

LC-MS/MS를 이용한 담배 중 Amadori Compounds의 분석

민혜정* · 김영희 · 이정민 · 장기철

KT&G R&D본부

(2011년 11월 22일 접수 ; 2011년 11월 30일 수정 ; 2011년 12월 7일 승인)

Analysis of Amadori Compounds in Tobacco Leaf by LC-MS/MS

Hye-Jeong Min*, Young-Hoi Kim, Jeong-Min Lee and Gi-Chul Jang

KT&G R&D Headquarters

(Received Nov 22, 2011; Revised Nov 30, 2011; Accepted Dec 7, 2011)

ABSTRACT : Amadori compounds(1-deoxy-1-amino-2-ketoses) are important precursors of color, flavor and aroma produced in foods. Amadori compounds occur naturally in tobacco. The contribution of amadori compounds to smoke quality has been (of) interest because of their roles of the Maillard reaction in the leaf chemistry. The amounts of these compound in tobacco are affected by the processes of aging, drying and storage conditions. In this study, eight compounds were chemically synthesized because amadori compounds (have not been sold commercially these days.) were not available for obtaining commercially. The aim of this study was to develop the analytical method of amadori compounds in tobacco leaf by the liquid chromatography mass spectrometry using triple quadrupole analyzer(LC-MS/MS). This method was simple, rapid, selective and sensitive, and eight amadori compounds were simultaneously and quantitatively analyzed within 20 minutes. This method showed excellent accuracy and precision. Recovery rates of amadori compounds ranged from 86% to 102%, with relative standard deviation(RSD) ranged from 2.6% to 5.9%. This method was applied to analysis of amadori compounds contents of tobacco leaves in different varieties. Furthermore, it was expected that the method could be extended to the analysis of other amadori compounds.

Key words : amadori compounds, tobacco leaf, LC-MS/MS

아마도리 화합물(Amadori compound)로 불리는 1-deoxy-1-amino-2-ketoses는 농산물과 식품에서 색, 맛과 aroma의 중요한 전구체로 알려져 있다 (Zhigang *et. al.* 2007). 이 화합물들은 식품에서 열처리를 동반하는 가공과정이나 저장과정에서 Maillard 반응으로 생성된다. Maillard 반응은 환

원당, 알데하이드 또는 케톤의 카르보닐 그룹과 아민 또는 아미노산의 결합으로 일어난다(Hodge, 1953). 아마도리 화합물은 담배에도 존재하며 몇몇 화합물들은 담배 연기 질(smoke quality)에 관여하는 것으로 보고되어 있다(Brown & Williamson, 1979). 관능평가를 통한 아마도리 화

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 가정로 30 KT&G R&D 본부

*Corresponding author : KT&G R&D Headquarters, 30 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea
(phone: 82-42-866-5559; fax: 82-42-866-5544; e-mail: 20055216@ktng.com)

합물이 연기 질에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. Fructose-glutamic acid, fructose-aspartic acid, xylulose-tryptophan과 fructose-valine의 경우 담배의 맛과 향을 증가시키고 자극을 감소시킴으로써 연기의 질에 긍정적인 영향을 미치는 반면 fructose-alanine, fructose-proline 및 fructose-phenylalanine은 오히려 부정적인 영향을 미친다. Fructose-valine과 xylulose-valine의 경우 같은 아미노산이더라도 연기에 미치는 영향은 서로 다른데 이는 아미노산만큼 환원당 또한 연기 질에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. Fructose-glycine, fructose-leucine, xylulose-proline은 연기 질에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 담배에서 아마도리 화합물의 양은 담배의 숙성, 건조와 저장 상태에 따라 달라진다.

아마도리 화합물 분석을 위해 흔히 사용되는 방법은 다양한 고정상과 검출기를 적용한 HPLC를 이용한 방법이나 만족할 만한 분리능과 감도를 가지지는 못하고 있다(Tomas *et. al.* 2005). GC 또는 GC/MS를 이용한 방법은 분석하는 동안 아마도리 화합물의 유도체화가 필요하기 때문에 거의 사용되지 않는다(Eichner *et. al.* 1990). 따라서 담배의 간섭효과를 줄이고 보다 선택적이고 감도가 뛰어난 분석방법이 필요하며 현재에는 Electro Spray Ionization(ESI)를 이용한 mass spectrometry 방법이 다양하게 이용되고 있다.

본 실험에서는 높은 감도와 선택성으로 최근 들어 많이 사용되고 있는 LC-MS/MS를 이용하여 담배 중에 존재하는 아마도리 화합물들의 분석법을 확립하고자 하였다. 또한 복잡하고 다양한 시료 매트릭(matrices)로부터 분석 컬럼 및 장비를 보호하고 분석방법의 견고성을 높이기 위하여 solid phase extraction cartridge(SPE)를 이용한 시료 정제 방법을 적용하여 분석법을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 아마도리 화합물의 합성을 위한 *D*-glucose, asparagine, threonine, serine,

proline, alanine, valine, leucine과 phenyl alanine은 Aldrich(Missouri, USA)에서 구입하였다. 3R4F 표준담배는 Kentucky Tobacco Research & Development Center (University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로 부터 구입하였다. HPLC 등급의 methanol과 acetonitrile은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, 분석용 시약 등급의 formic acid는 Aldrich(Missouri, USA)에서 구입하였다. Solid phase extraction cartridge는 Waters(USA)에서 구입하였다. 분석에 사용한 제품담배는 국내에서 시판되는 담배를 구입하여 사용하였다.

아마도리 화합물의 합성과 분리 및 정제

현재 아마도리 화합물은 상업적으로 판매되고 있지 않으므로 8개의 아마도리 화합물을 본 연구를 위해 합성하여 사용하였다. 본 연구를 위해 합성한 8개의 아마도리 화합물을 Fig. 1에 나타내었다(본 논문에서는 아마도리 화합물을 약어로 표시하였다. 예를 들어 1-Deoxy-1-Asparagini-D-Fructose를 Fructose-ASN 또는 F겨-ASN으로 나타내었다). 8개의 아마도리 화합물은 문헌을 참고로 하여 합성하였다(Hodge *et. al.* 1963). *D*-glucose, 아미노산과 methanol을 round-bottom 플라스크에 넣고 oil bath로 가열하였다. 이 반응 혼합물들을 90 °C에서 8시간 동안 환류 냉각시켰다. TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 반응이 완결되었는지 확인한 다음 상온으로 냉각시키고, 반응 혼합물들의 분리 정제를 위해 감압 농축기를 사용하여 잔류 용매를 휘발시켰다. 이 혼합물들을 ethanol/H₂O 혼합용액(7 : 3)에 녹인 다음 Dowex 50WX4 ion exchange resin으로 충전된 open column(50 x 4 cm)에 loading 시킨다. 이후에 부반응물들의 제거를 위하여 ethanol/H₂O 혼합용액과 물을 이용하여 세척하였다. 아마도리 화합물의 용리는 0.2 M NH₄OH 용액을 이용하여 40 mL 시험관에 받았다. 각각의 시험관은 TLC를 이용하여 아마도리 화합물을 확인한 다음 감압 농축기를 사용하여 잔류 용매를 휘발시켰다. 얻어진 고체 화합물들은 ethanol에 녹인 후 소량의 물을 첨가하면서 재결정화하여

LC-MS/MS를 이용한 담배 중 Amadori Compounds의 분석

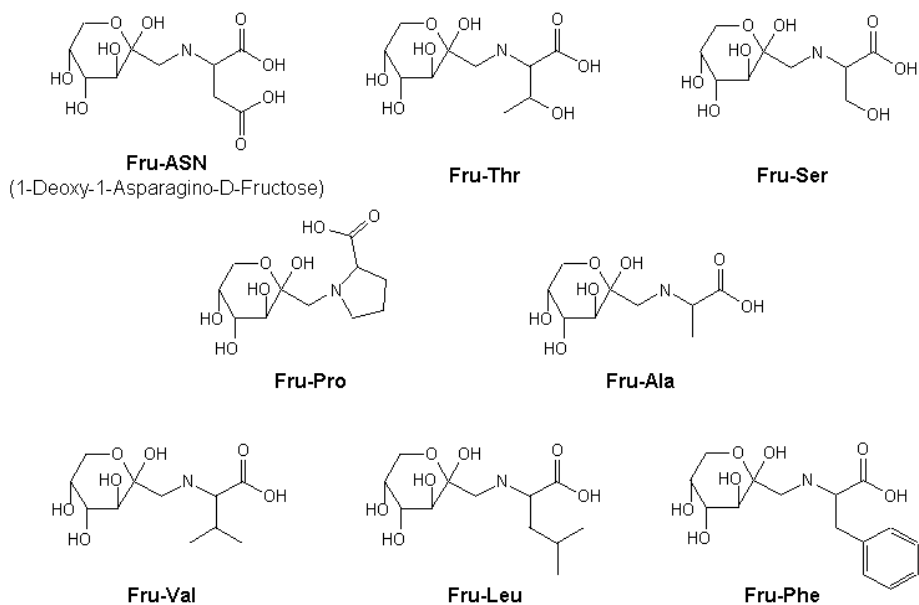


Fig. 1. Structure of Amadori Compounds.

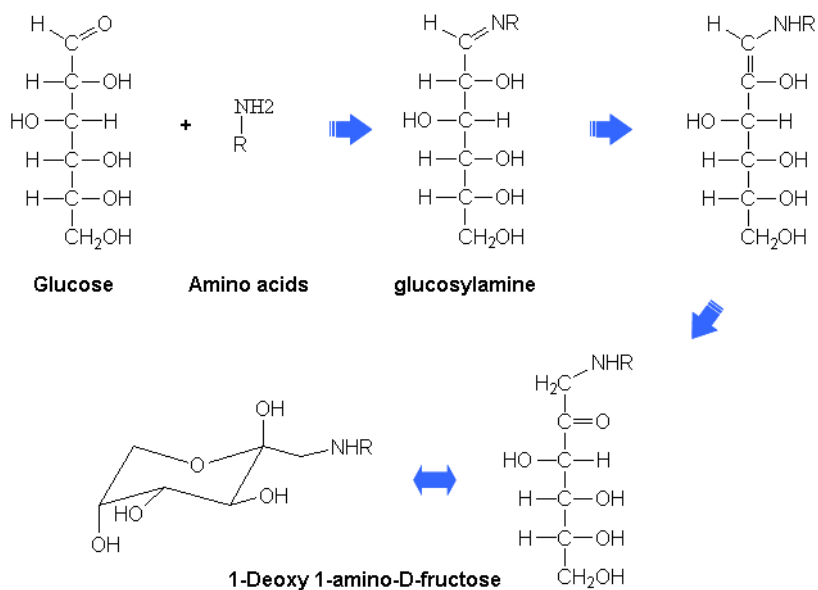


Fig. 2. Formation Mechanism of Amadori Compounds.

흰색 고체화합물을 얻었다. 마지막으로 NMR (unclear magnetic resonance)과 LC-MS/MS을 이용하여 물질의 구조를 확인하였다. 아마도리 화합물의 생성 메커니즘을 Fig. 2에 나타내었다.

담배 시료 추출

담배는 40 °C에서 3시간 건조 후 분쇄한 다음 2 mm mesh 체를 통과시켰다. 분쇄된 담배 0.5 g 을 100 mL 삼각플라스크에 넣은 다음 내부표준 물질, DL-phenylalanine-β,β-d₂를 300 ng 포함하고 있는 수용액 50 mL를 넣어 30분간 초음파 추출하였다. 추출된 시료는 여과지로 여과하였다. 분석의 견고성과 시료의 간섭물질 제거를 위하여 Waters Oasis HLB® solid phase extraction (SPE) cartridge (6 mL, 200 mg)를 이용하여 정제하였다. 먼저 SPE 카트리지를 진공 manifold에 고정시킨 후 4 mL의 메탄올을 이용하여 세척하고 이어서 증류수 4 mL를 이용하여 평형화시켰다. 여기에 시료 추출액 3 mL를 일정한 유속으로 loading 하였다. 시료의 용리는 loading 이후에 이루어지며 10 % MeOH/Water 용액 3 mL를 이용하여 시험관에 받았다. 이 용액을 LC-MS/MS에 주입하였다.

분석 장비 및 분석 조건 최적화

분석에 사용한 LC-MS/MS system은 binary pump system을 사용하는 Agilent 1200 series (USA)와 Applied Biosystem(Foster City, CA, USA)의 AB Sciex API 4000 모델의 조합으로 구성되어 있다. 컬럼은 2.0 mm의 내경과 250 mm의 길이를 갖는 IonPac CS-17 분석 컬럼(Dionex, USA)과 2.0 mm의 내경과 50 mm의 길이를 갖는 IonPac CS-17 가드 컬럼(Dionex, USA)을 사용하였다. 분석하는 동안 컬럼의 온도는 30°C로 유지시켰다. 분석 물질의 분리를 위하여 사용한 이동상은 A : 0.1 % formic acid 수용액, B : 0.1 % formic acid acetonitrile 용액이며, 초기에 A : B의 비율을 100 : 0로 10분간 유지한 후 15분 까지 A : B의 비율을 30 : 70으로 변화시키는 기울기 용리 방법을 시행하였다. 이때 사용한 유속은 0.2 mL/min이다.

T(i)riple quadrupole을 이용한 MS/MS의 검출방법은 MRM(multiple reaction monitoring)방법을 이용하였고, 이온화 방법으로는 Electro Spray Ionization(ESI)를 선택하였다. 최적화된 ionization source의 작업 조건은 5.2 kV의 electrospray voltage, 60 psi의 nebulizer gas, 18 psi의 curtain

Table 1. Effects of Amadori compounds on smoke quality

Amadori Compound	Smoke Quality	Effect
Fructose-glutamic acid	Positive	Decreases irritation and adds sweetness
Fructose-aspartic acid		Increases body and adds a nice leathery note
Xylulose-tryptophan		Increases body and mouthfeel, adds flue-cured like taste and sweetness
Fructose-valine		Increases burley character
Xylulose-valine	Fair	Slight flue-cured type sweetness
Fructose-alanine	Negative	Increases dryness and irritation
Fructose-proline		Causes dryness and stinging irritating
Fructose-phenylalanine		Increases irritation with some burley character
Fructose-glycine	-	No effect
Fructose-leucine		
Xylulose-proline		

Table 2. MRM parameters of Amadori compounds

Analyte	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	DP (V)	CXP (V)
Fructose-ASN	296	278	15	61	20
Fructose-Thre	282	264	13	56	18
Fructose-Ser	268	250	13	56	18
Fructose-Pro	278	260	17	56	18
Fructose-Ala	252	234	13	46	16
Fructose-Val	280	262	15	31	18
Fructose-Leu	294	276	15	46	28
Fructose-Phe	328	310	17	76	20

gas, 50 psi의 turbo ionspray gas flow rate, 10 V의 entrance potential, 550 °C의 turbo ionspray gas temperature이다. 각각의 기기 조건은 위의 이동상 조건에서 최적의 성능을 발휘 할 수 있도록 실험적으로 결정되었다. 각 화합물은 precursor 이온(Q1)을 선택한 후 실험적으로 최적 collision energy(CE), declustering potential(DP), collision cell exit potential(CXP)를 선택하여 정량 분석에 사용할 product 이온(Q2)를 선택하였다. Fru-ASN의 경우 CE 15 V, DP 61 V와 CXP 20 V에서 M/Z 296의 Q1과 M/Z 278의 Q2가 최적조건으로 확립되었다. 각 화합물의 최적화된 MRM조건은 Table 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 담배 중에 존재하는 아마도리 화합물의 분석법을 확립하고 몇몇 단엽 담배와 국내에서 판매되고 있는 담배에 존재하는 아마도리 화합물 함량을 분석하였다. 3R4F 표준담배 시료에 대한 8종의 아마도리 화합물의 chromatogram을 Fig. 3에 나타내었다. 모든 분석 물질은 20분 이내에 시료 매질(matrices)의 방해 없이 높은 감도를 가지며 좋은 분리능을 나타냈었다.

본 연구에서 확립된 분석법에 대한 분석 유효화 결과를 Table 3에 나타내었다. 분석법 유효화

Table 3 Validation data of method

Analyte	Recovery (%)	RSD (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Fructose-ASN	96	4.5	18.9	56.8
Fructose-Thre	102	3.6	3.9	11.7
Fructose-Ser	101	3.1	8.4	25.1
Fructose-Pro	98	5.9	0.9	2.6
Fructose-Ala	99	3.7	2.4	7.3
Fructose-Val	99	3.8	2.1	6.3
Fructose-Leu	93	3.9	114.2	342.7
Fructose-Phe	86	2.6	6.5	19.6

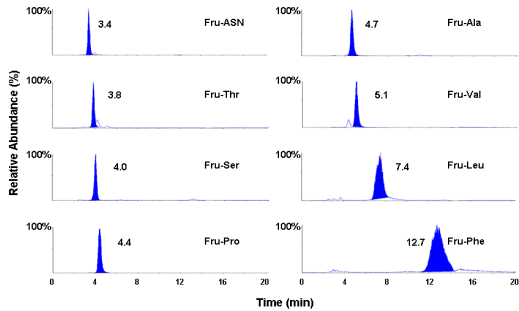


Fig. 3. Chromatogram of Amadori compounds in 3R4F.

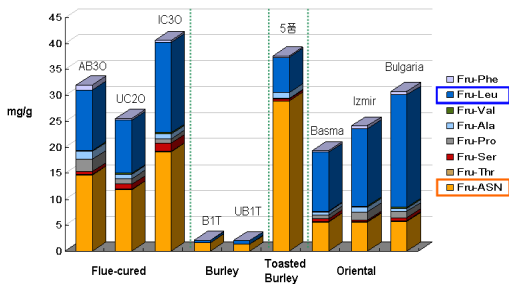


Fig. 4. Amadori compounds contents of tobacco leaf.

실험은 담배 시료에 세 가지 농도의 아마도리 화합물을 각각 3번 첨가하여 수행하였다. 회수율은 86 ~ 102 %, 상대표준편차는 2.6 ~ 5.9 %이며 검

출한계(LOD)는 0.9~114 ng/mL, 정량한계(LOQ)는 2.6~342 ng/mL 수준으로 나타났다. 모든 검량선은 $R^2=0.999$ 이상의 직선성을 나타내었다.

LC-MS/MS를 이용하여 확립한 분석 방법을 이용하여 단엽 담배에 대한 아마도리 화합물의 함량을 분석하였고 그 결과를 Fig. 4에 나타냈었다. 아마도리 화합물의 양은 황색종 > 오리엔트종 > 버어리종 순으로 나타났으며, Fructose-ASN과 (f)Fructose-Leu는 다른 아마도리 화합물에 비해 높은 함량을 보였으며, fructose-Thre와 fructose-Val은 상대적으로 낮은 함량을 보였다. 버어리종의 경우 토스트 과정을 거친 후 아마도리 화합물의 함량이 상당히 증가하였다. 이는 토스트 과정과 같은 열처리가 아마도리 화합물 생성에 영향을 미치기 때문이다.

국내에서 시판되는 제품 담배에 대한 아마도리 화합물의 분석 결과를 Table 4에 나타내었다. 연기 타르 수준이 각각 1 mg, 3 mg과 6 mg인 제품 담배의 각초에 대한 아마도리 화합물은 제품별로 다른 함량을 보였으며, 단엽과 마찬가지로 Fructose-ASN과 fructose-Leu는 다른 아마도리 화합물에 비해 높은 함량을 보였으며, fructose-Thre와 fructose-Val은 상대적으로 낮은 함량을 보였다.

Table 4. Amadori compounds contents of some domestic cigarette products

Analyte	Tar 1 mg		Tar 3 mg		Tar 6 mg	
	Contents (mg/g)	RSD (%)	Contents (mg/g)	RSD (%)	Contents (mg/g)	RSD (%)
Fructose-ASN	124	2.9	17.1	3.3	16.1	1.4
Fructose-Thre	0.12	2.2	0.09	3.5	0.11	3.2
Fructose-Ser	1.47	3.0	0.87	1.5	0.97	2.7
Fructose-Pro	0.67	1.4	1.04	5.9	1.08	0.3
Fructose-Ala	0.57	3.4	0.73	1.1	0.75	4.8
Fructose-Val	0.21	5.0	0.17	1.2	0.19	3.6
Fructose-Leu	24.8	3.8	14.2	1.3	19.6	6.0
Fructose-Phe	0.42	1.4	0.51	2.7	0.64	3.8
Total	40.6		34.7		39.4	

결 론

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 담배에 존재하는 아마도리 화합물의 분석법을 확립하였다. 확립된 분석법은 좋은 분리능과 감도를 가지며, 8개의 아마도리 화합물을 20분 이내에 간단하고 빠르게 분석하였다. 또한 담배 매질(matrices)에 간섭을 받지 않으며 좋은 회수율과 낮은 분석한계 값을 나타냈다. 확립된 분석법을 이용하여 단엽담배와 국내 시판 담배를 분석한 결과 아마도리 화합물의 양은 황색종 > 오리엔트종 > 버어리종 순으로 나타났으며, Fructose-ASN과 fructose-Leu는 다른 아마도리 화합물에 비해 높은 함량을 보이는 반면, fructose-Thre와 fructose-Val은 상대적으로 낮은 함량을 보였다. 본 연구에서 확립된 분석법은 다른 아마도리 화합물 분석에 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Brown & Williamson Tobacco Corporation. (1979) Sensory evaluation of amadori compounds.
- Eichner, K., Reutter, M., and Wittmann, R. (1990) In the Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology. p63
- Hodge, J. E. and Fisher, B. E. Methods in carbohydrate chemistry. (1963) vol. 2. p. 99-107. Newfoundland, Canada.
- Hodge, J. E. and Schleicher, E. (1953) Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem. 1*: 928-943.
- Tomas, D., Karin K. Stephanie, D., Fabien, R. and Imre, B. (2005) Analysis of amadori compounds by high-performance cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. 77*: 140-147.
- Zhigang, H., Chih-Ying, L., Baiming, X., Naidong W., Barry, P., Michael, K., and Chi-Tang, H. (2007) Separation of amino acids, peptides and corresponding amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *J. Chro. A. 1147*: 165-171.