

Gas chromatography - Thermal Energy Analyzer 에 의한 휘발성 니트로소아민과 담배 특유의 니트로소아민들의 동시 분석연구

이문수, 지상운, 박영수
한국인삼연초연구원

Studies on the Simultaneous Determination of VNA and TSNA by GC - TEA

Rhee, M. S., Ji, S. W. and Park, Y. S.
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

ABSTRACT : This is to investigate the methodology for the simultaneous determination of VNA, NVNA and TSNA using gas chromatography(GC) in combination with chemiluminescence detector, thermal energy analyzer(TEA). The simultaneous analysis has been estimated by evaluating tobacco.

The TEA was linked to GC equipped with non - polar SPB - 5 fused silica capillary column which was introduced into the ceramic pyrolysis tube by the point of 16cm from the end of TEA. Quantification was carried out by internal standardization with NDPA after calibration of retention times and response factors with authentic nitrosoamines. It was demonstrated that NDPA was most preferable as internal standard for the simultaneous analysis. The recoveries of the internal standard were in the range of 83~96%. Nitrosoamines in this method were detected with determination limit of 0.1ng and was made by a straight line in calibration curve by TEA response.

The suitability of nitrosoamines extraction in tobacco leaf was investigated. It was most suitable to extract nitrosoamines from tobacco leaves with 0.01M NaOH within a period of 8 hours. Thimerosal as an antibacterial agent was added to NaOH solution to prevent artifactual formation. The fractionation and the purification of nitrosoamines from alkaline extracts were conveniently performed using Extrelut multilayer column and dichloromethane. Reproducible and reliable results were obtained for the determination of nitrosamines in a relatively short time compared to previous known method. TSNA contents in burley were about 4 times higher as those in the fluecured tobacco.

서 론

자연계에서 N-니트로소아민이 알려진 것은 백여년 전 일이지만²⁴⁾ 심도 있는 연구는 1950년대 이후이다. 당시는 주로 식품과 환경오염 물질로부터 각종 니트로소아민을 확인하는 정도이고 정량적 개념은 없었다. 현재 니트로소아민에 대한

우리의 관심은 니트로소아민을 함유한 생활공간에 노출되어 있는 실정이고 PPb 수준의 니트로소아민의 존재하에서도 심각한 생태학적 영향이²²⁾ 나타날 수 있기 때문에 자신의 보호와 안정한 생활 환경을 위해서는 니트로소아민에 대한 분석기술의 발전이 선행되어야 한다는 것이다.

니트로소아민의 분석연구는 식품에서 비롯되었

으며²⁷⁾ 담배, 화장품, 농약, 고무제품, 약품 등으로 확장되었고 생체내에서의 생합성 현상에¹⁷⁾ 이르기까지 다양하게 연구되고 있다. 니트로소아민은 물리 화학적 특성에 따라 휘발성 니트로소아민 (volatile nitrosoamine, VNA), 비휘발성 니트로소아민 (non-volatile nitrosoamine, NVNA), 담배 특유의 니트로소아민 (tobacco specific nitrosoamine, TSNA)으로 분류한다. VNA와 NVNA는 크게 분자량으로 구별하고²⁸⁾, 휘발성 및 증기압의 차이 그리고 극성에 따라서 분석방법이 달라져야 한다.

현재까지 니트로소아민의 감지기로는 화학발광을 이용한 thermal energy analyzer (TEA)가 가장 광범위하게 사용되는데 니트로소아민에 대한 선택성과 감지감도가 다른 감지기에 비하여 월등하기 때문이다²¹⁾.

담배와 담배연기로 부터 니트로소아민을 분석한 것은 Georg Neurath⁷⁾가 처음인데 그 후 많은 연구가 이루어졌으며, 특히 미국의 Hoffmann 등⁸⁾에 의하여 크게 발전하였다. 잎담배의 TSNA중 N-nitrosornicotine (NNN)을 분석한 Drukey 등⁹⁾은 잎담배가 연소되는 과정에서 NNN이 생성되며 그 전구물질은 니코틴과 노르니코틴 이라고 하였다. 그 후 니트로소아민의 분석은 얇은 막 크로마토그래피 (TLC)를 이용하였고²⁵⁾, Kroll¹⁹⁾는 TLC와 GC 방법으로 N-nitrosodibutylamine (NDBA)과 N-nitrosopiperidine (NPIP)를, Roades²⁶⁾는 GC로 N-nitrosodimethylamine (NDMA)과 N-nitrosopyrrolidine (NPYR)를 각각 분리 정량하였으며, McCormic 등²¹⁾은 GC-MS로 담배 연기중에서 8종의 VNA를 분석한 바 있다. 이러한 분석방법에서 발생하는 분석상의 또다른 문제는 분석과정중에 생성되는 artifact인데 이는 니트로소아민 분석값에 양성오차를 유발한다. 그리고 분리관의 선정인데 종래에는 대부분 충전칼럼을 사용하였으나 최근 모세관 칼럼의 사용이 점차 확대되고 있고 GC와 TEA의 연결방법에 따라서도 분석값에 영향을 주고 있다. 또한 VNA와 TSNA를 동시 분석할 수 있는 칼럼을 선정하기가 어렵다는 점등이 GC-TEA 시스템에서 크게 단점으로 지적되고 있다.

이러한 점을 극복하기 위하여 이 연구에서는 TEA 열 분해관의 온도, 분리관의 연결 등 니트

로소아민 분석에 미치는 영향을 검토하였으며 정량분석에서 일반적으로 이용하는 내부표준 물질의 선정과 모세관 칼럼의 선택에 대하여 연구하였다. 그리고 잎담배 시료로 부터 니트로소아민의 추출 및 정제에 대한 안정한 방법을 확정하고 칼럼의 분리능을 향상시켜 VNA, NVNA를 동시 분석하고 분석과정의 단순화와 실용화를 연구하였다.

실험 및 방법

1. 시 약

VNA와 NVNA의 표준물질은 Sigma사(미국) 제품으로 98% 이상의 것을, 그리고 담배 특유의 니트로소아민 표준물질은 Chemsyn Science Laboratories사(미국) 제품으로 N-nitrosornicotine (NNN)은 96% 이상, N-nitrosoanabscine (NAB) 83%, N-nitrosoanatabine (NAT) 84% [4-(methylnitrosoamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone] (NNK) 80% 이상의 것을 각각 구입하여 사용하였다. 기타 시약 들인 amino methyl pyridine과 n-amylobromide 그리고 aluminum oxide (activated III-III, basic form)는 Janssen chimica 사(벨기에) 것을 사용하였다. Extrelut 3 (Kieselguhr)와 Thimerosal은 Merck사(독일) 제품을 사용하였고, 기타 시약은 모두 분석용 시약을 사용하였다.

2. 기기 및 장치

이 연구에서 사용한 기체 크로마토그래피와 Intergrator는 각각 Hewlett Packard사(미국)의 5890 II와 3396A이며 화학발광 검출기인 TEA는 Thermo Electron사(미국)의 502B이다.

GC와 TEA는 special reducing union을 사용하여 GC의 용융 실리카 모세관 칼럼이 TEA의 세라믹 열 분해관 안으로 16cm 들어 가도록 연결하였다. GC 분석조건은 oven 온도는 50°C에서 5분간 머문 후 10°C/min 속도로 230°C까지 승온하였고, 운반 기체는 Helium으로 압력은 15 psi로 조절하였다. 주입구의 온도는 200°C이었으며, 실험에 사용한 칼럼은 SPB-5(용융실리카 모세관칼럼, 30m × 0.53mm I.D., Supelco, 미국)이고 splitless mode에서 주입량은 1.0μl로 하였다.

TEA 실험조건은 열분해관(Ceramic tube, 길이

465mm, 외경 6.25mm, 내경 1.5mm) 온도는 475°C이었고, GC-TEA interface 온도는 275°C로 조절하였다.

산소는 의학용을 사용하여 압력을 7 psi로 조절하고 흡착 trap으로는 CTR gas stream filter를 사용하였으며 오존 반응실의 압력은 0.4mmHg로 하였다. TEA의 attenuation은 ↑32로 조절하고 cold trap은 액체질소와 에탄올을 슬러지 상태로 혼합하여 -125~-95°C의 온도를 유지하도록 하였다.

니트로소아민등 물질을 확인하기 위하여 Varian MAT 212 system(미국)의 GC-MS를 사용하였다. 시료중 질산염 분석을 위하여 이온 미터와 이온 선택성 전극은 각각 Orion사(미국)의 720A와 C/N 930700을 사용하였다.

3. 분석방법

잎담배 시료는 91년도에 생산한 황색종과 버레이종을 사용하였다. 잎담배를 엽분 및 등급에 따라 선별하여 실온에서 충분히 건조한 다음 각 초 상태로 폴리에틸렌 병에 넣어 보관하였다.

3-1. 잎담배 시료의 분석

- 알칼리 추출

잎담배 시료 5g을 250ml의 삼각 플라스크에 취하고 100ppm의 Thimerosal이 들어 있는 0.01M NaOH 100ml와 내부 표준물질 NDPA 용액 1μg을 각각 가한다. 초음파 세척기에서 20분간 추출하고 실온에서 8시간 방치하고 여과한다. 거른액 10ml을 그림 1과 같은 Extrelut 칼럼으로 처리(roading)하고 20분쯤 지나 평형이 되면 DCM 100ml로 용출한 다음 다시 DCM : MeOH(10 : 1, v/v) 100ml로 용출한다. 용출액을 무수황산 마그네슘으로 처리하여 수분을 제거하고 질소 기류하에서 1ml까지 농축하여 GC-TEA 분석용 시료로 사용하였다.

- Extrelut 컬럼

잎담배로부터 니트로소아민을 추출하여 그림 1과 같은 유리 칼럼을 사용하여 정제하였다. 이 컬럼은 260mm×18mm의 크기로 먼저 Extrelut(실리카겔, D₃ grit) 5g을 넣고 그 위에 아스코르브산 5g을, 끝으로 Extrelut 15g을 각각 채운다. 칼럼에 내용물을 채우고 진동기를 사용하여 각 칼럼의

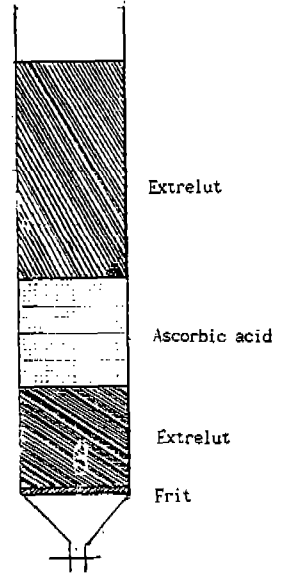


Fig. 1. Design of Extrelut column(260mm×18mm) with ascorbic acid layer for alkaline extraction procedure.

내용물이 일정하게 충전될 수 있도록 하였다.

3-2. 추출조건과 artifact 생성

잎담배 시료 5g을 각각의 250ml 삼각 플라스크에 취하고 농도가 다른 0.01, 0.1M의 NaOH 용액을 100ml씩 가한 다음 방치하여 니트로소아민을 추출한다. 추출시간이 1, 5, 24시간 경과한 다음 NaOH의 추출효과와 artifact 생성에 대하여 실험하였다. Artifact 생성은 항박테리아제인 Thimerosal의 농도가 100ppm이 되도록 첨가하여 비교하고, 내부표준물질 NDPA를 1μg씩 가하여 3-1의 방법으로 추출하여 정제한 다음 GC-TEA 분석용 시료용액으로 하였다.

4. 니트로소아민의 정량

니트로소아민을 GC-TEA로 분석할 때 니트로소아민의 각 성분은 내부 표준물질 첨가법에 따라 정량하였다. 니트로소아민의 GC-TEA 크로마토그램을 얻고 아래와 같이 니트로소아민의 함량을 계산하였다.

$$\frac{Y \text{의 봉우리 넓이}}{\text{ISTD의 봉우리 넓이}} \times \frac{Y \text{의 RF}}{\text{ISTD의 RF}}$$

Gas chromatography - Thermal Energy Analyzer에 의한 휘발성 니트로소아민과
담배 특유의 니트로소아민들의 동시 분석연구

× ISTD의 첨가량 × DF ÷ 시료량

식에서

- ISTD : 내부 표준물질 (Internal standard)
RF : 감응계수 (Response factor)
Y : 니트로소아민의 각 성분
DF : 희석계수 (Dilution factor)

결과 및 고찰

1. SPB-5 모세관 컬럼에 의한 VNA와 TSNA의 동시 분리

앞의 실험항에서 설명한 바와 같은 방법으로 VNA와 TSNA의 표준물질에 대한 GC-TEA 크로마토그램을 얻었으며 이를 그림 2에 나타내었다. 그림 2는 NAT와 NAB를 제외하고는 바탕선 분리가 가능함을 보여준다. 각 성분의 머무름 순서는 NDMA, NMEA, NDEA, NPYR, NDPA(ISTD), NPIP, NBPA, NDELA, NNK, NAB, NAT 순이었다. NDEA, NPYR 및 NDELA를 제외하면 머무름 시간이 분자량의 크기와 일치하고 있다.

그림 2에서는 VNA 7성분, NVNA의 2성분, TSNA의 4 성분을 각각 분리할 수 있음을 알 수 있고, NDMA의 머무름 시간이 1.2분, NNK의 머무름 시간이 21.0 분으로 나타나 GC 분석시간을 22분으로 단축할 수 있으며 또 만족할 만한 분리능이 나타난 것을 알 수 있다. 분석시간의 단축은 동일조건에서 일반적인 GC 즉 이온화 검출기나 질소인산 검출기 등과 비교해 보면 머무름 시간이 1.5배 정도 빠른 것이다. 이와 같은 현상은 TEA의 오존 반응기내 압력이 0.4mmHg로 낮아 컬럼에서의 저항이 감소된 탓으로 설명할 수 있다.

TEA는 대개 GC와 함께 설치되지만 종래의 니트로소아민 분석을 보면 대부분 칼럼의 길이가 2~5m의 충전칼럼을 사용하고 있으며¹⁾, 고정상으로는 통상 polyethylene glycol을 10~15% 함유한 Carbowax 20M 또는 KOH가 혼합된 극성칼럼을 사용하고 있다.

충진컬럼을 사용한 경우 칼럼의 오염가능성이 높고 크로마토그램의 봉우리가 겹치거나 비대칭 현상이 일어나며 분리능도 낮다. 10% OV-17 Chromosorb WHP(2.4m×2mm I.D.)의 충전칼럼을 사용한 Fischer 등²⁾은 NAT와 NAB에 대한 분리가 만족스럽지 않았다.

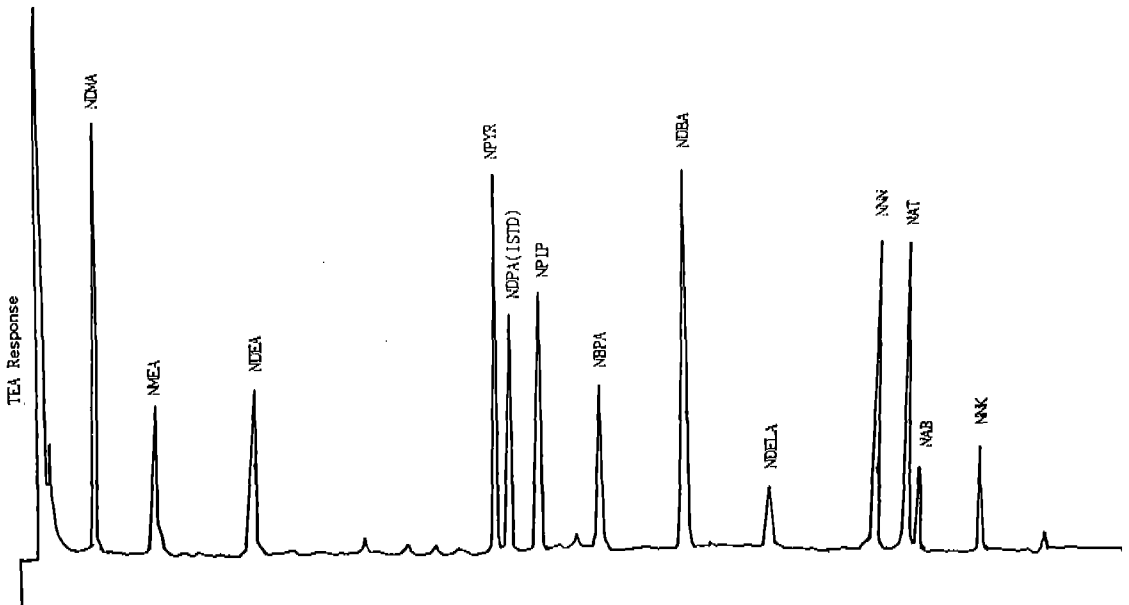


Fig. 2. GC-TEA chromatogram of standard mixture of nitrosoamines using SPB-5 fused silica capillary column.

이 연구에서 사용한 SPB-5 모세관 칼럼은 비극성이며, 이론단수(theoretical plate number)는 2444 plates/m이다. 내경이 0.53mm로 큰 편이어서 충전칼럼처럼 주입 시료량이 많은 장점이 있으며 용융 실리카 재질이어서 TEA와의 연결이 용이하다. 모세관 칼럼과 TEA 열분해관의 연결은 니트로소아민들의 바탕선의 유지와 분리에 크게 영향을 준다. 이 연구에서는 모세관 칼럼을 세라믹 열분해관 안으로 16cm 삽입시켜 승온으로 인한 바탕선의 들뜸 현상을 방지할 수 있었으며 바탕선의 분리도 최적으로 유지할 수 있었다. 이것은 모세관 칼럼에서 분리된 각 성분들의 기체가 열분해관으로 유입되었을 때 열분해관의 내경(1.5mm I.D.) 확대에 의한 순간적인 확산을 최대한 감소시키면서 니트로소아민의 열분해 조건도 아울러 만족시킬 수 있었다. 이때 TEA의 열분해관 온도는 475°C이었고, GC와 TEA interface 온도는 275°C이었다. Cold trap은 액체질소와 에탄올을 슬러지 상태로 혼합하여, -125~-95°C를 유지하였는데 이렇게 함으로써 TEA의 noise를 최소화 할 수 있었다. GC 주입구의 온도는 200°C이었는데 이 온도에서 VNA 및 TSNA의 열변성 현상은 일어나지 않았다.

1986년 Borwitzky⁴⁾의 보고 이후 GC-TEA 시스템에서 TSNA의 분석에 모세관 칼럼의 사용이

시도되었다. Brunemann²⁾ 등은 TSNA 분석에 TEA 검출기와 모세관 칼럼을 사용하였고, GC-NPD(Nitrogen Phosphorus Detector) 시스템으로 TSNA를 분석한 Anderson²⁾ 등은 DB-5, 30m×0.25mm 모세관 칼럼을, Mackown²⁰⁾ 등은 GB-5, 50m 칼럼을 각각 사용하고 있다. 그러나 NPD 검출기를 사용할 때는 시료의 주입량이 같을지라도 TEA의 경우보다 농도가 10~100배 더 커야하고 TSNA 성분의 분리도 어렵다. 이는 TEA 보다는 NPD 검출기가 니트로소 화합물에 대한 선택성이 낮고 또 감도도 떨어지기 때문이다.

GC-TEA 시스템으로 VNA와 NVNA 그리고 TSNA의 동시분석은 아직 연구된 결과가 발표되어 있지 않다.

2. TEA의 니트로소아민에 대한 감응도

칼럼을 SBP-5 모세관 칼럼으로 고정하고 TEA의 니트로소아민에 대한 감응도(response factor)를 검토하였다. 표 1은 니트로소아민이 표준물질에 대하여 TEA의 감응도를 나타낸 것이다.

표 1에서 NO/Mol은 각 니트로소아민의 분자량에 대한 니트로실 라디칼의 몰수인데 이 값은 니트로소아민에 따라 다르지만 NVNA group의 NBPA, NDBA, NDELA를 제외하면 TEA 감응이

Table 1. TEA response factor for different N-nitroso compounds

Nitroso compound	Mol., wt	NO/Mol	TEA response*
NDMA	74	0.405	0.657
NMEA	88	0.341	0.799
NDEA	102	0.294	0.929
NPYR	100	0.300	0.547
NPIP	114	0.263	0.795
NBPA	144	0.208	0.231
NDBA	158	0.189	1.157
NDELA	134	0.224	2.494
NNN	177	0.169	0.507
NAT	190	0.158	0.509
NAB	191	0.157	0.633
NNK	207	0.145	0.624

* Injection amount : 1ng.

비슷한 값을 알 수 있다. NBPA, NDBA, NDELA 등은 비휘발성이기 때문에 ISTD에 대하여 상대적으로 높은 감응 값을 보인 것이며 컬럼에서의 유출이 작아 그만큼 낮은 분리능이 나타나는 것이다. TEA의 감응도는 단위 용매량에 대한 니트로소 화합물의 양으로 표현되므로¹¹⁾ 니트로소 화합물의 종류에 따라 감응도는 달라진다. 또한 니트로소 화합물에 대한 TEA의 검출은 니트로실 자유 라디칼의 물 수에 의해 결정되고 용매의 종류 또는 니트로소아민의 열에 대한 안정성등에 따라 상대적으로 달라질 수 있을 것이다.

표 1에 보인 TEA 감응의 결과를 확인하기 위하여 각 니트로소아민의 농도에 따른 검량선을 구하고 이를 NDMA, NDPA, NNK에 대하여 그림 3에 보였다. 그림 3에서는 100~500pg까지 시료의 주입량에 대하여 감응이 직선형이며 시료간의 감응도 차이가 크지 않음을 알 수 있다. 이는 니트로소아민에 대한 TEA의 mol 감응이 일정하게 나타난 것(표 1)과 일치하는 결과라고 생각하였다.

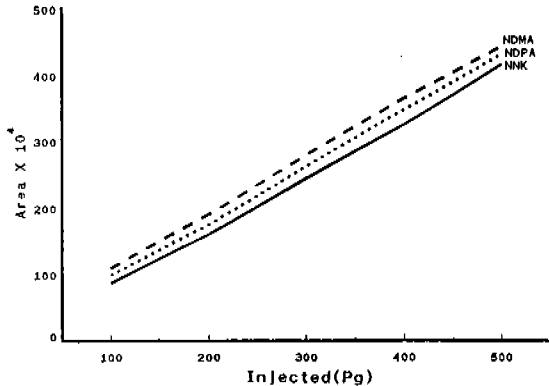


Fig. 3. Calibration for NDMA, NDPA and NNK.

3. 내부 표준물질의 선정

담배의 니트로소아민 분석을 위한 내부 표준물질로는 주로 ¹⁴C - NNN, N-nitrosophenyl-picolylamine(NPePicA)⁸⁾ 등이 사용되고 있다. 이들은 GC-TEA 시스템에서 TSNA 정량에 적합한 내부 표준물질로 인정되고 있으나, 극성 충전컬럼과 함께 사용되었고, 회수율이 75% - 83%인 것으로 알려져 있다. 이 연구에서는 NDPA와 NPePicA를 내부 표준물질로 선택하고 GC-TEA

시스템과 SBP-5 모세관 컬럼에 대하여 실험하였다.

내부 표준물질로 사용하기 위하여 NPePicA를 합성하였다. 합성품의 b.p.(120-124°C), MS 스펙트럼 등을 확인한 바 Spiegelhalter²⁹⁾ 등의 보고와 일치하였으며 순도는 90.5%이었다. 또한 NPePicA의 MS 스펙트럼에서 e/m=207은 NPePicA의 분자량이며 e/m=177은 약한 결합의 니트로실라디칼(M=30)이 떨어져 나간 토막이온으로 니트로소아민의 전형적인 조개지기를 보여주었다.

합성한 NPePicA를 내부 표준물질로 사용한 결과 SPB-5 모세관 컬럼으로 VNA와 TSNA를 동시에 분석했을 때 NNN의 분리능이 매우 낮은 단점이 나타났다. GC의 oven 온도는 2°C/min로 승온하여 바탕선의 분리는 개선할 수 있었으나 NDPA보다는 실용성이 낮았다. NDPA는 시판품을 사용할 수 있기 때문에 NPePicA와 같이 합성할 필요가 없고 순도도 98%로 양호하였다. 특히 VNA, NVNA, TSNA를 동시에 분석할 때 NDPA와 인접하여 분리되었으나 oven 온도를 10°C/min으로 programming 하여도 바탕선 분리를 유지할 수 있었다. 내부 표준물질의 회수율은 NDPA가 82.3-95.7%로서 83.4-86.2%의 NPePicA보다 양호하였다.

4. 회수율의 측정

일담배에 들어있는 니트로소아민에 대하여 내부 표준물질로 선정한 NDPA와 NPePicA를 이용하여 표준물질 첨가법에 따라 회수율을 측정하였다. 앞의 실험 및 방법에서 설명한 바와 같이 처리한 일담배 시료에 대하여 GC-TEA 및 SPB-5 모세관 컬럼으로 주요 니트로소아민의 회수율을 측정하였다. 표 2는 표준물질을 각각 100ng 첨가하고 측정된 결과를 요약한 것이다.

표 2의 완충용액과 Cambridge 필터는 담배연기를 처리한 방법이며 Extrelut는 일담배의 수용성 추출물을 처리한 컬럼이다.

표 2에 나타난 바와 같이 회수율은 82.2-95.7% 범위이며, 내부 표준물질인 NDPA는 다른 성분에 비하여 회수율은 높았고 표준편차는 낮았다. 담배연기의 포집방법에 따른 회수율을 비교해 보면 큰 차이가 없으나 NDMA의 경우 Cambridge 필터 포집의 회수율이 약 10% 낮다. 이는 NDMA의 휘발성 때문에 Cambridge 필터에 의한 완전포집이

Table 2. Recovery rates of NDMA, NDPA, NPePicA and NNN.

	Recovery rates, % (SD)		
	Buffer solution	Cambridge filter	Extrelut
NDMA	86.4(±3.5)	75.9(±5.2)	89.1(±2.5)
NDPA	85.6(±2.0)	82.3(±2.8)	95.7(±2.0)
NPePicA	86.2(±2.6)	83.4(±3.5)	86.2(±3.6)
NNN	83.2(±2.8)	85.3(±2.9)	84.5(±4.2)

불가능했던 것으로 생각되며 GC 크로마토그램으로도 확인할 수 있었다.

표 2의 두 내부 표준물질인 NDPA와 NPePicA의 회수율을 비교해 보면 담배연기에서는 비슷하지만 잎담배의 경우 NPePicA가 10% 정도 낮은 것을 볼 수 있는데 시약의 순도 구입의 용이성, 칼럼에서의 분리능 등을 함께 고려할 때 담배와 관련한 내부 표준물질로는 NDPA가 보다 적합한 것으로 판단하였다.

5. 니트로소아민의 추출에 미치는 NaOH의 농도

NaOH 수용액을 사용하여 잎담배로부터 니트로소아민을 추출하고 그 추출효과를 검토하였다. 표 3은 잎담배시료 5g에 대하여 NaOH(aq)의 농도와 추출시간에 따른 효과를 VNA와 TSNA의 양으로 나타낸 것이다. 실험이 진행되는 동안 잎담배에 공존하는 아민류와 니트로소화제($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$)가 서로 반응하여 artifact를 생성¹⁰⁾, 니트로소아민의 분석값에 영향을 주게 되므로 항박테리아 시약인 Thimerosal을 사용하여 같은 조건에서 artifact 생성 여부를 비교하였다.

표 3에서 Thimerosal을 첨가한 시료를 보면 NaOH 농도에 크게 영향을 받지 않는 것 같다. 즉, Thimerosal을 첨가한 경우 처리시간이 같은 두 시료의 니트로소아민은 거의 같은 값을 보여준다. 농도가 0.01M인 두 시료의 니트로소아민을 비교해 보면 Thimerosal 효과가 나타난다. Thimerosal을 첨가하지 않을 때 전반적으로 니트로소아민이 증가한 것은 니트로소화 반응이 일어나 artifact가 생성되었음을 보여주는 증거이다.

한편 Eisenbrand¹⁰⁾ 등은 0.01M sodium azide를 가하여 잎담배를 추출하면 artifact 생성을 차단할 수 있다고 보고한 바 있으며, Archer³⁾도 nitrate와 아미노산이 공존하는 시료를 추출할 때는 알칼리 처리가 필수적임을 지적하고 있다. 그러나 수 차의 실험을 통해 0.01M NaOH 수준에서는 artifact가 생성됨을 확인할 수 있었으며, 따라서 Thimerosal을 사용하여 artifact의 생성여부를 비교한 것인데 NaOH로 처리해도 artifact가 생성된다는 Spiegler²⁰⁾ 등 Fischer¹⁴⁾ 등의 보고와 같은 결론에 도달하였다.

표 3은 NaOH로 처리하는 시간이 길어지면 니

Table 3. N-Nitrosamines with the extraction conditions(ng/g).

Compound	0.01M NaOH			0.1M NaOH			0.01M NaOH ^a		
	1hr	5hr	24hr	1hr	5hr	24hr	1hr	5hr	24hr
NDEA	72.7	79.3	80.2	90.5	85.3	86.2	117.4	125.5	132.4
NPYR	295.5	293.2	299.4	292.2	296.8	299.1	296.7	302.1	307.8
NBPA	104.2	111.2	112.4	109.5	116.7	118.3	108.3	115.4	117.9
NNN	56.6	59.7	60.5	58.0	64.6	60.1	72.5	75.3	79.6
NNK	6.0	12.2	15.4	8.4	13.7	15.2	18.7	18.4	19.2

^a Without Thimerosal.

Gas chromatography - Thermal Energy Analyzer에 의한 휘발성 니트로소아민과
담배 특유의 니트로소아민들의 동시 분석연구

트로소아민은 증가하는 경향을 보여준다. 그러나 증가폭은 그다지 크지 않다. 특히 5시간 처리한 시료와 24시간 처리한 시료의 니트로소아민 간에는 분석값의 변화가 거의 없는 것을 알 수 있다.

6. 잎담배의 니트로소아민 분석

원료 잎담배의 대표적 품종인 황색종과 버레이종의 염중 니트로소아민을 분석하고 버레이종

(L₅)의 GC-TEA 크로마토그램에 대하여 그림 4에 보이고 그 결과는 표 4에 정리하였다.

그림 3은 VNA, NVNA, TSNA 등에 대하여 크로마토그램 상의 바탕선 분리가 가능함을 보여준다. 이는 니트로소아민의 표준물질에 대하여 GC-TEA 바탕선 분리를 보여준 이 연구의 분석 조건(그림 2)이 잎담배에 실제 적용에서도 성립하고 있음을 보여준 결과이다.

Table 4. N-Nitrosamines with leaf species(ng/cig).

	Flue-cured			Burley		
	H ₅ ^a	H ₁	L ₅	H ₅	H ₁	L ₅
NO ₃ ⁻ , %	0.18	0.14	0.09	78.1	0.63	0.53
NDEA	75.7	69.6	71.9	78.1	80.3	72.3
NPIP	172.8	157.9	165.8	187.9	198.9	145.4
NBPA	44.9	46.7	44.2	47.5	51.9	43.9
NDELA	15.5	6.7	12.9	16.5	6.7	trace
NNN	13.9	8.5	7.5	92.4	108.8	83.9
NAT	22.6	18.1	9.4	40.6	43.4	46.2
NAB	trace	trace	trace	trace	trace	trace
NNK	6.6	trace	2.6	19.9	7.1	31.0

^a Leaf grade (H : Heavy, L : Low).

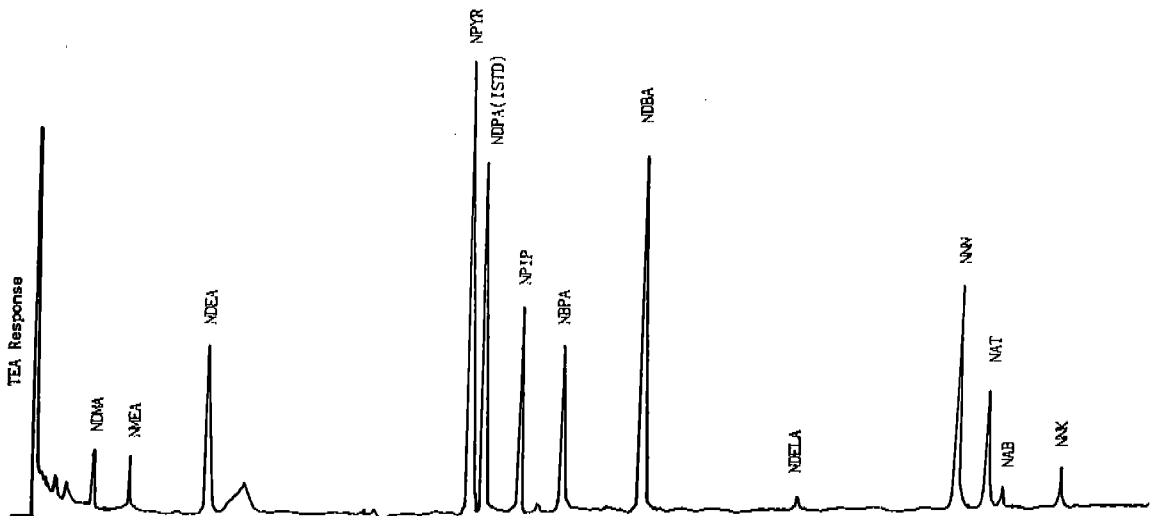


Fig. 4. GC-TEA chromatogram of VNA and TSNA in tobacco leaves.

표 4에서 두 품종의 니트로소아민을 비교할 때 VNA는 큰 차이가 없으나 TSNA는 현격한 차이를 보여주는데 버레이종이 2.5-9.5배 높은 수준이다. 등급별 니트로소아민의 크기는 두 품종 모두 $H_5 > H_1 > L_5$ 순서로 감소하여 지상에서 먼 착엽일수록 니트로소아민이 증가함을 알 수 있다. 표 4의 TSNA 분포는 nitrate 값과 무관하지 않은 것 같다. TSNA를 많이 함유하고 있는 버레이종의 nitrate가 황색종의 4.78배이며 등급별 TSNA의 크기에서도 $H_5 > H_1 > L_5$ 가 성립하고 있다. 이와 같은 엽중 nitrate 및 니트로소아민의 분포는 Brunne-mann⁵⁾ 등의 보고에서도 같은 경향인 것을 볼 수 있는데 엽중 nitrate가 잎담배의 건조, 저장과정에서 박테리아의 작용으로 nitrite로 바뀌고 생성된 nitrite에 의하여 니트로소화 반응이 일어나 니트로소아민이 생성된 것이다^{1, 2)} 잎담배의 VNA와 NVNA의 전구물질은 주로 dimethylamine, diethylamine, pyrrolidine, triethyl 등의 아민류이며, TSNA는 니코틴, 노르니코틴 등의 알칼로이드인 것으로 알려져 있다.^{6, 28)}

7. Toast에 의한 니트로소아민의 변화

담배의 제조공정에는 잎담배를 열처리하는 과정(toast)이 있는데 120~150°C의 온도로 20~30분간 가열한다. 잎담배의 암모니아, 전 알칼로이드, 유리 니코틴, 단백질 등 질소화합물은 가열하면 탄수화물과 Maillard 반응을 일으켜 피라진계 화합물을 생성한다²⁸⁾

이때 탄수화물을 첨가하는 경우가 있는데 이를 casing이라 한다. 표 5는 toast - casing 또는 casing - toast 과정에서 잎담배의 니트로소아민에 대한

양적 변화를 고찰한 것이다.

표 5는 잎담배를 toast - casing 해도 또 그 순서를 바꾸어도 잎담배의 nitrate와 니트로소아민은 처리하지 않은 경우에 비하여 크게 변치 않았음을 보여준다. 대체로 황색종은 감소하고 버레이종은 증가하는 경향을 볼 수 있다. 그러나 황색종은 toast - casing 과정에서 NNN과 NAT가 약 50% 감소하였다. 황색종의 니트로소아민 감소는 toast - casing 과정에서 일부 니트로소아민이 휘발한 것으로, 또한 버레이종의 증가추세는 열에 의한 니트로소아민 생성이 우세했던 탓으로 생각되며 특히 NNN과 NAT가 크게 감소한 것은 엽조직의 변화에 의한 결과로 보이나 이 모든 현상에 대하여는 계속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

이 연구는 휘발성 및 비휘발성 니트로소아민과 담배 특유의 니트로소아민들을 기체 크로마토그래피와 열에너지 분석기를 이용하여 동시에 분석할 수 있는 방법을 연구한 것이며 이 분석방법을 담배에 적용하여 비교하였다.

GC 칼럼은 비극성의 SPB-5 용융실리카 모세관 칼럼(30m×0.53mm ID)이며 TEA의 세라믹 열분해관 안으로 16cm 삽입하므로서 최적의 바탕선을 얻고 바탕선의 들뜸현상도 방지하였다. 이 분석 방법으로 담배종의 니트로소아민 분석에 적용하여 VNA 7종, NVNA 2종, TSNA 4종을 분리 확인할 바 머무름 시간을 22분으로 분석시간을 단축할 수 있었으며 양호한 바탕선의 분리를 얻을 수 있었다. 또한 이 방법은 GC 주입구의 온도가 200°C이기

Table 5. Level of N-nitrosamines in leaf tobacco by toasting(ng/cig).

	Flue - cured			Burley		
	Non - toast	Casing - toast	Toast - casing	Non - toast	Casing - toast	Toast - casing
Nitrate, %	0.18	0.17	0.17	0.82	0.76	0.78
NDEA	75.7	71.9	53.2	78.1	80.0	76.7
NDBA	82.4	78.7	102.8	94.6	116.3	103.4
NNN	13.4	7.5	7.2	92.4	131.2	94.5
NAT	22.6	9.4	9.9	40.6	59.4	44.5
NAK	6.6	2.6	5.8	19.9	59.4	44.5

때문에 니트로소아민의 열변성도 일어나지 않았다. 니트로소아민에 대한 이 방법의 검출 한계는 0.1ng이었으며, NDELA와 NDBA를 제외하면 각 성분의 TEA 감응도가 비슷하였다. 니트로소아민의 검량선은 주입량, 0.1~0.5ng에서 직선을 얻고 내부 표준물질 첨가법에 따라 정량하였다. 내부 표준물질이 NDPA일 때 VNA의 동시분석이 더 용이하였으며 분석시료의 종류와 전처리 방법에 따라 약간의 차이는 있었으나 회수율은 83%~96%였다.

잎담배로부터 니트로소아민의 추출은 0.01M NaOH로 8시간 처리하는 것이 가장 효과적이었다. 이 추출물에 대하여 DCM과 Extrelut 다층 칼럼을 사용하므로써 방해물질을 제거하고 VNA와 TSNA를 간편하게 정제할 수 있었으며 재현성이 높아 이 추출 방법은 그 효율성과 실용성이 액체-액체 추출법 보다 우수하였다. 이 연구에서는 항박테리아제로 Thimesosal을 사용한 바 분석과정중 생성될 수 있는 artifact의 생성을 방지할 수 있었다.

황색종과 버레이종 잎담배의 니트로소아민 분석 결과를 비교할 때 VNA에서는 특징적인 차이가 없지만 TSNA는 버레이종이 더 많고 특히 NNN이 9.5배, NNK가 2.5배로 나타났다.

참고문헌

1. Adams, J. O., P. Owens - Tucciarone and D. Hoffmann, Food Chem. Toxicol., 25, 245~246(1987).
2. Anderson R. A. and R. K. Thomas, Cancer Research, 45, 5287~5293(1985).
3. Archer, M. C., S. R. Tannenbaum, T. Y. Fan and M. Weisman, J. Natl. Cancer Inst., 54, 1203~1205(1975).
4. Borwitzky, H. Chromatographica, 22, 65~72(1986).
5. Brunne mann, K. K., L. Yu and D. Hoffmann, Cancer Research, 37, 3218~3222(1977).
6. Brunnemann, K. D., J. C. Scott and D. Hoffmann, Carcinogenesis, 3, 693~696(1982).
7. Brunnemann, K. D., L. Genoble and D. Hoffmann, Carcinogenesis, 8, 465~469(1987).
8. Brunnemann, K. D. and D. Hoffmann, 45th TCRC, Recent Advances in Tobacco Science, 17, 71~113(1991).
9. Druckrey, H. and R. Preussmann, Natur Wissen - Schaften, 49, 498~499(1962).
10. Eisenbrad, G., Archer, K. D. Brunnemann, D. Fine, S. S. Hecht, D. Hoffmannm J. Krul and K. S. Webb, Prpblems of contamination and artifact formation in nitrosamine sampling and analysis, in "Environmental carcinogens - selected methods of analysis". IARC Sci Publ., No. 45, 25~34(1983).
11. Fine. D. H., R. Ross, D. P. Roubehler, A. Silvergleid and L. Song, J. Agric. Food Chem., 24, 1069~1073(1976).
12. Hoffmann, D., M. V. Djordjevic and K. D. Brunnemann, Food Chem. Toxicol., 29, 65~68(1991).
13. Hotchkiss, J. H., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64(5), 1037~1054(1981).
14. Fischer, S., B. Spiegelhalder and R. Preussmann, Carcinogenesis, 10, 1511~1517(1989).
15. Fisher, S. and B. Spiegelhalder, Beitr. Tobakforsch., 14(3), 145~153(1989).
16. Fridman, A. L. F. M. Mukhametshin and S. S. Novikov, Russ. Chem. Rev., 40, 34~50(1971).
17. Hong, J. Y., T. Smith, M. J. Lee, W. Li, B. L. Ma, S. M. Ning, J. F. Bready, P. E. Thomas and C. S. Yang, Cancer Research, 51, 1509~1514(1991).
18. Krull, I. S. and D. H. Fine, N - Nitrosoamines and N - nitroso compounds. In "Handbook of carcinogens and hazardous substances, chemical and trace analysis", ed. M. C. Bowman, Marcel Dekker, Un., New York, 391(1982).
19. Kroller, E., Dent, Lebensm. - Rundschau, 10, 303~305(1967).
20. Mackown, C. T., D. B. Douglass, M. V. Djordjevic and L. Y. Bush, J. Agric. Food Chem., 36, 1031~1035(1988).
21. McCormick, A., M. J. Nicholson, M. A. Baylis and J. G. Underwood, Nature, 244, 237~238(1973).
22. Mirvish, S. S., Toxicol. Appl. Pharmacol., 31, 325~351(1975).

23. Neurath, G., B. Pirmann and H. Wichern, Beitr. Tabakforsch., 2, 311~319(1964).
24. Preusmann, R., National Research Council, The health effects of nitrate, nitrite and N - nitroso compounds, Part 1. National Academy press, Washington, D. C., Chapter 7, 320~359(1981).
25. Preussmann, R., D. Daiber and H. Hengy, Nature, 201, 502~503(1964).
26. Rhoades, J. W. and D. E. Johnson, Nature, 236, 307~308(1972).
27. Scanlan, R. A. and F. G. Reyes, Food Technology, 95~98(1985).
28. Schmeltz, I. and D. Hoffmann, Chem. Rev., 77, 295~311(1977).
29. Spiegelhalder, B., S. J. Kubacki and S. Fischer, Beitr. Tobakforsch., 14(3), 135~144(1989).