

## Pentafluorobenzyl ester 化에 의한 微量 Abscisic Acid 의 GLC 分析法

鄭永浩\*·洪茂基\*·宋炳薰\*  
(1985년 11월 7일 접수)

### A Micro-quantification of Abscisic Acid from Plant Tissue by Pentafluorobenzyl Esterification Using GLC

Young Ho Jeong,\* Moo Ki Hong\* and Byung Hun Song\*

#### Abstract

A new method for micro-quantification of abscisic acid from plant tissue is described. GLC-ECD method of abscisic acid pentafluorobenzyl ester synthesized by reaction of plant extract with pentafluorobenzyl bromide showed higher sensitivity than that of abscisic acid methyl ester, and the detection limit of abscisic acid by the described method was as low as 5 pg.

#### 緒 論

植物體 內生 abscisic acid(ABA) 含量 分析은 主로 生物檢定法을 利用하였으나 이는 定量分析의 不確實性으로 그後 GLC에 依한 化學分析法이 開發되어 利用되고 있다.

植物體內的 ABA는 gibberellic acid나 indole acetic acid와 같은 植物ホル몬과 마찬가지로 有機酸의 形態로 存在하므로 植物抽出物을 diazomethane으로 methylation시켜 ABA methyl ester 形態로 GLC-ECD로 分析하는 方法<sup>(1,2)</sup>이 主로 利用되어 왔으나 diazomethane의 높은 爆發性으로 이 方法의 利用을 忌避하고 있어 安全한 分析法으로 植物ホル몬의 methyl ester 化劑로서 boron trifluoride-methanol complex(BF<sub>3</sub>-methanol)의 利用法<sup>(3)</sup>이 開發되었고 또한 bis(trimethylsilyl) ace-

tamide(BSA)에 依한 trimethyl silyl 誘導體를 GLC-ECD로 分析<sup>(4)</sup>하는 方法이 利用되었으나 이들 方法에 依한 ABA 定量 限界가 100 pg~25 ng 程度로 極微量의 ABA 分析用으로는 適合하지 못하였다.

따라서 筆者들은 植物體중 極微量의 ABA 分析法 開發을 爲하여 pentafluorobenzyl bromide (PFB Br)를 利用하여 ABA-PFB ester 誘導體를 合成하여 BF<sub>3</sub>-methanol에 依한 ABA-methyl ester 誘導體를 GLC-ECD로 分析하여 ABA-methyl ester와 ABA-PFB ester의 分析 限界를 比較하고 ABA의 微量分析 可能性을 檢討하기 爲하여 本試驗을 遂行하였다.

#### 材料 및 方法

##### ABA 抽出

供試材料로 녹두(*Phaseolus aureus* RoxB) 種子를

\*農村振興廳 農藥研究所(Agricultural Chemicals Research Institute, Rural Development Administration, Suweon, 170)

利用하였다. 種子 20 g을 80% methanol 100 ml 에 浸漬, 磨碎하여 24時間 振盪, 抽出後 Celite 545 를 添加하여 Büchner funnel 에서 濾過하고 減壓蒸發시켜 methanol 을 除去하고 水溶性 物質을 얻어 Fig. 1과 같이 ABA를 抽出 分配한다.

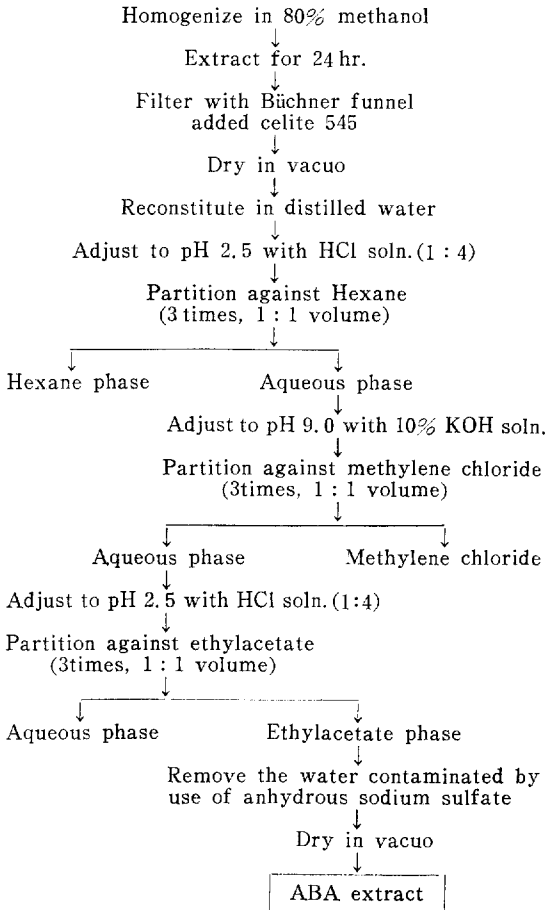


Fig. 1. Flow chart for the purification of ABA from mung bean seed extract

ABA 抽出物의 精製

ABA 抽出物을 少量의 chloroform 에 溶解시켜 2 g 의 silica gel 에 吸着시킨 後 減壓蒸發乾燥시키고, 이를 15 g의 silica gel(Merk, silica gel 60, 70~230 mesh) 를 充填한 glass column(16 mm I.D.) 上에 놓고 10% acetonitril/chloroform, acetic acid(0.2 N) 溶液 50 ml 로 流出시킨 後 40% acetonitril/chloroform, acetic acid(0.2 N) 溶液 60 ml 로 流取하여 減壓蒸發乾燥시켰다.

ABA 誘導體合成

ABA 抽出 精製한 試料를 5 ml 의 acetone에 溶解시켜 10 ml 容 試驗管에 넣고 30% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 1滴과 1% PFB Br acetone 溶液을 넣어 密栓한 後 室溫(25°C) 에서 4時間 反應시켜 ABA-PFB ester를 合成하여 hexane으로 partition시켜 減壓乾燥시켰다. ABA-methyl ester는 같은 方法으로 ABA 抽出 精製한 試料를 5 ml 의 acetone에 溶解시켜 10 ml 容 試驗管에 넣고 BF<sub>3</sub>-methanol 溶液 1 ml 를 넣어 密栓한 後 90°C 의 water bath 上에서 30分間 反應시켜 合成하였다. 이와 마찬가지로 方法으로 ABA 標準品으로 ABA-PFB ester 및 ABA-methyl ester 를 合成하여 hexane으로 partition시켜 減壓蒸發乾燥시켰다.

한편 ABA-PFB ester 의 合成에 所要되는 反應時間을 測定하기 爲하여 위의 ABA-PFB ester 合成과 같은 條件下에서 反應時間別로 ABA-PFB ester 를 合成하였다.

ABA 의 GLC 分析

各 ABA ester 誘導體는 ECD가 附着된 GLC(Hitachi, Mod. 063)을 使用하여 Table 1과 같은 條件으로 分析하였다.

Table 1. Conditions of GLC for analysis of ABA derivatives

Specification	Condition
Detector	ECD( <sup>63</sup> Ni)
Column	Glass column(2 m×3 mm) 1.5% OV-17, 1.75% OV-210/ Chromosorb WHP(100~120)
Injection pot temp.	260°C
Column temp.	220°C(for ABA-methyl ester) 250°C(for ABA-PFB ester)
Detector temp.	280°C
Carrier gas	N <sub>2</sub> , 60 ml/min.
Chart speed	10 mm/min.

結果 및 考察

ABA-PFB ester 化의 條件을 確立하기 爲하여 ABA 標準品(2 μg ABA) 및 植物體 抽出精製試料(2 μg ABA) 를 各各 5 ml 의 acetone에 溶解시켜 0.3 ml 의 PFB acetone 溶液과 30% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 1滴을 加하여 反應時間別로 ABA-PFB ester 化 程度를 GLC-ECD 로 測定

한 結果 Fig. 2 와 같이 ABA 標準品은 30分間의 反應으로 ester 化가 終了되었으나 植物體 抽出精製試料은 4 時間이 所要되었다.

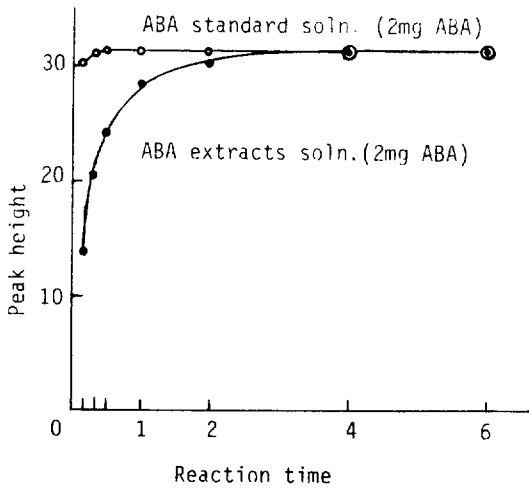


Fig. 2. ABA-PFB esterification degrees on reaction time (reaction temp. 25°C)

이와같이 植物抽出精製品의 ABA-PFB ester 化가 標準品에 比하여 늦어지는 것은 植物體 抽出精製品中에

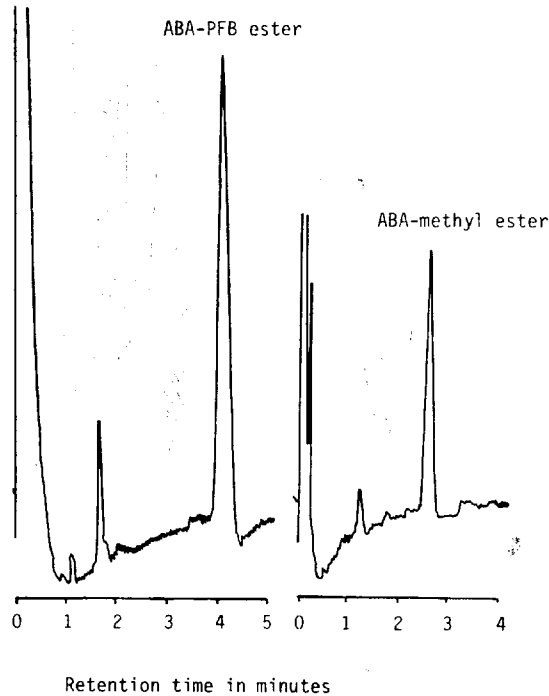


Fig. 3. GLC chromatogram of ABA derivatives obtained from ABA standard. Injected 1.0 ml of 1 ppm ABA-PFB ester and 50 ppm ABA methyl ester.

ABA 外 PFB 와 反應하여 ester 化合物로 形成될 수 있는 有機酸이 含有되어 이들 物質이 ABA-PFB ester 를 妨害하거나 혹은 이들 物質이 ABA 에 優先하여 ester 化되기 때문으로 생각된다.

ABA-PFB ester 의 GLC-ECD 分析時 retention time 은 Fig. 3 과 같이 1.5% OV-17 과 1.95% OV-210 의 mixed liquid phase 를 使用한 때에 4.1 分으로서 ABA-methyl ester 의 2.2 分에 比하여 늦어지는 傾向이었다.

이와같이 ABA-PFB ester가 methyl ester 誘導體보다 retention time이 늦어지는 것은 Fig. 4 와 같이 分子量이 methyl ester보다 높기 때문에 liquid phase 上에서 移動이 遲延되는데 基因되는 것으로 본다.

植物體 抽出精製試料의 各 ABA 誘導體의 GLC-ECD Chromatogram은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 많은 peak 가 나타났으나 各 ABA 誘導體의 分離는 良好하였으며, 供試한 各 種子中의 內生 ABA 含量을 誘導體別로 比

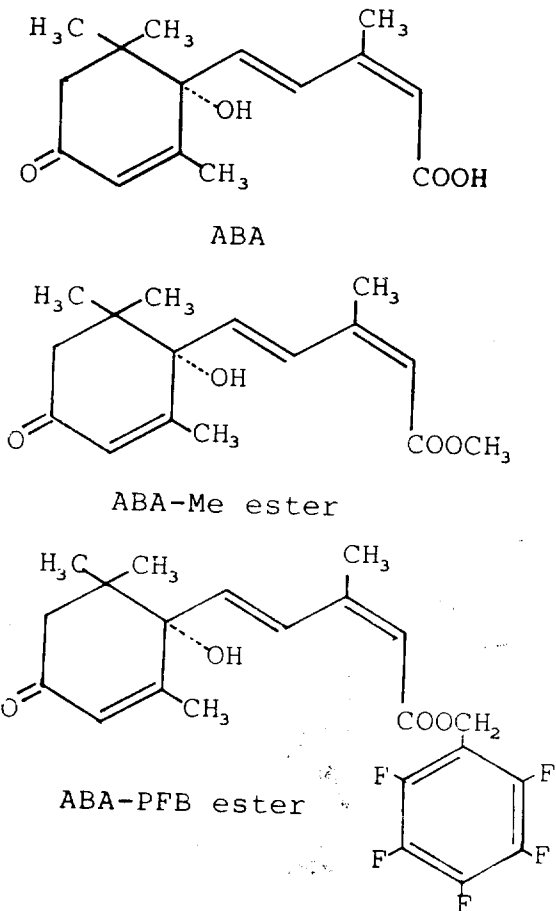
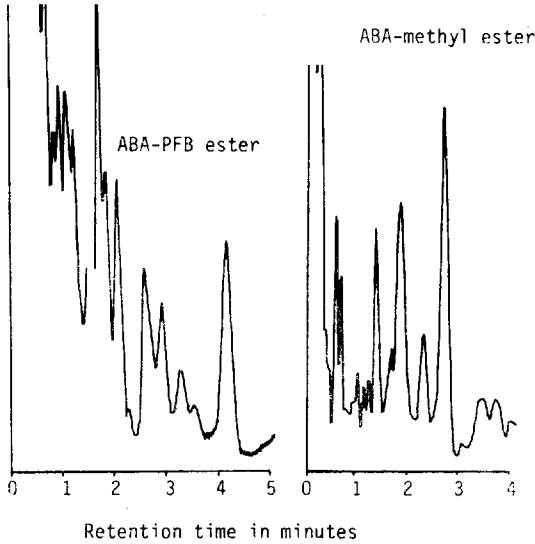


Fig. 4. Structures of ABA derivatives obtained from the reaction of BF<sub>3</sub>-methanol and PFB Br with ABA standard

較하던 Table 2와 같이 비슷한 傾向이었으나 ABA-PFB ester가 多少 높았다.



**Fig. 5. GLC chromatograms of ABA derivatives obtained from mung bean seed extract**  
 ABA-PFB ester and ABA-methyl ester obtained from 20 gr mung bean seed were diluted 20×10 ml and 1ml of hexane injected 2.5 ml and 2.0 ml, respectively.

**Table 2. Endogenous ABA content in mung bean seed**

Compounds	ABA content in ppm
ABA-PFB ester	1.66
ABA-methyl ester	1.53

다음 각 ABA 誘導體의 GLC-ECD 分析의 最少 測定 限界를 보면 Table 3과 같이 ABA-methyl ester 化에 ABA 測定限界량은 150 pg인데 對하여 ABA-PFB ester 化는 5 pg 까지 測定이 可能하였다.

이와같이 ABA의 methyl ester보다 PFB ester 化에 依한 GLC-ECD 測定限界가 낮은 것은 ECD에 對한 感度가 methyl radical보다 halogen이 敏感하게 感知<sup>(5,6)</sup>되기 때문에 推測된다.

**Table 3. Hypothetical quantification of ABA using GLC**

	ABA-Me ester	ABA-PFB ester
Injection volume	2 ml	2 ml
Detection limit*	150 pg	5 pg
Linearity	150 pg-100 ng	5 pg-0.8 ng

\*The signal to noise ratio was always greater than 5.

要 約

植物體內 ABA의 微量分析法 開發을 爲하여 試驗한 結果 植物體의 ABA 抽出物을 pentafluorobenzyl bromide 로 ester 化시켜 ABA-PFB ester 形態로 GLC-ECD 分析하므로써 ABA-methyl ester 보다 높은 感度를 보여 5 pg의 ABA 까지 測定이 可能하였다.

參 考 文 獻

1. Lenton, J. R., Bowen, M. R. and Saunders, P. F. (1968) : Detection of abscisic acid in the xylem sap of willow (*Salix viminalis* L.) by gas-liquid chromatography, *Nature* **220**, 86.
2. 鄭永浩, 中村拓, 太田保夫 (1980) : イネ의 光化學オキシダント障害に 關する 生化學的 研究, 日作紀, **49**, 456.
3. Dedis, W. and Zalik, S. (1966) : Gas chromatography of indole auxins, *Anal. Biochem.*, **16**, 36.
4. Davis, L. A., Heinz, D. E. and Adicott, F. T. (1968) : Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of abscisic acid and other plant hormones, *Plant Physiol.*, **43**, 1389.
5. Cochrane, W. P. (1979) : Application of chemical derivatization techniques for pesticide analysis, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 124.
6. Brenner, M. L. (1981) : Modern methods for plant growth substance analysis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 511.