해 분해되었으며 메틸 알코올 사용할 때 DVT의 분해속도가 가장 컸다.

참고문헌

1. Bentley, N.J. and F.A. Wolf, Bull. Torrey Bot. Club, 72(4) : 345-360(1945).
2. Chang, S.Y. and C. Grunwald, J. of Lipid Research, 17 : 7-11(1976).
3. Chang, S.Y. and C. Grunwald, phytochem. 15 : 961-963(1976).
4. Court, W.A., diols of flue-cured tobacco, Tob. Sci. 24 : 40-43(1982).
5. Danehower, D.A., Tob. Sci. 31 : 32-35(1987).
6. Danehower, D.A., Sci. 31 : 48-51(1987).
7. Enzell, C.R., Recent Advances in Tob. Sci. 36 : 32-60(1982).
8. Fujimori, T. and H. Kaneko, Beitr. Tabakforsch. 9 : 317-325(1978).
9. Gamou, K. and N. Kawashima, Agric. Biol. Chem. 43(10) : 2163-2168(1979).
10. Garner, W.W., The production of tobacco(1950).
11. Gamou, K. and N. Kawashima, Agric. Biol. Chem, 43(9) : 2119-2124(1980).
12. Gamou, K., Utsunomiya Tab., Shikenfo Hokoku, 17 : 79-84(1979).
13. Katz, 36th TCRC Report(1982).
14. Kawashima, N., Agric. Biol. Chem. 43 : 2163-2165(1979).
15. Masao, T., Special bulletin : 6(1955).
16. Nielsen, M.T. and R.F. Severson, J. Agric. Food Chem. 38 : 467-471(1990).
17. Netrolitzky, F., "Handbuch der pflanzena-tioinia", 1-253(1932).
18. Ogata, Y., J. Kagosima Tob. Sci. 25 : 141-146(1983).
19. Roberts, L.D., and R.L. Rowland, J. Org. Chem. 27 : 3989-3995(1962).
20. Reid, W.W., and R.A. Russel, Tabac-sect. 2-12-Bergerac S.E.I.T.A. 33-37(1975).
21. Rhee, M.S., L.U. Chul, Park, J.W., J. Kor. Soc. Tob. Sci. 4(1)67-71(1982).
22. Rhee, M.S., U.C. Lee and J.J. Kwag, J. Kor. Soc. Tob. Sci. 9(2) : 77-85(1987).
23. Severson, R.F., Tob. Sci. 27 : 82-83(1983).
24. Severson, R.F., Tob. Sci. 32 : 99-103(1988).
25. Severson, R.F., Recent Advances in Tob. Sci. 39 : 105-174(1985).
26. Severson, R.F., 11th CORESTA Report, 42-54(1990).
27. United States Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1551(1977).
28. Wolf, F.A. and E.F. Jone, Bull. Torrey Bot. Club, 71 : 512-528(1944).
29. Weybrew, J.A. and R.C. Long, Amer. J. Bot. 65(3) : 282-292(1978).
30. Weybrew, J.A. and M.K. Chakraborty, Tob. Sci. 7 : 122-127(1963).