

## 전자스핀공명에 의한 담배연기 중 자유라디칼 측정

이정민\* · 이존태 · 박진원 · 황건중

KT&G 중앙연구원

(2007년 11월 16일 접수)

## Determination of Free Radicals in Mainstream Cigarette Smoke by Electron Spin Resonance

Jeong-Min Lee\*, John-Tae Lee, Jin-Won Park, Keun-Joong Hwang

KT&G Central Research Institute

(Received November 16, 2007)

**ABSTRACT** - Gas phase and particulate phase radicals in mainstream cigarette smoke were determined Electron Spin Resonance(ESR) spectroscopy. The free radicals in particulate phase have been investigated by benzene extract of Cambridge Filter Pad containing the smoke condensate. Spin trapping method in conjunction with ESR was used to investigate free radicals in the gas phase of cigarette smoke. Several analytical experiments were conducted in order to determine the optimal conditions for maximum signal intensities and reproducibility of results. All the tests were optimized and normalized using the University of Kentucky 2R4F reference cigarette. The optimal conditions were 0.6 mL for analysis volume of ESR, 4~5 mL for collection volume of spin-adducts, and PBN for quantification of free radicals in gas phase. The radical levels of Kentucky 2R4F cigarettes were found  $2.18 \times 10^{14}$  spins/cig. and  $2.10 \times 10^{15}$  spins/cig. in gas phase.

**Key words :** Free radicals, ESR, spin trapping, cigarette smoke

담배 연기는 다양한 성분들로 구성되어 있고, 이러한 성분들 중 반응성이 강한 자유라디칼도 가스상과 입자상에 약  $10^{16}$  spin 정도 포함되어 있으며, 특히 가스상에 포함되어 있는 alkoxyl( $\text{RO}^\bullet$ ) 및 carbon-centered alkyl 라디칼( $\text{R}^\bullet$ )은 수명이 5분 정도로 매우 짧은 것으로 알려져 있다(Pryor *et al.*, 1983; Church and Pryor, 1985).

가스상에 포함되어 있는 자유라디칼들의 생성 및 소멸에 대한 메카니즘은 Church와 Pryor 연구진에

의해 처음 제안되었으며, 이들은 nitric oxide에서 nitrogen dioxide로의 산화반응 후 연속하여 발생하는 alkene과 일련의 반응으로 생성된다고 설명하였다(Pryor *et al.*, 1983; Church and Pryor, 1985; Cueto and Pryor, 1994).

Takanami 등(2002)은 최근 이런 형태의 메카니즘이 발생할 수 있다는 것을 확인하였고, isoprene 이 담배 연기 중 가스상 자유라디칼 생성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 또한 입자상에 포함되

\*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(phone: 82-42-866-5389; fax: 82-42-866-5544; e-mail: jminlee@ktng.com)

어 있는 자유라디칼은 수 시간 동안 매우 안정하며, hydroquinone/semiquinone/quinone 라디칼 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다(Church and Pryor, 1985). 그러나 Blakley 등(2001)은 입자상 라디칼과 담배연기 중 hydroquinone 함량과의 상관성은 없다고 하여, 이 이론에 대한 의혹이 제기되고 있는 상황이다.

담배 연기 중 반응성이 강한 자유라디칼의 분석은 1958년 Lyons 등에 의해 시도되었으며, 이들은 전자스핀공명 기술(Electron Spin Resonance, ESR)을 이용하여 연기 응축물을 측정하고 저온에서 담배 연기를 응축하여 분석하였다. 그 후로 가스상 및 입자상 자유라디칼의 특성을 조사하기 위하여 spin trapping 방법(Buettner, 1987)과 ESR을 이용하여 직접 자유라디칼을 측정하는 방법 등에 관련된 수많은 연구들이 수행되고 있다(Bluhm *et al.*, 1971; Pryor *et al.*, 1983; Church and Pryor, 1985; Cueto and Pryor, 1994).

ESR은 자유라디칼을 측정하는 가장 민감하고 직접적인 방법이다. Spin trapping 방법은 반응성이 강하여 일시적으로 존재하는 라디칼을 안정한 spin-adduct로 만들어 이들의 공명을 측정하기 위해 필요하다. 이 방법은 주로 nitrone 또는 nitroso 화합물과 같은 반자성 분자를 첨가하여 자유라디칼과 반응시켜 ESR 측정이 가능한 안정한 상자성 spin-adduct를 생성시키는 것이다.

최근 많은 연구진들이 LC-MS/MS에 의한 자유라디칼 adduct의 검출, 정량 및 정성을 시도하였고(Domingues *et al.*, 2001), 담배 연기 중 자유라디칼 분석에 적용하였다(David *et al.*, 2002; Baum *et al.*, 2003). 그러나 ESR 또는 LC-MS/MS를 이용한 자유라디칼의 정량 분석은 spin trapping 방법의 최적화가 중요하지만 국내에서는 아직 이에 대한 연구가 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 담배 연기 중 가스상 및 입자상에 존재하는 자유라디칼을 포획하여 측정하는 방법을 최적화하고자 하였다. 즉, 안정한 입자상 자유라디칼은 CFP(Cambridge Filter Pad)에 포집한 후 벤젠으로 추출하여 ESR로 분석하고, 수명이 짧은 가스상 자유라디칼은  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butylnitron(PBN)과 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-

oxide(DMPO)를 이용하여 여러 가지 spin-trapping 조건하에서 ESR로 분석한 후 최적 조건을 설정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

Spin trap 물질은  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butylnitron(PBN)과 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO), 그리고 spin 표준물질은 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy(TEMPO)를 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 담배 시료로는 Ky2R4F 표준담배를 미국 Kentucky 대학의 Kentucky Tobacco Research & Development Center에서 구입하여 사용하였다. 모든 유기용매는 특급시약을 사용하였다.

### 담배 흡연 및 전처리

담배연기의 입자상 자유라디칼은 10개비의 담배를 자동흡연장치(Borgwaldt KC RM20H, Germany)로 ISO 흡연조건(흡연부피 : 35 mL, 흡연주기 : 60 초, 흡연시간 : 2 초)하에서 흡연하여 44 mm CFP에 포집하여 분석하였다. 가스상 자유라디칼은 동일 조건하에 3개의 임핀저에 각각 5 mL 씩 spin trap 용액(0.01 M PBN/벤젠)을 첨가하고 10°C ice/water bath에 넣고 CFP를 통과한 자유라디칼을 포집하였다. 주류연 포집 전과 후에 CFP 훌더를 분리하여 무게를 측정하여 TPM 무게를 측정하였다.

가스상 라디칼을 측정하기 위해서는 세 개의 임핀저 용액을 혼합하고 Ar gas로 3분간 purging한 후 ESR 석영판에 0.6 mL를 분취하여 넣고 흡연 후 15분에 ESR 분석하였다. 입자상 라디칼을 측정하기 위해서는 CFP를 벤젠 15 mL로 10분간 진탕 추출하고 ESR 석영판에 0.6 mL를 분취하여 넣고 ESR 분석하였다.

### ESR 분석

ESR 기기는 JES-FA200(Jeol, Japan)를 사용하였고, ESR의 microwave frequency는 9.4 GHz, field modulation은 100 kHz이었다. 모든 측정은 실온에서 수행하였으며 spin 함량은 ESR 스펙트럼

을 double integration하여 라디칼 수가 알려져 있는 표준물질인 TEMPO와 비교하여 계산하였다.

가스상 라디칼의 ESR 조건은 modulation width 0.1 mT, amplitude 140, sweep time 2 min, time constant 0.1 sec로 설정하였고, 입자상 라디칼의 ESR 조건은 modulation width 0.6 mT, amplitude 160, sweep time 1 min, time constant 0.03 sec로 설정하여 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 가스상 자유라디칼 분석

Spin trapping 방법은 용액 내 자유라디칼의 특성을 검출하고 확인하는 것으로 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 spin-trap 종류에 따라 spin-adduct 형태가 달라진다. 담배연기 중 가스상 자유라디칼을 정량 및 정성 분석할 때 재현성 및 정확성에 영향을 미칠 수 있는 spin trap 선택, ESR 분석량, 자유라디칼 포집량, 시간에 따른 라디칼 소멸 변화 등의 여러 가지 인자들을 조사하였다.

Spin trap 용액으로는 PBN과 DMPO를 선택하

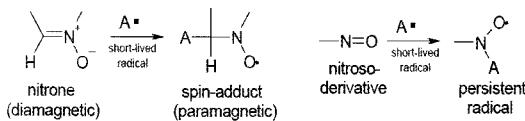


Fig. 1. Formation of spin adduct by spin-trap types.

였는데, PBN은 carbon-centered 라디칼을 포획하고, DMPO는 oxygen-centered 라디칼을 포획하는 데 사용하였다. 포획된 자유라디칼의 ESR 스펙트럼은 Fig. 2에 나타내었다.

최적 ESR 분석량을 설정하기 위하여 ESR 셝영 판에 TEMPO 표준용액 0.2~1 mL를 취하여 라디칼 함량 변화를 조사하여 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3(a)에 나타낸 바와 같이 TEMPO( $1.47 \times 10^{15}$  spins/mL) 표준용액을 이용하여 ESR 분석량에 따른 라디칼 수의 변화를 측정한 결과 0.2 mL에서 0.6 mL까지는 증가하였으나 0.6 mL 이상의 분석량에서는 비슷한 수치를 나타내었다. 따라서 시료 0.6 mL를 ESR cavity의 active part에 채워 분석하는 것을 최적 ESR 분석량으로 설정하였다.

한편, 흡연 시 라디칼의 최적 포집량을 확인하기 위하여 임필저 내의 spin trap 용액량을 2~7 mL 범위에서 변화시키며 라디칼 수치를 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 담배연기가 통과하는 spin-trap 용액(0.01 M PBN/벤젠)의 부피변화에 따른 실험결과, Fig. 3(b)에 나타낸 바와 같이 spin-trap 용액의 부피가 증가할수록 라디칼 수치가 증가하는 경향을 보였으며, 4~5 mL의 포집부피가 적정한 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 많은 포집량을 사용할 경우 담배 개피수 당 자유라디칼의 함량을 더 정확하게 측정할 수 있으나 과량을 사용할 경우 ESR 시그널이 약해지게 된다. 따라서 라디칼을 포획하기 위해서는 적정량의 spin trap 용액을 사용하는 것이 효과적임을 확인할 수 있었다.

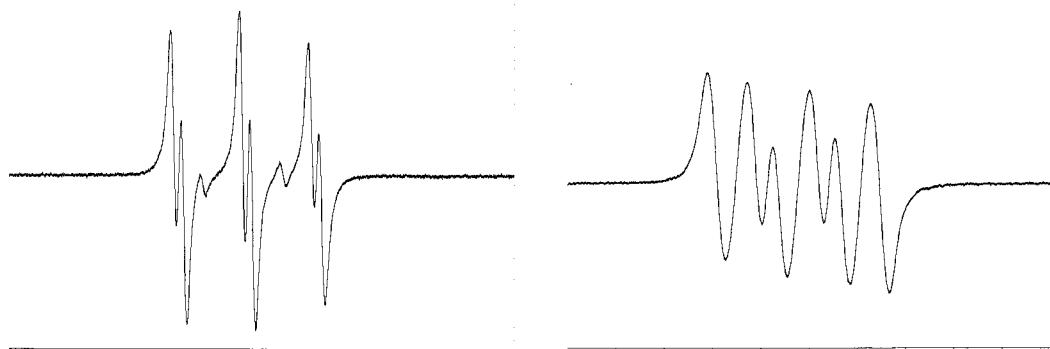


Fig. 2. ESR spectra obtained from the mainstream smoke of Ky2R4F reference cigarette using PBN(0.01 M) in benzene and DMPO(0.01 M) in benzene.

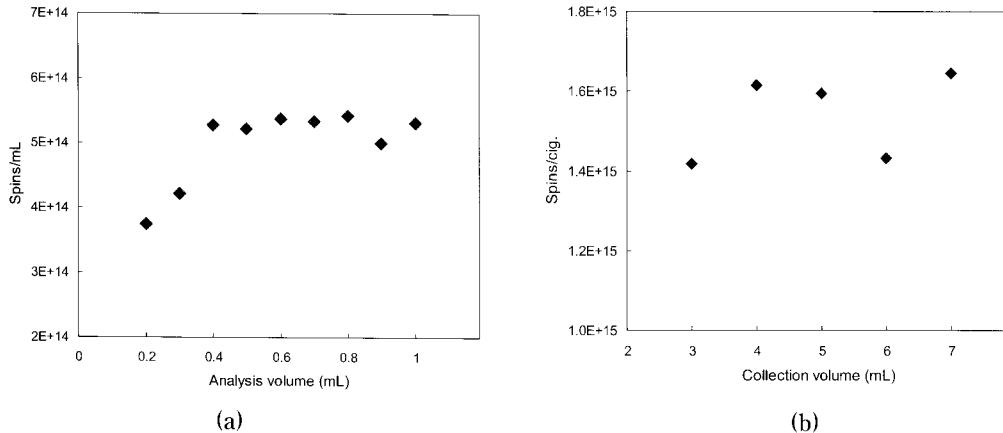


Fig. 3. Variation of radical levels by sample volume in ESR tube and collection volume of spin-trap solution during cigarette smoking.

Fig. 4는 가스상 자유라디칼의 시간에 따른 소멸 경향을 분석한 결과이다. Fig. 4에 나타낸 바와 같아 PBN-adduct와 DMPO-adduct를 비교할 경우, oxygen-centered 라디칼과 DMPO가 반응하여 생성된 DMPO-adduct는 시간이 경과함에 따라 급격히 감소한 반면 carbon-centered 라디칼과 PBN이 반응하여 생성된 PBN-adduct는 DMPO-adduct 보다는 완만한 소멸 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 가스상 자유라디칼을 분석하기 위해서는 spin trap 종류에 따른 시간 설정이 중요한 요인 중의 하나로서 작용하는 것으로 판단되었다. 따라서 본 실험에서는 흡연을 시작한 후 15분이 되는

시간에 가스상 자유라디칼을 측정하는 방법을 최적조건으로 설정하였다.

이와 같은 최적조건으로 표준담배 Ky2R4F를 분석한 결과, 가스상 자유라디칼 수치는 PBN-adduct  $2.10 \times 10^{15}$  spins/cig.과 DMPO-adduct  $2.25 \times 10^{15}$  spins./cig.으로 Ghosh 등(2007)에 의한 결과와 거의 일치하였다.

#### 입자상 자유라디칼 분석

Pryor 연구진(Pryor *et al.*, 1983; Church and Pryor, 1985)에 의하면 오랜 시간 안정한 자유라디칼이 입자상에 존재한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서도 이와 같은 결과를 확인하기 위하여 담배 흡연 후 CFP를 4°C에서 24시간 동안 저장 한 후 ESR 분석한 값과 흡연 종료 후 분석한 값을 비교해 본 결과, 입자상 자유라디칼 수치가 유사한 것으로 나타남으로써 입자상 자유라디칼의 저장 안정성을 확인할 수 있었다.

한편, 입자상 자유라디칼의 분석방법은 CFP를 직접 측정하거나 용매로 추출하여 측정하는 방법이 알려져 있다. 두 방법 중 입자상 자유라디칼 분석에 적절한 방법을 설정하기 위하여 CFP를 벤젠으로 10분 동안 진탕하여 추출한 것과 추출하지 않은 CFP를 ESR로 분석하였다. Fig 5는 입자상 라디칼의 ESR 스펙트럼을 나타내었고, Fig. 6은 용매 추

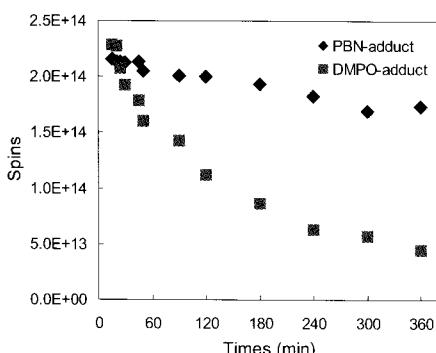


Fig. 4. Decay of gas phase free radicals in mainstream cigarette smoke.

출에 의한 입자상 자유라디칼과 용매 추출 없이 CFP를 직접 분석한 결과를 비교하여 나타내었다. 그 결과 용매 추출한 시료의 경우에는 담배 개비수 (1~20개비)에 따라 라디칼 수치가 비례적으로 증가한 반면, CFP를 바로 분석한 라디칼 수치는 낮은 직선성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 용매추출법을 입자상 자유라디칼의 최적 분석방법으로 선택하였다.

이와 같은 용매추출법으로 표준담배 Ky2R4F의 입자상 자유라디칼을 분석한 결과, 자유라디칼 수치는  $2.18 \times 10^{14}$  spins/cig.으로 Takanami와 Moriyama(2007)에 의한 결과보다 약간 낮은 수준이었다.

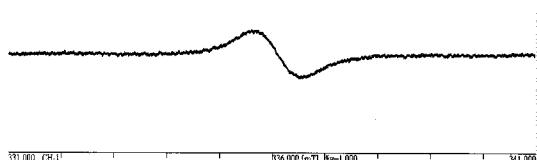


Fig. 5. ESR spectrum of TPM for 2R4F reference cigarette collected on a cambridge filter pad.

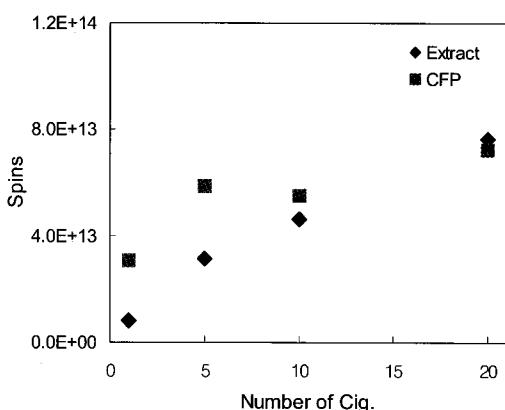


Fig. 6. Comparison of free radical levels in CFP and CFP extract.

## 결 론

본 연구는 spin-trapping 기술이 접목된 ESR 분석법을 이용하여 담배 주류연 중 자유라디칼의 정

량분석을 수행함에 있어 재현성 있는 정확한 결과를 도출하기 위해 여러 가지 인자를 최적화하고자 하였다. ESR 기기의 최적 분석량은 0.6 mL이었고, 그 이하의 양에서는 최대 ESR intensity를 얻지 못하였다. 생성된 spin-adduct의 함량 및 특성에 영향을 미치는 중요한 요소 중 하나인 최적 spin-trapping 포집량은 4~5 mL이었다. Spin trap은 PBN과 DMPO 두 가지 종류에 대하여 검토하였는데, DMPO spin trap에서 더 높은 함량의 라디칼을 나타내었지만 소멸이 급격히 발생하므로 정량분석에는 PBN을 사용하는 것이 더 효과적이었다. 입자상 자유라디칼은 CFP를 벤젠으로 추출하여 분석하는 것이 최적방법이었으며, 시간에 따른 입자상 자유라디칼의 안정성을 실험한 결과 4°C에서 24시간 동안 안정하였다.

## 참 고 문 헌

- Baum, S. L., Anderson, I. G. M., Baker, R. R., Murphy, D. M. and Rowlands, C. C. (2003) Electron spin resonance and spin trap investigation of free radicals in cigarette smoke: development of a quantification procedure. *Analytica Chimica Acta* 481: 1-3.
- Blakley, R. L., Henry, D. D. and Smith, C. J. (2001) Lack of correlation between cigarette mainstream smoke particulate phase radicals and hydroquinone yield. *Food Chem. Toxicol.* 39: 401-406.
- Bluhm, A. L., Weinstein, J. and Sousa, J. A. (1971) Free radicals in tobacco smoke. *Nature* 229: 500.
- Buettner, G. R. (1987) Spin trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V. *Free Radical Biol. Med.* 3: 259-303.
- Church, D. F. and Pryor, W. A. (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 64: 111-126.
- Cueto, R. and Pryor, W. A. (1994) Cigarette smoke chemistry: conversion of nitric oxide

- to nitrogen dioxide and reactions of nitrogen oxides with other smoke components as studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 7: 97-111.
- David, M., Gac, S. L., Iman, E. and Christian, R. (2002) A new method for detecting free radicals by LC-MS/MS. Application to the detection and quantitation of free radicals in cigarette smoke. Proceedings of the 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, Florida, June 2-6.
- Domingues, P., Domingues, M. and Rosario, M., Amado, F. M. L., Ferrer-Correia, A. (2001) Detection and characterization of hydroxyl radical adducts by mass spectrometry. *J. Am. Soc., Mass Spectrom.* 12: 1214-1219.
- Ghosh M., Mcaughey J. and Ionita P. (2007) Investigation of free radicals in cigarette smoke by Electron Spin Resonance. in Proceedings of the paper presented at the CORESTA Meeting. Jeju Island, South Korea, 2007, Programme Booklet and Abstracts (SSPT 27).
- Lyons, M. J., Gibson, J. K. and Ingram, D. J. E. (1958) Free-radicals produced in cigarette smoke. *Nature* 181: 1003-1004.
- Pryor, W. A., Prier, D. G. and Church, D. F. (1983) Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ. Health Perspect.* 47: 345-358.
- Takanami Y. and Moriyama T. (2007) Analysis of vapor and particulate phase free radicals in mainstream cigarette smoke. in Proceedings of the paper presented at the CORESTA Meeting. Jeju Island, South Korea, 2007, Programme Booklet and Abstracts (SSPT 28).
- Takanami, Y., Takahashi, H. and Shibagaki, M. (2002) Studies on free radicals formation in vapour phase cigarette smoke, in: Proceedings of the paper presented at the 56th Tobacco Science Research Conference, Lexington, KY, USA, Programme Booklet and Abstracts (No. 74).