

Solid-Phase Extraction을 이용한 담배연기 중 Aromatic Amine의 분석

김익중* · 이준태 · 이정민 · 민혜정 · 장기철 · 김효근 · 황건중 · 민영근
KT&G 중앙연구원
(2006년 12월 1일 접수)

Analysis of Aromatic Amines in Mainstream Cigarette Smoke Using Solid-Phase Extraction

Ick-Joong Kim*, John-Tae Lee, Jeong-Min Lee, Hye-Jeong Min,
Gi-Chul Jang, Hyo-Keun Kim, Keon-Joong Hwang and Young-Keun Min
KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea
(Received December 1, 2006)

ABSTRACT : A new procedure has been developed for the quantitation of aromatic amines in mainstream cigarette smoke. Two solid-phase extraction (SPE) clean up steps, using a different retention mechanisms, are required to process the samples. The first step used a cation-exchange cartridge, followed by a second step that used a cartridge with a hydrophobic retention character. The aromatic amines eluted from the second SPE cartridge are derivatized with pentafluoropropionic anhydride. This new method have advantages over other reported techniques, being sensitive, robust, and easily automated. The detection limits were ranged from 0.12 ng/mL for 1-aminonaphthalene to 0.16 ng/mL for 3-aminobiphenyl and the recoveries were from 97 to 106 %. Compared with other reports for analysis of 2R4F reference cigarette, this method shows a close analytical data and good repeatability.

Key words : mainstream cigarette smoke, aromatic amine, SPE

담배연기는 연소과정을 거치면서 잎담배에 존재하는 많은 수의 화합물들과 함께, 열분해, 열합성 등으로 생성된 다양한 화합물들을 포함한다. 여기에는 많은 종류의 aromatic amine이 포함되어 있으며 이들 중 1-aminonaphthalene, 2-aminonaphthalene, 3-aminobiphenyl 및 4-aminobiphenyl의 4종의 화합물들은 Hoffmann's list에 포함되어 있어 많은 담배과학자들이 이들

의 함량에 관심을 가지고 있다(Rodgman *et al.*, 2003).

담배연기 중의 aromatic amine은 여러 문헌에서 언급이 되어왔고 2R4F 표준담배의 경우 그 함량은 1.7 ng ~ 15.1 ng/cig. 수준으로 알려져 왔다(Chen *et al.*, 2003). 이들을 분석하는 방법 또한 여러 문헌에서 찾아볼 수 있으며, Hoffmann과 그의 공동 연구자들은 1960년대에

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

서 1970년대에 담배연기 중의 aromatic amine을 분석하여 보고하였고(Masuda and Hoffmann, 1969; Patrianakos and Hoffmann, 1979) 이후에도 이들의 방법을 변형하여 담배연기 중의 aromatic amine의 함량을 분석한 문헌이 여러 편 발표되었다(Pieraccini *et al.*, 1992; Luceri *et al.*, 1993; Health Canada, 1999).

그러나 이들의 문헌에서 소개된 aromatic amine의 분석법은 많은 횟수의 용매추출 및 농축, Florisil column을 이용한 아민의 분리 그리고 아민기의 유도체화 등 여러 단계의 전처리과정을 거친다. 따라서 이 방법은 분석 시간이 많이 소요되고 노동력이 많이 소모될 뿐만 아니라 자동화 또한 어려운 문제점을 가지고 있다. 또한 여러 단계에 걸친 전처리는 오차유발 요인을 증가시킬 수 있고, 긴 전처리 시간으로 인해 담배연기 중에 포함된 다양한 화합물들이 변성될 위험성이 있다.

따라서 본 연구는 담배연기 중에 존재하는 aromatic amine 화합물을 분석하는데 있어서 중성이나 음이온의 방해물질을 제거하기 위한 cation exchange mechanism의 SPE cartridge와, 상대적으로 hydrophobicity가 작은 방해물질을 제거하기 위한 hydrophobic interaction mechanism의 SPE cartridge를 사용하여 간편하고도 분석시간이 단축되며, 정밀도와 정확도가 향상된 새로운 분석법을 개발하고자 수행되었다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 표준물질 중 1-aminonaphthalene, 2-aminonaphthalene, 4-aminobiphenyl은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였으며 3-aminobiphenyl은 TCI사 (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 내부표준물질로 사용된 [²H₇]2-aminonaphthalene, [²H₉]4-aminobiphenyl은 CDN Iostopes Inc. (Quebec, Canada)에서 구입하였다. Solid-phase extraction cartridge는 Waters사 (Milford, MA, USA)에서 구입하였으며, 2R4F 표준담배는 Kentucky Tobacco Research & Development Center (University

of Kentucky, Lexington, KY, USA)로부터 구입하였다. 이 외에 사용되는 시약들은 Aldrich사에서 구입하였으며, 유기용매는 모두 HPLC grade를 사용하였다.

담배 흡연

담배의 연기 중 입자상물질은 2R4F 표준담배 5개비를 자동흡연장치 (Cerulean ASM 500, UK)를 이용하여 ISO 표준흡연조건 (puff volume : 35 mL, puff frequency : 60 초, puff duration 2초)하에서 연소시켜 44 mm Cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. 모든 담배는 흡연 전에 상대습도 60 ± 3 %와 온도 22 ± 1 °C로 조절되는 조화실에서 48시간 이상 조화한 후 사용하였다.

시료 추출

담배 흡연이 끝난 후 홀더에서 Cambridge filter pad (CFP)를 꺼내어 추출용기에 담고 내부표준용액을 넣은 다음 5 % HCl 20 mL를 넣고 30분간 잘 흔들어 시료를 추출하였다. Waters Oasis MCX cartridge (6 mL, 150 mg)를 4 mL의 메탄올로 세척하고 증류수 4 mL를 이용하여 평형화시킨 다음 여기에 추출시료 5 mL를 가한 후 1 % HCl 수용액 및 메탄올 4 mL를 이용하여 세척하였다. 4 mL 5 % NH₄OH/MeOH 용액을 이용하여 시료를 용리시켜 15 mL 원심분리관에 받은 다음 0.05 N NaOH 수용액 8 mL를 가하여 회석하였다. 다시 Waters Oasis HLB cartridge (6 mL, 150 mg)를 4 mL의 메탄올로 세척하고 증류수 4 mL를 가하여 평형화시킨 후 MCX cartridge에서 용리된 시료를 모두 가하였다. 여기에 4 mL의 0.05 N NaOH 수용액과 30 % 메탄올 수용액을 가하여 세척한 다음 톨루엔 5 mL를 가하여 시료를 용리시켰다. 여기에 sodium sulfate를 적당량 가하여 수분을 제거한 후 약 1 mL를 autosampler vial로 옮긴 다음 10 µL의 trimethylamine (TMA) 용액과 4 µL pentafluoropropionic anhydride (PFPA)를 가하였다. Dry-bath를 이용하여 80 °C에서 30분간 반응시켜 aromatic amine을 유도체화 시킨 후 GC/MS

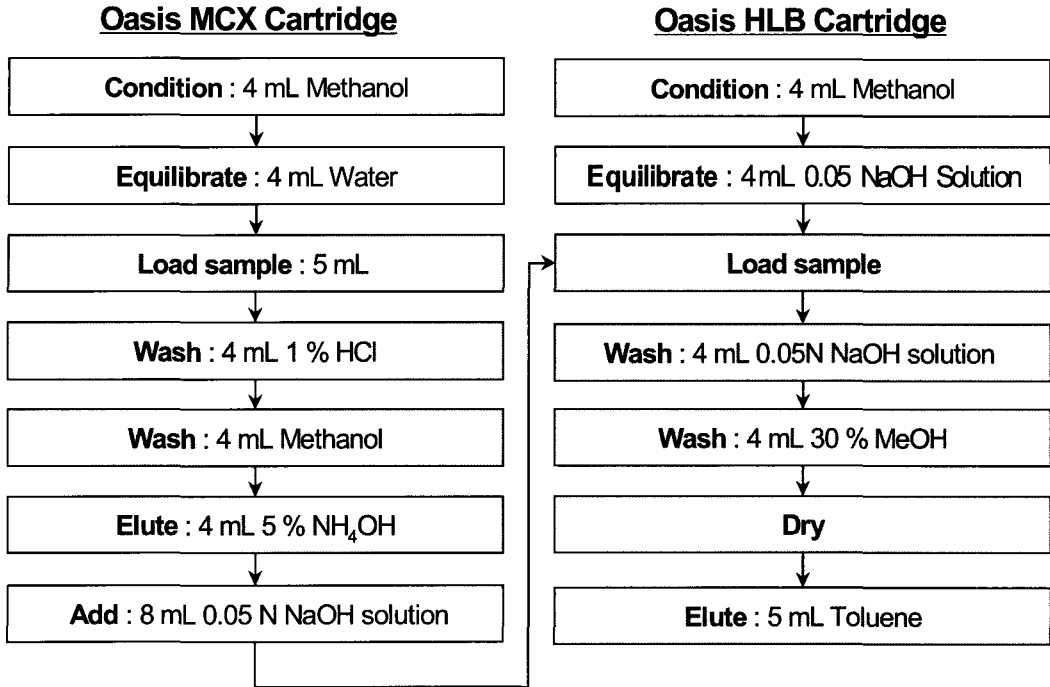


Fig. 1. Schematic flow chart of the SPE clean up procedure.

를 이용하여 분석하였다. SPE를 이용한 clean up 과정은 Fig. 1에 나타내었다.

시료 분석

준비된 시료의 분석에는 Agilent 6890/5973 GC/MS system을 이용하였고 분석 컬럼은 30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm의 film thickness 규격의 HP-5MS capillary column을 이용하였다. 오븐은 80 °C에서 1분간 멈춘 후 5 °C/min의 속도로 200 °C 까지 가열한 다음 다시 20 °C/min의 속도로 280 °C까지 가열하였다. Injector 온도는 250 °C, split ratio는 20 : 1, 유속은 1 mL/min의 조건으로 분석하였다. 질량분석은 electron impact ionization (EI) 방법으로 single ion monitoring (SIM) mode를 이용하였고 정량분석에 사용한 PFPA 유도체의 질량은 Table 1에 나타내었다. 시료의 분석은 내부표준물질과 분석물질의 peak area 비를 이용하여 외부정량법을 이용하여 정량하였다.

Table 1. Ions from the PFPA derivatives used in the SIM mass spectra acquisition in the EI mode

Aromatic amine	Quantitation ion (m/z)	Remark
[² H ₇]2-Aminonaphthalene	296	Internal standard
1-Aminonaphthalene	289	Analyte
2-Aminonaphthalene	289	Analyte
[² H ₉]4-Aminobiphenyl	324	Internal standard
3-Aminobiphenyl	315	Analyte
4-Aminobiphenyl	315	Analyte

결과 및 고찰

전처리 효율성 및 회수율 검토

본 연구에서 확립된 aromatic amine의 시료전 처리는 cation exchange mechanism을 이용하

여 산성조건에서 중성 방해물질을 제거하는 단계, 염기성 조건에서 hydrophobic interaction mechanism을 이용한 hydrophobicity가 적은 방해물질의 제거 단계 그리고 PFPA를 이용한 amine의 유도체화 등 3단계로 나눌 수 있다. 처음 두 단계의 SPE clean up 과정은 회수율 시험을 통하여 전처리 효율성을 알아보았으며 PFPA 유도체화는 반응시간에 따른 최적 반응시간을 알아보았다.

두 단계의 SPE clean up 과정은 용리액의 양이 회수율에 가장 중요한 영향을 미친다. 따라서 각 단계의 용리액인 5 % NH₄OH/MeOH과 toluene의 양을 조절해 가며 최적의 조건을 탐색하였다. 실험 결과 두 단계의 clean up 과정 모두 2 mL의 용리액이면 정량하기에 충분한 회수율을 보임을 알 수 있었다. 그러나 보다 정확한 실험을 위하여 4 mL의 용리액을 최적 조건으로 확립하였다. 세번째 단계인 PFPA 유도체화는 유도체화 시간에 따른 회수율을 조사하여 최적시간을 탐색하였다. PFPA의 반응 온도인 80 °C에서 5분부터 15분, 30분, 60분 및 90분의 다섯 조건으로 반응시간 별 회수율을 측정하였다. GC/MS 분석 결과 15분 이후부터는 aromatic amine의 peak area가 증가하지 않았으며, 따라서 15분이면 aromatic amine이 충분히 반응함을 알 수 있었다. 그러나 보다 재현성 있는 실험을 위하여 최적 반응시간을 30분으로 설정하였다.

시험 전 과정의 회수율 시험 결과는 Table 2에 나타내었다. 회수율은 포집된 입자상물질의 분석 과정과 동일한 과정으로 시험하였다. 즉, 5 % HCl 추출용액에 1-aminonaphthalene으로서

100 ng 에 해당하는 양의 표준용액을 가하고 내부표준용액을 첨가한 후 30분의 추출과정을 거쳤다. 이후 두 단계의 SPE를 거쳐 PFPA 유도체화를 시킨 다음 GC/MS를 이용하여 분석하였다.

가장 낮은 결과를 보인 3-aminobiphenyl은 97.0 %의 회수율을 보였으며, 2-aminonaphthalene이 가장 높은 105.6 %의 회수율을 보였다. 이러한 결과는 담배연기의 특성과 aromatic amine의 매우 낮은 함량을 감안할 때 매우 좋은 회수율이다. 이는 [²H₇]2-aminonaphthalene과 [²H₉]4-aminobiphenyl이 내부 표준물질로서 매우 효율적으로 사용되었으며, 전처리 과정에서 시료의 손실이 적었음을 나타내준다.

검출한계 및 정량성 검토

검출한계 및 정량성에 관한 결과는 Table 3에 나타내었다. aromatic amine은 휘발성이 적어 gas chromatography 적용을 위해서는 유도체화가 필요하다. 본 실험에서는 유도체 화합물로 PFPA를 사용하였으며, 이전에 발표된 문헌들 (Pieraccini *et al.*, 1992; Luceri *et al.*, 1993; Health Canada, 1999)보다 그 과정을 단순화 하였다. 새로운 PFPA 유도체화 반응의 정량성과 검출 한계를 aromatic amine의 표준용액을 제조하여 GC/MS분석을 통해 알아보았다. 4종의 aromatic amine의 표준용액을 0.5 ~ 30 ng/mL의 농도로 제조하여 PFPA 유도체화를 시킨 후 GC/MS로 분석하였다. GC/MS 상에 나타난 내부표준물질과 표준물질의 peak area 비를 이용하여 검량선을 작성한 결과 결정계수(R²)는

Table 2. Percent recovery for the aromatic amines using the SPE method

Aromatic amine	Recovery (%)	RSD (%)
1-Aminonaphthalene	97.4	6.0
2-Aminonaphthalene	105.6	3.4
3-Aminobiphenyl	97.0	4.6
4-Aminobiphenyl	99.6	5.4

Table 3. Limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and linearity for each aromatic amines

Aromatic amine	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R ²
1-Aminonaphthalene	0.12	0.35	0.999
2-Aminonaphthalene	0.12	0.36	0.999
3-Aminobiphenyl	0.16	0.48	0.999
4-Aminobiphenyl	0.16	0.47	0.998

0.998 이상의 높은 직선성을 나타내었으며 이들의 검출 한계도 0.12 ~ 0.16 ng/mL로 상당히 낮은 값을 보였다. 담배연기 중에 포함되어 있는 aromatic amine의 양은 수 ng/cig. 수준이므로 위의 검출한계는 담배연기에 포함되어있는 분석물질을 정량하기에 충분한 값이 될 것으로 판단된다.

분석 정밀도 검토

정밀도 시험 결과는 Table 4에 나타내었다. 정밀도는 2R4F 표준담배를 동일 조건 하에서 5회 반복 시험하여 구하였으며 relative standard deviation (RSD)으로 표현하였다. 시험 결과 1-aminonaphthalene의 RSD는 2.0 %의 값을 보였으며 가장 높은 3-aminobiphenyl도 8.8 %의 값을 나타내었다. 이러한 결과는 이미 보고된 문헌(Chen *et al.*, 2003)의 RSD 9 ~ 23 % 보다 매우 향상된 값이다. 이는 SPE를 이용함으로써 전처리 효율성이 좋아졌고 전처리 시간이 줄어들어 시료의 안정성 또한 좋아졌기 때문이라 생각된다.

Table 4. Method precision from five replicates from 2R4F cigarette

Aromatic amine	Average (ng/cig.)	SD (ng/cig.)	RSD (%)
1-Aminonaphthalene	15.15	0.30	2.0
2-Aminonaphthalene	11.37	0.42	3.7
3-Aminobiphenyl	2.92	0.20	8.8
4-Aminobiphenyl	2.37	0.14	5.9

표준담배를 이용한 정확도 비교

본 연구에서 확립된 분석방법의 정확도를 알아보기 위하여 2R4F 표준담배를 분석하여 그 함량을 문헌값과 비교하여 Table 5에 나타내었다. 최근에 Chen *et al.* (2003) 등은 공동연구를 통하여 2R4F와 1R4F 표준담배 중의 aromatic amine의 함량을 1.73 ~ 15.06 ng/cig.과 1.94 ~ 15.63 ng/cig.으로 각각 보고한 바 있으며, Rodgman *et al.* (2003)은 문헌 인용을 통하여 1R4F 표준담배 중의 aromatic amine의 함량을 연구자에 따라 4.00 ~ 10.9 ng/cig.과 2.15 ~ 16.8 ng/cig.으로 각각 보고한 바 있다.

본 연구에서 2R4F 표준담배를 분석하여 얻은 aromatic amine의 함량은 4-aminobiphenyl이 2.37 ng/cig.으로 가장 낮았으며, 1-aminonaphthalene이 15.15 ng/cig.으로 가장 높은 값을 나타내었다. 2R4F 표준담배를 분석하여 보고한 참고문헌의 값이 다소 차이가 있기는 하나 각각 일관성 있는 결과를 보이고 있으며, 본 연구에서 분석한 aromatic amine의 함량과 유사한 경향성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확립된 분석법은 담배연기 중의 aromatic amine의 분석에 신뢰성 있는 결과를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 SPE를 이용하여 담배연기 중에 함유되어있는 4종의 aromatic amine의 분석법을 확립하였다. 두 가지 다른 형태의 SPE를 사용함

Table 5. Comparison of aromatic amine amounts in ng/cig. from 2R4F and 1R4F cigarette

Aromatic amine	This work 2R4F	Chen <i>et al.</i> 2R4F	Chen <i>et al.</i> 1R4F	Rodgman <i>et al.</i> 1R4F
1-Aminonaphthalene	15.15	15.06	15.63	16.8
2-Aminonaphthalene	11.37	10.32	10.40	11.1
3-Aminobiphenyl	2.92	2.97	3.20	3.2
4-Aminobiphenyl	2.37	1.73	1.94	2.2

으로서 aromatic amine의 방해물질들을 분리하였고, 복잡한 전처리 과정도 단순화 하였다. 새롭게 확립된 분석법은 97 ~ 106 % 회수율과 0.12 ~ 0.16 ng/mL의 정량한계, RSD 2.0 ~ 8.8 %의 높은 정밀도를 보였으며, 2R4F 표준담배를 분석한 결과 문헌에 이미 발표된 값과 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 확립된 SPE를 이용한 분석법은 담배연기 중 aromatic amine의 분석에 효율적으로 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Chen, P. X. and Moldoveanu, S. C. (2003) Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F kenterky reference cigarette. *Beitr Tabakforsch. Int.* 20: 448-458.
- Health Canada (1999) Determination of 1- and 2-aminonaphthalene and 3- and 4-aminobiphenyl in mainstream tobacco smoke. Health Canada T-102.
- Luceri, F., Pieraccini, G., Moneti, G. and Dolara, P. (1993) Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air. *Toxicol. Ind. Health* 9: 405-413.
- Masuda, Y. and Hoffmann, D. (1969) Quantitative determination of 1-naphthylamine and 2-naphthylamine in cigarette smoke. *Anal. Chem.* 41: 650-652.
- Pieraccini, G., Luceri, F. and Moneti, G. (1992) New gas-chromatographic/mass spectrometric method for the quantitative analysis of primary aromatic amines in main- and side-stream cigarette smoke. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6: 406-409.
- Rodgman, A. and Green, C. R. (2003) Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke-hazard and hoopla. *Beitr Tabakforsch. Int.* 20: 481-545.
- Rodgman, A. (2003) The composition of cigarette smoke ; problems with lists of tumorigens. *Beitr Tabakforsch. Int.* 20: 403-437.
- Patrianakos, C. and Hoffmann, D. (1979) Chemical studies on tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *J. Anal. Toxicol.* 3: 150-154.