

바르비트릭산 완충액에 의한 니코틴 알카로이드의 비색 정량.

김 신 일 · 김 찬 호

한국연초연구소

(1980. 10. 접수)

Spectrometric determination of Nicotine alkaloid with barbituric acid buffer

Sin-II Kim and Chan-Ho Kim

Korea Tobacco Research Institute

(Received Oct. 1980)

초 록

바르비트릭산 완충용액을 반응시약으로 사용하여 일담배종의 니코틴을 정량하였다. 니코틴과 바르비트릭산 완충용액이 반응하여 생성된 생성물의 흡수 극대파장은 505nm였으며 pH4.2에서 15분간 흡수 분광도의 값은 안정하였다.

흡수 분광도 값은 니코틴 농도 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 로부터 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 Lambert-Beer의 법칙을 잘 따랐다. 일담배에 대해서 Griffith방법과 이 방법에 따라 분석한 결과 Griffith방법에 대하여 최대편차 2.1% 범위에서 두 값은 일치하였으며 자동 분석기에 의한 분석결과는 두 값의 최대편차 2.8% 내에서 일치하였다.

ABSTRACT

The spectrophotometric determination of nicotine content with barbituric acid buffer solution was carry out.

Absorption maximum for the proposed solution appeared at 505 nm and the absorbance remained stable for 15 minute at pH 4.2.

Lambert-Beer law was proved to be applicable in the range of nicotine concentration of $7.5\mu\text{g} \sim 25\mu\text{g}/\text{ml}$.

According to the analysis of nicotine contents in Burley and Flue-cured tobacco leaves by this method, the relative deviation was obtained to be 2.8% in comparision with the Griffith method.

서 론

담배중의 총알카로이드를 수증기로서 증류하고 자외흡수분광도법에 의하여 정량분석(3) 하는 방법을 CORESTA의 분석방법으로 채택하고 있다. 이 방법이 개발된 뒤에도 가장 짧은 시간에 많은 시료를 분석하고자 연구한 보고(6, 1, 4)들이 있다.

W.R.HARVEY(6)는 니코틴의 피리딘고리를 브롬화시안(Cyanogen bromide)로 개환시키고 아닐린을 발색시약으로 반응시켜서 가시부인460nm에서 흡수분광도를 측정하였으며, 이어서 결합제(Coupling agent)를 sodium sulfanilate(1), sulfanilic acid(4), 4, 4'-diaminostilbene-2, 2'-disulfonic acid(2,5)을 반응시켜서 460-490nm에서 흡수분광도를 측정하였다.

Griffith(3)가 담배의 수증기증류물을 자외부에서 관측하여 총알카로이드를 분석하였던 것에 비하여 이러한 위의 연구들은 차츰 가시부에서 관측하고자 하였다.

그러나 이를 방법에 의한 시험용액은 색상의 안정도가 불안정하여 시간에 따라 흡수분광도의 값이 낮아지는 현상을 보였다.

이중 몇가지 방법(1, 4, 6)은 Technicon Autoanalyzer을 사용하여 니코틴을 자동분석하였다기 때문에 발색이후 계측시간이 일정하여서 색상의 안정도에 크게 영향을 받았다고 볼수없지만 실험실에서 일반적으로 사용하고 있는 흡수분광계로서 관측할때는 시험용액의 퇴색현상때문에 관측시간에 상당한 주의를 요하게 된다.

이 연구에서는 O.Pelletier와 Campbell이 니코틴아마이드를 분석할때 사용한 바르비트릭산(7)을 니코틴의 반응시약으로 하여서, 시험용액의 흡수극대 파장을 가시부에서 측정하고 색상의 안정도를 보다 더욱 지속시켜서 담배중의 니코틴함량을 보다 재현성과 정확한 측정을 하였다.

나아가서 Technicon Autoanalyzer를 사용하여 짧은 시간에 많은 시료를 분석할 수 있도록 Automatic system을 함께 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

a. 시약

Barbituric acid buffer시약 : Barbituric acid(TOKYO KASEI GR.) 1g와 sodium diethyl barbiturate(TOKYO KASEI GR.) 1g를 함께 물에 용해시키고 잘 저어서 수용액을 조제하여 걸려서 용액을 사용하였다.

Gyanogen bromide : Cyanogen bromide (WA KO, EP) 2g을 100ml의 물에 용해시켜 2%가 되도록 조제한 다음 냉장고에 보관하였다가 사용할때 실온에서 30분 이상 두었다가 사용하였다.

Borax시약 : Sodium borate decahydrate (KANTO GR.) 3.814g을 물에 용해시켜서 0.01M로 조제하여 사용하였다.

Activated carbon : Darco G-60 (Atlas)을 분말 그대로 사용하였다.

추출액 : Acetic acid(WAKO, EP)을 물에 끓여서 2%가 되도록 하여 사용하였다. Auto-analyzer에 의하여 조작을 할때에는 이를 조제된 시약 1ℓ에 Brij-35를 0.5ml를 첨가하여 사용한다.

Nicotine 표준용액은 Merk특급 시약 1g을 정확히 취하고 추출액으로 사용한 2%아세트산으로 정확히 1ℓ로 조제하고 stock solution으로 하였으며 실제조작에 사용한 working standard solution은 stock solution을 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml, 12.5ml를 정확히 취하여 50ml눈금 후라스크에 넣고 activated carbon 분말 0.35g을 넣은 다음 2%아세트산으로 눈금을 마추었다.

이렇게 조제한 표준시약 용액을 진탕기(shaking machine)에서 20분간 진탕한 뒤 거름종이로 걸렀다. 이 용액은 니코틴50μg/ml, 100μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml, 250μg/ml에 해당된다.

b. 장비

Spectrophotometer : Cary 17D
Technicon Autoanalyzer

c. 조 작

i) 흡수분광도법

시료 0.5~1.5g을 정확히 취하여 100ml 눈금 후 라스크에 넣고 activated carbon 0.7g을 넣은 다음 2%아세트산으로 표선까지 마주고 진탕기로 20분간 진탕한 다음 거름종이로 거른다. 거른액을 2%아세트산용액, working standard solution을 각각 2ml씩 취하여 25ml시험판에 넣고 borax 용액 10ml, bromocyanide용액 1:1씩 각각 넣고 진탕후 정확히 30분간 방치한다.

바르비트릭산 완충용액 7ml씩 가하고 진탕후 다시 15분간 방치후 2%acetic acid 용액을 대조하여 505nm에서 흡광도를 측정한다.

따로 working standard solution의 흡광도로 검량선을 작성한다.

$$\text{니코틴} (\%) = \frac{\text{검량선에서 구한 니코틴의 } \mu\text{g}}{\text{시료의 무게 (g)}} \times 5$$

ii) Autoanalyzer 법에 의한 조작.

Autoanalyzer의 시약공급 tube을 Brij-35로 0.5ml/1000ml를 넣은 뒤로서 proportioning pump를 작동시켜 충분히 셋는다.

30분이상 시간간격을 두었다가 Fig. 5에서와 같이 조제한 cyanogen bromide용액을 먼저 pump로 흡입시키고 sampler에 놓은 시료용액과 니코틴의 표준용액을 차례대로 배열한다.

이때의 시료용액은 흡수분광도법에서와 같이 아세트산으로 추출하고 진탕기로 진탕을 시킨뒤에 거른용액을 sampling holder에 적당량을 취한다.

시료와 비색계 그리고 레코더를 작동시키고 약 20분뒤에 조제한 sodium borate, barbituric acid buffer 용액을 pump를 작동시켜서 시약공급 tube로 흡입시킨다.

기록지에는 시료용액과 표준용액의 배열순서와 같이 흡수파장 505nm에서 기록되며 표준용액의 흡수분광도로서 그런 검량선에 의해 시료용액중의 니코틴의 값을 흡수 분광도법에서와 같은 방법으로 계산하여 구한다.

측정이 끝나면 시약공급 tube를 탈염수로서

충분히 셋어둔다.

결과 및 고찰

니코틴을 바르비트릭산으로 발색시켜 흡수분광도를 측정하면 그림 1과 같이 흡수 극대파장이 505nm에서 관찰되었다.

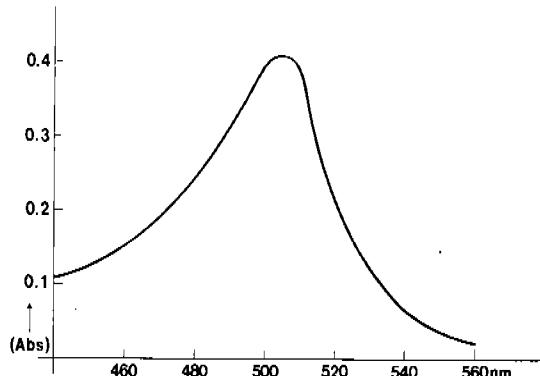


Fig. 1. Absorption spectrum of nicotine after it reacts with barbituric acid and cyanogen bromide.

Aniline과 sulfanilic acid를 nicotine과 반응시켰을 때는 흡수분광도의 극대값이 다같이 460nm (1, 4)였으며, 4, 4'-diaminostilbene-2, 2'-disulfonic acid를 반응시켰을 때는 그 값이 490nm (5, 2)였었는데, barbituric acid를 반응시

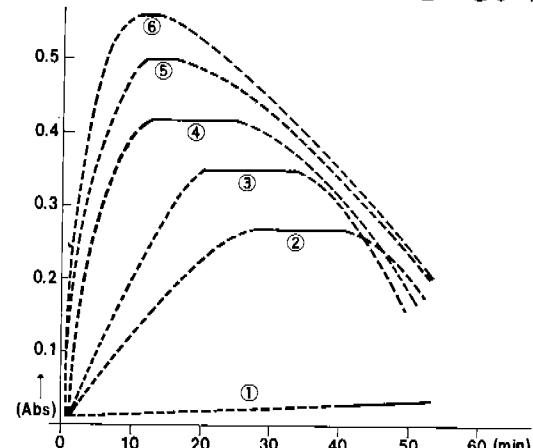


Fig. 2. The effect of PH and measuring time on the absorbance of nicotine solution with barbituric acid at $\lambda_{\text{max}}=505\text{nm}$.

① PH6.2

② PH5.0

③ PH4.6

④ PH4.2

⑤ PH3.2

⑥ PH3.0

쳤을때는 그림 1에서와 같이 흡수분광도의 극대파장은 505nm 였다.

즉 정시료 용액이 PH값에 따라 받는 영향과 시료용액 색상이 관측시간에 따라 퇴색하는 정도를 보고자 시료용액에서 PH를 변화시키고 발색이후의 일정 시간별로 흡수분광도를 측정하여서, 측정시간별로 흡수 분광도의 값을 그린 결과 Fig. 2 와 같이 나타났다.

Fig. 2에서 보면 PH의 값이 낮을수록 흡수분광도의 값이 커져서 PH3.0에서는 최대값이 0.6에 가까웠으나 PH6.2에서는 최대값으로 0.1 이하를 보였다. 그러나 관측시간을 함께 고려하면 PH가 낮을수록 흡수분광도의 값이 불안정하여 관측시간에 따라 퇴색하는 현상이 두드러진다는 것을 그림 2에서 볼수 있었다.

PH4.2에서는 발색시약을 가하여 약10분이 지나면서 약15분간은 흡수분광도의 값이 안정하였으며 시간이 더 지나면 시료용액색상의 안정도와 흡수분광도의 값이 흔들림을 함께 고려하면 PH조건이 PH4.2가 관측하기에 가장 적당하다고 보여졌다.

니코틴 표준용액으로 흡수 극대파장 505nm에서 흡수분광도를 측정하여 니코틴 함량과 흡수

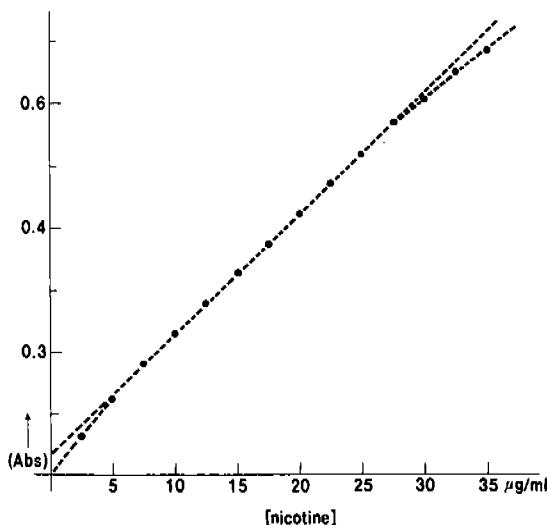


Fig. 3. Absorbance change of the reacted solution at 505nm as a function of nicotine concentration at pH4.2

분광도의 값으로 점량선을 작성한 결과는 그림3과 같았다.

이 시료용액은 바르비트릭산과 그 sodium 염 완충용액을 사용하였으며 이때의 PH는 4.2였다. 니코틴함량 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 Lambert - Beer의 법칙을 잘 따라주었으며 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하와 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상은 측정된 값이 점량선에서 점차로 벗어났다.

이 방법에 의해 니코틴을 분석할때 분석값에 미치는 영향을 보기 위하여 니코틴과 분자 구조가 비슷한 nicotinic acid, nicotinamide에 대하여 같은 조작을 하고 흡수분광도를 측정한 결과 그림 4와 같았다.

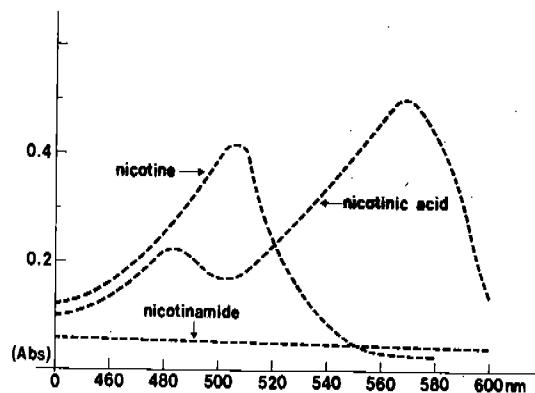


Fig. 4. Absorption spectra of nicotine, nicotinic acid and nicotinamide after reacting with barbituric acid.

이들의 흡수 극대파장은 nicotinic acid가 480-490nm와 560-570nm, nicotinamide는 420-600nm에서는 흡수 극대점이 나타나지 않았는데 nicotinic acid의 흡수 극대파장이 nicotine의 505nm와는 큰 차이가 있어서 이들의 영향은 작을 것으로 보인다.

그리고 담배에 있어서 nicotinic acid와 nicotinamide의 양은 nicotine량에 비하여 적기 때문에 nicotine함량에 미치는 오차 수준은 우려할 정도가 아님을 짐작할 수 있다.

바르비트릭산 완충액으로서 nicotine과 반응시킬 때 담배내의 다른 성분이 이를에게 미칠 영향을 보기 위하여 담배 시료에 일정량의 nicotine

Table 1. Recovery of Nicotine in the Sample and Nicotine Mixture.

Samples	Nicotine Contents (mg)			Error (mg)
	Leaf only	Added	Found	
Burley	1	1.65	1.65	-0.04
	A		2.61	-0.04
	B	2.00	3.57	-0.08
Burley	2	3.12	3.12	
	C		4.08	-0.04
	D	2.00	5.07	-0.05
	E	3.00	6.09	-0.03
Flue-Cured	1	2.56	2.56	
	F		3.54	-0.02
	G	2.00	4.56	0
	H	3.00	5.52	-0.04
Flue-Cured	2	3.20	3.20	
	I		4.14	-0.06
	J	2.00	5.15	-0.05
	K	3.00	6.19	-0.01

을 첨가하여 첨가된 nicotine의 양에 미치는 영향을 보고자한 결과 표1과 같았다. 표 1에서 첨가한 표준물질 nicotine의 양은 대체로 (-)의 오차를 보였으나 담배종의 nicotine의 함량 2.65% - 6.20%까지 오차범위 0 ~ 0.08mg였다.

오자는 담배종의 어떤 성분이 nicotine - 바르비트릭산과의 반응에 역반응 요인으로 영향을 주고 있을것으로 생각되지만 미치는 양의 크기가 0.06mg이내였기 때문에 이 방법에 의한 분석값

Table 2. Assay of Nicotine Alkaloids in Burley and Flue-cured Leaf by the Proposed and Griffith Method.

Samples	Griffith Method	Proposed Method	Error (%)
A	1.32	1.32	0
B	3.27	3.20	-0.07
C	6.15	6.08	-0.07
D	3.22	3.24	+0.02
E	0.55	0.56	+0.01
F	5.35	5.24	-0.11
G	3.44	3.50	+0.06
H	2.30	2.26	-0.04
I	2.80	2.85	+0.05
J	4.22	4.12	-0.10
K	2.56	2.56	0
L	3.28	3.20	-0.08
Mean -0.03			

* Sample A-H : Burley tobacco leaves.

** Sample H-L : Flue-cured tobacco leaves.

Table 3. Assay of Nicotine Alkaloids in Burley and Flue-cured Tobacco Leaves by the Proposed Autoanalyzer Method and Griffith Method.

Samples	Griffith method	Proposed auto analyzer method	Relative Error (%)
A	3.27	3.28	+0.3
B	6.15	6.20	+0.8
C	3.22	3.20	-0.6
D	5.35	5.40	+0.9
E	3.44	3.52	+2.3
F	2.30	2.30	0
G	2.80	2.86	+2.8
H	4.22	4.30	+1.9
I	2.56	2.60	+1.5
J	3.28	3.25	-0.6

* Sample A-E : Burley tobacco leaves.

** Sample F-J : Flue-cured tobacco leaves

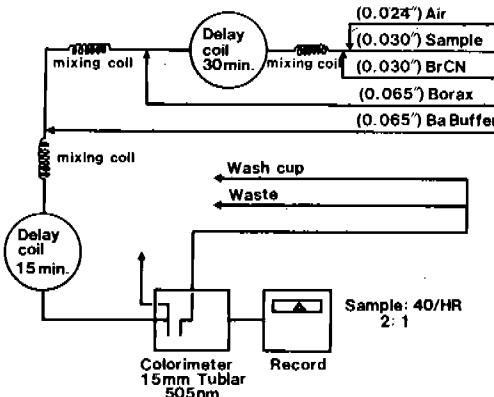


Fig. 5. Auto analyzer Diagram.

의 안정성은 높다고 보아진다.

CORESTA standard method로 채택하고 있는 Griffith method와 이 방법을 비교하고자 일담배 시료를 분석한 결과는 표 2와 같았다.

Griffith method(1)와 이 방법을 적용했을 때의 분석값의 오차는 0~0.11%이었다. 이 방법을 적용한 조작은 Technicon Auto-analyzer에서 행하였으며 그림 5와 같다.

이 방법을 이용하여 일담배 시료를 자동 분석한 값과 Griffith method에 의한 분석값을 비교하면 표 3과 같았다. 이 방법에 따라 Auto-analyzer를 이용한 분석값은 Griffith method에 의한 분석값에 비하여 +의 오차를 보였으며 상대오차 ±2.8%에서 두 방법의 분석값은 재현성이 있었다.

Reference

1. P. E. Collins, N. M. Sarji and J. F. Williams, Tob. Sci., 13 : 79 (1969).
2. J. Fuentes-Duchemin, E. Casassas, Anal. Chem. acta., 44, 462 - 466 (1969).
3. R. B. Griffith, Tob. Sci., 1 : 130 (1957).
4. W. R. Harvey, P. G. Baker and B. M. Handy, Tob. Sci., XX; 143 (1976).
5. W. R. Harvey and A. M. Palmer, Tob. Sci., XV; 29 (1971).
6. W. R. Harvey, H. M. Stahr and W. C. Smith, Tob. Sci., XIII : 13 (1969).
7. Q. Pelletier and J. A. Campbell, J. Pharm. Sci., Vol 50, No. 11, 926 (1961).