

## 잎담배 Alkaloid 분석에 관한 연구

장기철, 한상빈, 김용욱, 이운철

한국인삼연초연구소 분석센터

## Studies on the Analysis of Tobacco Leaf Alkaloids

G. C. Jang, S. B. Han, Y. O. Kim and U. C. Lee

Chemical Analysis Center, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

### ABSTRACT

This study was carried out to develop the method of alkaloids analysis and investigate the kinds and contents of alkaloids in flue-cured, burley and oriental tobacco leaves using developed analytical method.

The developed analytical method of alkaloids was as followed : Tobacco sample was treated with acid(pH 2~3) and extracted with chloroform to remove chemical components except alkaloids. Sample solution was treated with alkali(pH 12~13) and was extracted with chloroform to obtain alkaloids from sample solution. After extraction of alkaloids from tobacco leaves, alkaloids were separated and identified by GC, GC/MS using SE-54 fused silica capillary column.

Nicotine, nornicotine, myosmine,  $\beta$ -nicotyline, anabasine, anatabine, 2, 3-bipyridyl, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine and formyl anatabine were isolated and identified from the extracts of tobacco leaves.

The contents of alkaloids were burley > flue-cured > oriental tobacco leaves, but oriental tobacco leaves were higher nornicotine, cotinine, formyl nornicotine and acetyl nornicotine contents than those of flue-cured tobacco leaves.

The burley tobacco harvested in Korea was higher nornicotine contents by 2~6 times in the portions of cutter, leaf and tips position than that of burley tobacco(B<sub>3</sub>F) harvested in U. S. A.

### 서 론

담배 알칼로이드는 담배 특징을 나타내는 가장

중요한 성분으로 담배 맛에 큰 영향을 미친다<sup>1)</sup>.  
담배 알칼로이드 중 가장 함량이 높은 니코틴은  
대부분 뿌리에서 합성되나, 니코틴을 제외한 알

칼로이드는 줄기, 잎 등의 지상부에서 합성된다<sup>2)</sup>. 담배 알칼로이드의 유전자상은 총 알칼로이드 함량을 결정하는 유전자군과 니코틴을 노르니코틴으로 전환하는데 관여하는 유전자군에 의해 지배되며<sup>3)</sup>, 알칼로이드 함량은 품종, 재배환경, 재배조건 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다<sup>2,4)</sup>. 담배 알칼로이드 중 함량이 가장 높은 니코틴은 깃연시 자극성을 나타내며 연기의 pH에 따라 감지 정도가 달라져 니코틴 단독으로 연기의 향 특성을 지배하지 않는 것으로 알려져 있다<sup>2,4)</sup>.

지금까지 잎담배에서 밝혀진 알칼로이드 화합물은 니코틴, 노르니코틴, anabasin이 95% 이상을 차지하며 그 이외에 myosmine, anatabine, 노르티코틴계열화합물, anatabine계열화합물 등이 미량으로 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>5-11)</sup>.

잎담배중 알칼로이드 분석 방법은 Loise 등<sup>12)</sup>은 알칼리로, Lyerly 등<sup>13)</sup>은 산, 알칼리로 추출하여 용매로 이행시켜 기체 크로마토그래프를 사용하여 분석하는 방법이 알려져 있다. 또한 Matsushima 등<sup>14)</sup>은 적은양의 시료를 용매로 추출하여 NP-FID같은 질소화합물을 선택적으로 검출하는 검출기를 사용하여 분석하는 방법 등이 알려져 있다. 그러나 우리나라의 경우는 전 알칼로이드, 니코틴은 많이 분석되어 있으나, 그외의 나머지 알칼로이드 분석 방법에 대한 연구는 미미한 성질이다.

그러므로 본 연구에서는 메틸 알코올-속슬레 추출장치 및 산 알칼리 처리에 의해 잎담배중 니코틴, 노르니코틴, anabasin 이외에 미량으로 존재하는 알칼로이드 성분을 분리확인할 수 있는 분석방법으로 검토하고, 몇가지 품종 잎담배의 알칼로이드 함량을 조사하였다. 또한 추출방법은 재현성이 좋고 간편하게 분석하기 위한 방법을 찾기 위해 적은 양의 시료를 산, 알칼리 처리 및 알칼리 처리의 두가지 추출방법을 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 잎담배 시료와 알칼로이드의 추출 및 분리

잎담배 시료는 국내 업체에 많이 사용되는 한국산

황색종, 버얼리종은 후엽 3등을, 미국산 황색종, 버얼리종은 B<sub>3</sub>F를, 오리엔트종은 이즈미리, 바스마를 각각 취하여 담배성분분석법<sup>15)</sup>에 따라 시료를 조제하였다.

알칼로이드의 추출은 시료 20g을 속슬레 추출장치에 넣고 메틸알코올 150ml를 가해 16시간 동안 추출하였다. 메틸알코올 추출물을 여과하여 감압농축기(50°C, 10torr)로 농축한 후 2N 염산용액을 가해 pH를 2~3으로 조정된 다음, 클로로포름 100ml를 가해 3회 추출하여 알칼로이드 이외의 성분을 제거하였다. 다시 물층을 5N 수산화나트륨 용액을 가해 pH를 12~13으로 조절하고, 내부 표준물질로 0.01% dodecane 클로로포름 용액 10ml를 가하고, 클로로포름으로 알칼로이드를 추출하였다. 클로로포름층을 감압농축기로 완전 농축시키고, 농축된 시료에 클로로포름을 가해 10ml능금 플라스크에 표선까지 채운후 GC 및 GC/MS분석용 시료로 사용하였다.

### 2. GC 및 GC/MS에 의한 알칼로이드의 분리 및 확인

알칼로이드의 분리는 HP 5890A GC를 사용하였으며 분리관은 SE-54 fused silica capillary column (30m × 0.25mm ID), 운반기체인 질소의 유속은 1 ml/min, 주입구 및 검출기(FID) 온도는 각각 250°C, 분리관 온도는 130°C에서 5분간 유지하고, 5°C/min로 250°C까지 상승시키고, 250°C에서 60분간 유지하는 조건으로 시료 3 $\mu$ l를 split mode로 주입하였다. GC/MS에 의한 알칼로이드의 분리 및 확인은 Varian MAT 212 system 및 SS MAT 188 data system을 사용하였으며, GC/MS 조건은 ion source로 EI 70eV, ion source 압력은 1.3 × 10<sup>-5</sup> torr, ion source 온도는 220°C이었다.

### 3. 추출방법의 비교

#### 1) 알칼리 처리

담배시료 2g에 물 15ml, 10% 수산화나트륨 용액 10ml, 내부 표준물질로 0.01% dodecane 클로로포름 용액 2ml를 넣고, 클로로포름 50ml를 가하여 10분간 진탕한다. 진탕액을 분액 깔때기에

옮기고 클로로포름층 25ml를 분취하여 감압농축기로 완전 농축하고 농축된 시료에 클로로포름 1ml를 가하여 GC 및 GC/MS분석용 시료로 사용하였다.

2) 산, 알칼리 처리

담배시료 2g에 물 25ml를 가하고 2N 염산용액으로 pH를 2~3으로 조정한다 다음 클로로포름 100ml를 가해 3회 추출하여 알칼로이드 이외의 성분을 제거하였다. 물층을 정확히 절반을 취하여 5N 수산화나트륨 용액으로 pH를 12~13으로 조절하고 내부 표준물질로 0.01% dodecane 클로로포름 용액 1ml를 가한 후, 클로로포름 50ml를 3회 가해 알칼로이드를 추출하였다. 클로로포름층을 감압농축기로 완전 농축시키고 농축된 시료에 클로로포름 1ml를 가해 GC 및 GC/MS분석용 시료로 사용하였다.

4. GC에 의한 잎담배 중 알칼로이드의 정량

GC에 의한 잎담배 중 알칼로이드의 정량은 표준품이 있는 니코틴, anabasine은 내부 표준법에 의해 정량하였으며 나머지 알칼로이드는 각 성분의 봉우리 넓이를 내부 표준물질의 봉우리 넓이로 나누어 그 비로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. GC 및 GC/MS에 의한 잎담배 중 알칼로이드의 분리 및 확인

기체 크로마토그래프에 의한 잎담배중 알칼로이드를 분리한 기체 크로마토그램은 그림 1과 같았다. 그림 1에 나타낸 바와 같이 SE-54 fused silica capil-

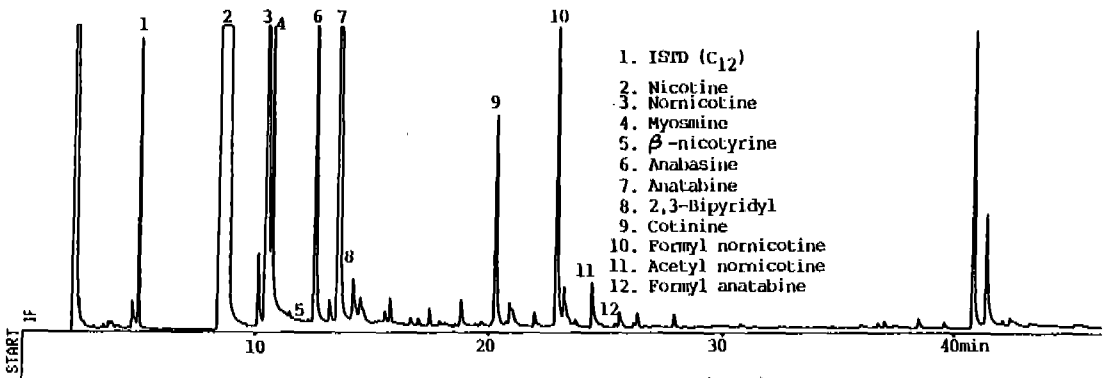


Fig. 1 GC Chromatogram of Alkaloids from Burley(USA) Tobacco.

lary 분리관에 의해 많은 성분들은 분리할 수 있었다.

기체 크로마토그래프에 의해 분리된 각 봉우리 성분을 확인하기 위하여 시료를 기체 크로마토그래프-질량분석기에 주입하여 각 봉우리 성분의 질량 스펙트럼을 얻었다. 이중 분자량이 146인 질량스펙트럼을 그림 2에 나타내었다. 이 질량 스펙트럼은 EPA/NIH mass spectral data base<sup>16)</sup>에 수록된 노르니코틴의 질량 스펙트럼과 토막이온이 정확히 일치하였으며, 분자량이 146으로 이 화합물은 노르니코틴임을 확인할 수 있었다.

이와 같이 질량스펙트럼에서 분자량, 토막이온의

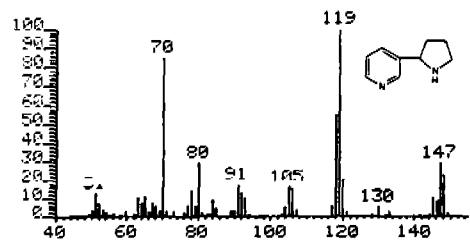


Fig. 2 Mass Spectrum of Nornicotine from Burley (USA) Tobacco.

질량과 그 존재비(relative abundance) 및 여러 연구자의 연구결과<sup>5-11)</sup>등으로부터 그림 1에 나타난 바와 같이 니코틴, 노르니코틴, myosmine, beta-nico-

tyrine, anabasine, anatabine, 2,3-bipyridyl, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine, formyl anatabine 등을 분리 확인할 수 있었다.

본 연구에서 분리 확인한 알칼로이드 이외에 여러 연구자들<sup>5-11)</sup>의 보고와 같이 노르니코틴계, anatabine계 등 약 20개 정도가 더 알려져 있어 이들 성분에 대하여는 추후에 분리 확인코져 한다.

## 2. 추출방법간의 비교

담배중 알칼로이드를 메틸 알코올-속슬레 장치를 이용하여 추출하고 산, 알칼리로 처리하여 추출하는 방법은 많은 양의 시료와 추출시간이 오래 걸려 많은 시료를 처리하는데는 어려움이 있다. 그러므로 시료의 양을 줄이고 추출시간을 단축하여 빠른 시간내에 많은 시료를 분석하기 위하여 알칼리 및 산, 알칼리 처리의 2가지 추출방법을 비교 검

토하였다.

2가지 추출방법에 따라 비교한 기체 크로마토그램을 그림 3에 나타내었다. 그림 3에 나타난 바와 같이 시료에 산, 알칼리로 알칼로이드를 추출한 시료가 알칼로이드 성분만 선택적으로 나오는 것을 알 수 있었다. 그러나 시료에 알칼리 단독으로 알칼로이드를 추출한 방법은 알칼로이드 이외의 다른 성분들이 많이 나와 기체 크로마토그램이 복잡하고 또한 머무른 시간이 30분 이후에도 계속 봉우리가 나오는 현상을 볼 수 있었다.

따라서 2가지 추출 방법 중 시료에 산 처리 후 클로로포름으로 알칼로이드 이외의 성분을 제거하고, 다시 물층을 알칼리화하여 클로로포름으로 알칼로이드를 추출하여 분석하는 방법이, 알칼리만으로 처리하는 방법보다 시료 전처리 과정이 다소 복잡하고 시간이 많이 걸리나, 알칼로이드 성분만

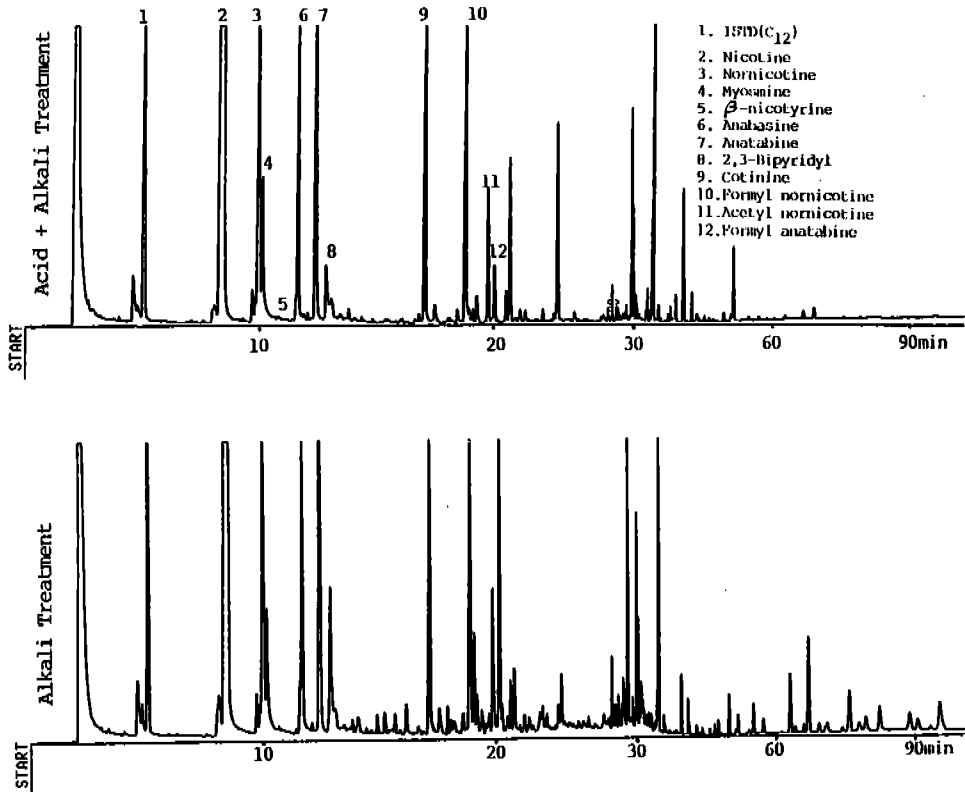


Fig. 3 Comparison of GC Chromatogram between Separation Method of Alkaloids from Burley(USA) Tobacco.

선택적으로 분리할 수 있기 때문에 오히려 분석시간을 단축할 수 있고 분석결과의 해석에도 유리한 것으로 사료된다.

### 3. 잎담배 중 알칼로이드의 분석

메틸 알코올-속슬레 추출 및 산, 알칼리 처리에 의해 잎담배중 니코틴과 anabasin의 품종별 함량을 조사한 것을 표 1에 나타내었다. 품종별로는 니코틴, anabasin 함량은 다소 차이가 있으나 대체로 버얼리종 > 황색종 > 오리엔트종 순으로 나타나 Verne 등<sup>17,18)</sup>의 보고와 비슷하였다.

니코틴과 anabasin 이외의 알칼로이드 화합물은 표준품의 구입이 어려워 기체 크로마토그램상에 나타난 각 성분의 봉우리 넓이를 내부 표준물질(dodecane)의 봉우리 넓이로 나누어 상대적 비율로 각 성분들을 비교하여 표 2에 나타내었다.

품종간 알칼로이드 함량은 버얼리종 > 황색종 > 오리엔트종 순이었으나, 오리엔트종은 황색종에 비해 노르니코틴, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine 함량은 오히려 높게 나타났다.

품종별 알칼로이드의 상대비는 황색종은 니코틴 > anatabine > 노르니코틴 > anabasin 순이었고,

Table 1. Composition of Alkaloids from cured leaves

Component	Flue-cured		Burley		Orient	
	Korea	U. S. A.	Korea	U. S. A.	Izmir	Basma
	----- (ug/g) -----					
Nicotine	11975	15480	25422	34205	9038	14227
Anabasin	141	201	287	319	30	109

Table 2. Relative composition of Alkaloids from cured leave

Component	Flue-cured		Burley		Orient	
	Korea	U. S. A.	Korea	U. S. A.	Izmir	Basma
	----- (Peak area/ISTD area) -----					
Nicotine	208.650	269.740	442.967	596.002	157.483	247.902
Nornicotine	0.578	2.314	59.446	12.251	5.684	9.962
Myosmine	0.502	0.855	2.583	1.330	1.736	0.430
Anabasin	1.407	1.995	2.855	3.175	0.298	1.080
Anatabine	6.107	6.764	16.828	17.733	1.738	4.695
2, 3-Bipyridyl	0.350	0.280	0.438	0.467	0.099	0.246
Cotinine	—	0.215	0.986	1.309	0.603	0.595
Formyl nornicotine	0.174	0.745	3.835	2.264	1.171	1.189
Acetyl nornicotine	—	0.130	0.867	0.405	0.267	0.281
Formyl anatabine	—	0.244	0.087	0.127	—	0.076

버얼리종과 오리엔트종은 니코틴 > 노르니코틴 > anatabine 순으로 나타났다. 지금까지 알칼로이드의 주요 화합물은 니코틴, 노르니코틴, anabasine이 주성분<sup>5-11)</sup>으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 anatabine이 품종에 따라서는 노르니코틴 또는 anabasine에 비해 상대적 비율이 높게 나타난 것과 알칼로이드 절대 함량이 낮은 오리엔트종이 황색종에 비해 cotinine과 노르니코틴 계열 화합물의 함량이 높은 점등은 앞으로 시료수를 많이하여 좀더 규명되어야 할 것으로 고찰된다.

품종별 알칼로이드 함량을 한, 미간 상대적 비율로 비교해 보면 버얼리종, 황색종 모두 니코틴 함량이 미국산이 한국산에 비해 높은 것으로 나타났다. 버얼리종의 노르니코틴 함량은 한국산이 미국산에 비하여 높은 것으로 나타났다.

엽분별 알칼로이드 함량은 하엽에서 상엽으로 갈수록 함량이 높아지는 결과를 나타내었고 그 함량은 표 3에 나타났다. 노르니코틴은 미국산 B<sub>3</sub>F를 기준으로 볼 때 한국산은 중엽 이상에서 함량이 현저히 높아지는 것으로 나타났다.

Table 3. Relative composition of Alkaloids followed by Stalk Position of Burley Tobacco

Component	Korea				U. S. A.
	Lugs	Cutter	Leaf	Tips	B <sub>3</sub> F
	----- (Peak area/ISTD area) -----				
Nicotine	108.052	211.015	481.236	510.046	496.825
Nornicotine	3.537	26.483	52.788	74.971	16.114
Myosmine	0.997	1.084	1.705	2.603	0.875
Anabasine	0.539	1.109	2.796	3.393	2.758
Anatabine	4.291	10.738	21.697	23.645	16.041
2, 3-Bipyridyl	0.220	0.236	0.243	0.257	0.207
Cotinine	0.530	0.423	0.442	0.541	0.560
Formyl nornicotine	0.751	1.373	1.630	2.168	1.229
Acetyl nornicotine	0.149	0.214	0.262	0.305	0.220
Formyl anatabine	0.062	0.058	0.072	0.079	0.078

이상의 결과에서 버얼리종은 한국산이 미국산에 비해 노르니코틴 함량이 현저히 높아지는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 니코틴을 노르니코틴으로 변화시키는 우성 유전자의 돌연 변이율이 일세대마다 0.8%라는 보고<sup>4, 10)</sup>와 연관하여 볼때, 우리나라 버얼리종 종자퇴화 또는 재배환경 및 재배방법 등의 차이에 기인하는 것인지는 앞으로 더 많은 연구를 통하여 규명되어야 할 것으로 보인다.

## 결 론

담배 알칼로이드 화합물 중 미량성분을 분석할 수 있는 분석방법을 검토하고, 이 방법에 따라 한국산 및 미국산 황색종, 버얼리종과 이즈미르, 바스마에 대한 알칼로이드 화합물 종류와 함량을 조사한 결과는 아래와 같다.

1. GC 및 GC/MS(SE-54 fused silica capillary column)로 잎담배 중에서 니코틴, 노르니코틴,

myosmine,  $\beta$ -nicotryline, anabasine, anatabine, 2, 3-bipyridyl, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine, formyl anatabine 등 11종의 알칼로이드 화합물을 분리 확인하였다.

2. 알칼로이드 분석방법은 시료에 산 처리(pH 2-3)를 하여 클로로포름으로 불순물을 제거하고 알칼리 처리(pH 12-13)를 하여 클로로포름으로 알칼로이드를 추출하여 분석하는 방법이 바람직할 것으로 보인다.
3. 알칼로이드 화합물 함량은 대부분 버얼리종이 가장 높고 황색종, 오리엔트종 순이었으나, 오리엔트종은 황색종에 비해 노르니코틴, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine 함량이 높을 것으로 추정된다.
4. 한국산 버얼리종은 미국산 버얼리종(B<sub>3</sub>F)에 비해 중엽, 본엽, 상엽의 노르니코틴 함량이 2~6배 정도 높을 것으로 추정된다.

### 참 고 문 헌

1. Jeffrey R. N., *Tob. Sci.*, 3, 89-93(1959)
2. Akehurst B. C., *Tobacco*, 2th ed., Longman, London & New York, p 78-650(1981)
3. Mann T. J., J. A. Weybrew, D. F. Matzinger and J. L. Hall, *Crop Sci.*, 4, 349-353 (1964)
4. 한국연초학회, *담배과학총설*, p 26-32(1987)
5. Kisaki T., S. Mizusaki and E. Tamaki, *Phytochemistry*, 7, 323-327(1968)
6. Bolt A. J. N., *Phytochemistry*, 11, 2341-2343(1972)
7. Warfield A. H., W. D. Galloway and A. G. Kallianos, *Phytochemistry*, 11, 3371-3375 (1972)
8. Miyano M., H. Matsushita, N. Yasumatsu and K. Nishida, *Agric. Biol. Chem.*, 43(10), 2205-2206(1979)
9. Matsushita H., Y. Tsujino, D. Yoshida, A. Saito, T. Kisaki, K. Kato and M. Noguchi, *Agric. Biol. Chem.*, 43(1), 193-194(1979)
10. Miyano M., H. Matsushita, N. Yasumamatsu and K. Nishida, *Agric. Biol. Chem.*, 43(7), 1607-1608(1979)
11. *ibid*, 45(5), 1029-1032(1981)
12. Louis D. Q. and A. P. Nicholas, *Agric. and Food Chem.*, 10(1), 79-82(1962)
13. Lyerly L. A. and G. H. Greene, *Beitr. Tabakforsch.*, 8(6), 359-361(1976)
14. Matsushima S., T. Ohsumi and S. Sugawara, *Agric. Biol. Chem.*, 47(3), 507-510(1983)
15. 김찬호 외, *담배성분분석법*, 한국인삼연초연구소, 18-19(1991)
16. Heller S. R. and G. W. A. Milne, *EPA/NIH Mass Spectral Data Base*, US Government Printing Office, WASHINGTON, D. C., Vol. 1-4(1978)
17. Verne A. S. and J. A. Saunders, *Tob. Sci.*, 26, 117-120(1982)
18. Andersen R. A., P. D. Fleming, H. R. Hamilton-Kemp, D. F. Hildebrand and T. G. Sutton, *Tob. Sci.*, 34, 50-56(1990)
19. Wernsman E. A. and D. F. Matzinger, *Tob. Sci.*, 14, 34(1970)