

◀ 총 설 ▶

잎담배 성분 및 분석

장 기 철* · 김 용 하

KT&G 중앙연구원
(2008년 11월 17일 접수)

Tobacco Leaf Components and Analysis

Gi-Chul Jang* and Yong-Ha Kim

KT&G Central Research Institute

(Received November 17, 2008)

1. 서 론

1960년대에는 잎담배 성분이 약 200여종이 확인되었고 연기성분은 450여종의 성분만이 확인되었으나, 장비와 분석기술의 발달로 말미암아 오늘날에는 잎담배 성분 약 3,400여종, 연기성분 약 4,700여종이 확인되었으며, 잎담배 성분 4,000종 이상, 연기성분 약 6,000종 이상이 존재 한다고 추론되고 있다.

잎담배의 물리, 화학적 성질은 유전인자(genetics), 경작조건, 토양 및 비료, 기후조건, 질병, 착엽위치 및 수확 및 건조 방법에 의해서 영향을 받으며 식물체 내에서의 대사적인 탄소-질소의 조화(metabolic carbon-nitrogen balance)는 Krebs tricarboxylic acid cycle에 기초한 연속적인 변환에 의한 것으로 받아들여지고 있다. Krebs cycle에서, 공기 중의 이산화탄소는 광합성을 통하여 담배 잎 안에 축적되고, 무기질 질소(니트리트 또는 암모니아)는 토양으로부터 뿌리를 통하여 담배 잎 안에 축적된다. 토양 중의 니트리트는 암모니아로 변환되어 Krebs cycle에 이용되어서 아미노산들을 형성하는데 이 아미노산들은 향기성분들을 생성하는데 중요한 다

양한 질소화합물의 형성과 변환에 필요한 질소 공급원으로서 제공되어 진다.

Dawson(1952)은 Krebs cycle을 기초로 모든 잎담배의 조성에서 유전형질적이며 경작적으로 유도된 변수들을 산출하기 위한 개념을 제안하였다. 이 개념을 이용하여 Dawson은 시가엽과 버어리엽의 생산에서와 같이 질소 공급이 풍부하다면, 단백질, 아미노산 및 니코틴이 다량 생성된다. 오리엔트엽의 경우, 질소 비료와 수분의 공급이 충분치 못한 가운데 성장함으로써, Krebs cycle에서 acetate가 축적되고 그 결과 질소화합물의 소비를 줄이기 위하여 더 많은 carbohydrates, aromatic acids 및 resin의 생성뿐만 아니라 mevalonic acid를 통하여 terpenoids가 광합성 된다.

한편, 잎담배 성분을 분석하기 위해서는 전처리 과정에서 추출, 여과, 증류 등을 통하여 시료를 조제한 후 조제된 시료를 분석 목적에 맞는 분석 장비를 활용하여 분석한다.

현재까지 잎담배 성분에 대한 국제표준분석법은 ISO법 10개와 CORESTA법 10개 등이 있으며 1968년에 잎담배 중의 알칼로이드 함량을 강한 염

*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: 82-42-866-5465 fax: 82-42-866-5426 e-mail: gcjang@ktng.com)

기 조건에서 수증기 증류하여 분광광도법으로 분석한 것을 시작으로 최근의 각종 정밀분석 장비를 활용한 분석법에 이르기까지 꾸준히 지속되고 있는 추세이다.

이 총설에서는 황색종, 버어리종 및 오리엔트종 잎담배가 함유하고 있는 성분들의 종류와 특성, 그리고 잎담배 성분을 분석할 때에 전처리 과정에서 이용하는 분리 방법과 각종 분석 장비를 이용하는 방법에 대하여 알아보고자 한다.

2. 잎담배 성분

2.1. 알칼로이드(alkaloids)

알칼로이드는 식물체 속에 들어 있는 질소를 함유한 염기성 유기화합물의 총칭이며 식물염기라고도 한다. 동물에 대해 특이하고 강력한 생리작용을 가지는 것이 많다. 알칼로이드란 ‘염기성을 나타내는 물질’이라는 뜻으로서, 단일물질을 가리키는 명칭은 아니다. 1805년 Serturner가 아편에서 모르핀을 분리한 이후로 오늘날에는 화학적으로 매우 광범위한 물질이 포함되어 있고, 약 2,000종 이상의 알칼로이드가 알려져 있으며 화학구조는 일반적으로 복잡하며, 피리딘·피롤리딘·피페리딘·퀴놀린·이소퀴놀린·인돌 등 질소를 함유한 헤테로고리를

표 1. 건조엽 중 알칼로이드의 상대적 함량

Component	Flue-Cured	Burley	Orient
	-- peak area/ISTD area --		
Nicotine	208.650	442.967	157.483
Nornicotine	0.578	59.446	5.684
Myosmine	0.502	2.583	1.736
Anabasine	1.407	2.855	0.298
Anatabine	6.107	16.828	1.738
2,3-Bipyridyl	0.350	0.438	0.099
Cotinine	-	0.986	0.603
Formyl Nornicotine	0.174	3.835	1.171
Acetyl Nornicotine	-	0.867	0.267
Formyl Anatabine	-	0.087	-

(Jang 등, 1990)

가진다. 그 중 담배에 들어있는 대표적인 알칼로이드는 니코틴, 노르니코틴, 아나타빈, 아나바신 및 미오시민 등이 있다.

알칼로이드의 함량은 품종, 재배환경, 재배조건 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있으나 이들 인자들이 어떻게 알칼로이드의 함량에 영향을 미치는지는 거의 알려져 있지 않다(Chaplin 등, 1980; Bush 등, 1989). 이들의 함량은 표 1 및 2에서 보는 바와 같이 담배의 종류 및 착엽 위치에 따라 다르다(Jang 등, 1990).

잎담배에 들어있는 알칼로이드 중 니코틴은 1560년에 Jean Nicot에 의해서 명명 되었으며 1829년에 처음으로 분리 되었고 흡연 시 impact와 irritation에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 노르니코틴은 TSNA(tobacco specific nitrosamine)의 전구체로 알려져 있다(Hecht 등, 1979; Brunnemann 등, 1991).

표 2. 버어리종의 착엽 위치에 따른 알칼로이드의 상대적 함량

Component	Lugs	Cutter	Leaf	Tips
	--- peak area/ISTD area ---			
Nicotine	108.052	211.015	481.236	510.046
Nornicotine	3.537	26.483	52.788	74.971
Myosmine	0.997	1.084	1.705	2.603
Anabasine	0.539	1.109	2.796	3.393
Anatabine	4.291	10.738	21.697	23.645
2,3-Bipyridyl	0.220	0.236	0.243	0.257
Cotinine	0.530	0.423	0.442	0.541
Formyl Nornicotine	0.751	1.373	1.630	2.168
Acetyl Nornicotine	0.149	0.214	0.262	0.305
Formyl Anatabine	0.062	0.058	0.072	0.079

(Jang 등, 1990)

2.2. 탄수화물(carbohydrates)

탄수화물(carbohydrates)은 당질(glucoside)이라고도 불리 우며 지구상에서 가장 풍부한 생명분자

이다. 탄수화물은 탄소 : 수소 : 산소가 1:2:1의 비율로 조성된 물질로서 지방, 단백질과 함께 3대 영양소를 구성한다. 탄수화물은 가수분해 되었을 경우 생성되는 구성당류의 수에 따라 단당류(monosaccharides), 이당류(disaccharides), 올리고당류(oligo-saccharides)와 다당류(polysaccharides) 등으로 분류된다.

단당류는 포도당(glucose), 과당(fructose), 갈락토오스(galactose)가 있으며, 이당류는 설탕(sucrose), 맥아당(maltose), 유당(lactose)이 있고 복합탄수화물로 불리우는 다당류는 녹말(starch), 글리코겐(glycogen), 섬유소(cellulose), 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 및 펙틴(pectin) 등이 있다.

담배 연기 중의 탄수화물의 열분해 생성물은 키크미에 영향을 준다는 것은 잘 알려져 있다. 당류가 니코틴과 다른 알칼로이드의 자극성을 완화시킴으로써 담배 향기미를 조화(balance) 시킨다고 알려져 있다(Leffingwell, 1976). 탄수화물은 열분해에 의해서 산을 생성함으로써 암모니아와 더불어 담배연기의 pH에 중대한 영향을 미친다. 당 함량이 낮은 제품은 당 함량이 높은 제품보다 더 알칼리성이 강한 연기를 생성한다고 알려져 있다(Elson 등, 1972).

잎담배 속에 들어있는 탄수화물(당류)은 단백질과 반응하여 Maillard 반응에 의하여 색과 향의 변화를 가져온다. 이 Maillard 반응은 프랑스 화학자 Maillard(1912)에 의해서 glucose와 glycine의 용액을 가열하였을 때 갈색 색소인 melanoidin을 생성한다고 처음으로 논의되었기 때문에 Maillard 반응이라고 부르게 되었다. 이 반응은 활성을 가진 유리 aldehyde나 ketone기와 같은 carbonyl기를 가진 물질이 환원 또는 가수분해되어 환원당을 만들 수 있는 당류가 아미노산, peptide, 단백질과 같은 유리 amino기나 imino기를 가진 질소화합물과 상호 반응하여 갈색 물질을 생성하는 것이므로 그 반응의 본질을 따서 amino-carbonyl 반응이라고도 하며 또한 생성되는 최종 갈색 물질의 이름을 따서 melanoidin 반응이라고도 부른다.

또한 Maillard 반응에 의한 갈변은 외부에서 가열과 같은 에너지 공급이 있어야 비로소 일어나는 화학 반응과 달리 거의 자연 발생적으로 일어난다

는 중요한 특징을 가지고 있다. 따라서 이 갈변 반응은 식품 가공 과정에서는 물론 저장 시에도 계속 일어날 수 있으며 또한 억제하기도 어려운 매우 중요한 반응이다.

Maillard 반응에 의한 갈변의 진행 메카니즘에 대해서는 비교적 잘 알려져 있으며, 그 반응은 대체로 초기 단계(primary step), 중간 단계(intermediate step), 최종 단계(final step)의 3가지 단계로 구분한다. 초기단계는 당류와 amino화합물의 축합 반응(condensation reaction)으로서 Maillard 반응의 진행되기 위해서는 먼저 환원당과 amino 화합물이 축합 반응을 일으켜 질소배당체인 glycosylamine을 형성하여야 한다. 예를 들면, 환원당인 glucose와 amino기를 가진 glycine이 축합하여 질소배당체인 glucosylglycine이 형성되는데 이 과정이 Maillard 반응의 첫 활성화 단계라고 할 수 있다. 중간단계는 imino화합물의 축합에 의하여 형성된 glycosylamine은 대응하는 fructosylamine으로 전위를 일으킨다. 이 과정이 두 번째의 활성화 단계이며, Amadori 전위라고 알려진 Maillard 반응에 있어서 가장 중요한 반응중의 하나이다. 최종 단계에 이르러서는 중간 단계에서 형성된 각종 reductone류, furfural 유도체들, 분해 생성물 등이 서로 축합 또는 중합 반응을 일으켜 갈색으로 착색된 melanoidin을 형성한다.

2.3. 유기산(organic acids)

일반적으로 유기산은 잎담배의 pH를 조절하여 담배연기의 향기미에 간접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이들은 잎담배 내에서 대부분이 니코틴, 암모니아 같은 유기물질 및 칼슘(calcium), 칼륨(potassium), 나트륨(sodium)과 같은 무기물질들과의 염 상태로 존재한다.

유기산들은 화학적 특성에 따라 휘발성 유기산, 비휘발성 유기산 및 지방산으로 나눌 수 있다. 그중 C2-C8을 갖는 휘발성 유기산들은 담배의 중요한 향기성분으로 알려져 있다. 표 3은 잎담배 종류별 휘발성 유기산의 함량을 나타낸 것이다. 휘발성 유기산은 버어리종 보다는 황색종이나 오리엔트종에서 함량이 더 높고 이들 중 3-methyl valeric acid와 isovaleric acid는 오리엔트종의 고유한 맛에

표 3. 잎담배 종류별 휘발성 유기산 함량

Acids	Virginia	Burley	Oriental
	----- ug/g -----		
Formic acid	597	288	587
Acetic acid	877	372	688
Propionic acid	12	12	24
Isobutyric acid	32	29	72
Butyric acid	2	0	0
2-Methylbutyric acid	247	26	313
Isovaleric acid	116	20	202
2-Butenoic acid	12	1	3
Valeric acid	1	0	4
3-Methylvaleric acid	4	1	1372
Hexanoic acid	5	3	5
Heptanoic acid	5	5	6
Octanoic acid	5	12	5
Nonanoic acid	16	21	24
2-Furoic acid	32	36	125
Benzoic acid	22	14	25
Phenylacetic acid	36	0	65

(Kalianos, 1976)

표 4. 유기산의 맛 및 향 특성

Compounds	Smoke Taste	Smoke Aroma
Acetic acid	pungent, acrid	pungent, sour
Formic acid	pungent, acrid	pungent
Butyric acid	smoothing, buttery, fruity	smoothing, buttery
2-Furoic acid	weak, sweet, nutty	weak, nutty
Isovaleric acid	sweet, winey, fruity, cheese, adds body	smoothing, cheese
β-Methylvaleric acid	sweet, cheese, fruity	cheese, fruity, Oriental tobacco note
Malic acid	smoothing, acrid	weak, acrid
Phenylacetic acid	sweet, honey	sweet, honey
Valeric acid	sweet, cheese, fruity ,buttery	sweet, honey, cheese, smoothing

(Leffingwell 등, 1972)

기여하는 것으로 다른 종류의 잎담배 보다 함량이 높으며 그 향의 강도도 Leffingwell 등(1991)의 threshold에 의하면 acetic acid에 비해 각각 152배 및 56배 정도가 크다.

잎담배 중에 들어있는 카르복실산의 대부분은 시트르산(citric acid), 말산(malic acid), 옥살산(oxalic acid) 및 말론산(malonic acid)이며 이들 휘발성 유기산들은 건조 후에 버어리종 및 시가엽에 14-18 %, 황색종 및 메릴랜드엽에 7-10 %, 오리엔트엽에 6-8 % 그리고 버지니아엽에 5-10 % 함유되어 있으며 이들의 각각의 함량은 잎담배의 종류에 따라 다르다(Kalianos, 1976).

유기산과 연기 품질과의 관계를 살펴보면 시트르산은 Phillips 등(1953)과 Tso 등(1975)은 담배 연기 품질에 부정적인 역할을 하는 것으로 다루었으며 옥살산은 Tso는 긍정적인 역할을 하는 것으로, Phillips는 부정적인 역할을 하는 것으로 다루었다. 옥살산과 시트르산 외에 말산, 말론산도 담배 연기의 질을 낮추는데 기여한다고 하였는바 (Shmuk, 1953; Kalianos, 1976) 이러한 연구들을 종합하면 시트르산은 연기의 질을 낮추는데 관여함이 확실하고 옥살산은 연기의 질에 대한 관여가 불확실하다고 할 수 있으며 말산은 전체적인 연기의 질에 미치는 영향은 불확실하나 향긋미에는 부정적인 것으로 생각된다. 그러나 시트르산을 포함

한 유기산들은 담배 맛에 부드러운 효과를 주는 것이 확실하며, 특히 알칼로이드의 함량이 높은 잎담배에 있어서는 이들 유기산의 인위적인 첨가가 연기의 맛을 부드럽게 완화하는 효과가 있다. 즉 흡연 할 때 이들 유기산들이 연기의 pH를 변경 또는 조절하는 효과를 가짐으로써 맛(taste)이나 향(aroma)에 관여하는 다른 화합물들의 특성을 수정한다는 점이다. 표 4에 몇 가지 유기산의 맛 및 향 특성을 나타내었다.

잎담배 중의 유기산들이 비록 맛과 향에 관여하기는 하지만 이들 유기산의 존재양식과 상대적 함량 그리고 다른 방향물질과의 상호 연관성 등 복잡한 인자들이 종국적으로 방향특성에 영향을 미친다. 고급 지방산인 미리스트산(myristic acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid) 및 리놀렌산(linolenic acid) 등은 황색종에 약 0.75-1.1 %, 버어리종에 약 0.5 %가 함유되어 있는데 그 중에서 팔미트산이 약 25 %를 차지하고 있으며 연기 향각미에 기여하는 중요 성분들로써 대부분 waxy, smoothening한 맛을 주는 것으로 알려져 있다. 표 5에 황색종에 들어있는 고급 지방산의 함량을 나타내었다.

표 5. 황색종 중 고급 지방산 함량

Acids	%
Myristic acid	0.02
Palmitic acid	0.28
Stearic acid	0.05
Oleic acid	0.11
Linoleic acid	0.18
Linolenic acid	0.35

(Court 등, 1993)

2.4. 페놀류(phenolics)

잎담배에 존재하는 페놀 및 폴리페놀계 화합물은 단순 페놀계, 페놀산계, 프라보노이드계(flavonoids), 쿠마린계(coumarins), 퀴논계

(quinones), 벤조피란계(benzopyrans) 및 갈색반응 색소물질(browning reaction pigments) 등으로 분류할 수 있다. 지금까지 잎담배 중에서 100개 이상의 페놀계 화합물이 확인 되었으나 페놀류는 잎담배 보다는 담배 연기 중에서 더 많이 발견되고 있다. 페놀계 화합물의 함량은 잎담배 종류에 따라 유전학적 및 재배조건의 변화에 의한 차이가 많다(표 6 참조).

표 6. 2년에 걸친 잎담배 종류별 polyphenol 함량

Tobacco	1980년	1981년
	----- % -----	
Virginia	3.13	3.75
Burley	1.78	2.05
Cigar wrapper	2.13	2.65
Cigar filler	2.03	3.40
Cigar binder	2.27	3.54
Maryland	2.09	3.25
Dark fire-cured	2.78	3.64
Oriental	1.83	2.09

(Smeeton, 1987)

표 7. 잎담배 중의 polyphenol 함량

Compound	Virginia	Burley
	----- mg/g -----	
Chlorogenic acids	34.71	12.83
Rutin	7.95	4.00
Scopoletin	0.13	0.06
Scopolin	0.94	0.35

(Sheen 등, 1979)

페놀계 화합물의 주요 성분들은 클로로겐산(chlorogenic acid), 루틴(rutin), 스코폴레틴(scopoletin) 및 스코폴린(scopolin) 등이며 버어리종 보다는 황색종에서의 함량이 높다(표 7 참조).

클로로겐산은 대부분이 3-O-caffeoyl-quinic acid 이며 5- 와 6- 위치에 결합된 이성체가 소량 존재한다. 스코폴레틴(scopoletin) 및 스코폴린(scopolin)은 잎담배에 들어있는 주요한 쿠마린(coumarin)계 화합물이다.

잎담배 중에는 휘발성 페놀류도 비록 소량이지만 존재하고 있다(표 8 참조).

표 8. 수증기 증류에 의해서 분리된 페놀류의 함량

Phenols	Virginia	Burley	Oriental
	part per billion in leaf		
Phenol	16	13	39
o-Cresol	9	4	11
m-Cresol	26	8	46
p-Cresol	31	4	18
Guaiacol	80	23	28
Dimethylphenols	9	3	15
4-Vinylphenol	54	2	161
2-Acetyl-3-methylphenol	-	2	2
Trimethylphenol	-	5	4
4-Ethylguaiacol	-	1	8
4-t-Butylphenol	1	1	8
Eugenol	0.5	-	-
4-Vinylguaiacol	14	3	8
4-Allyl-2,6-dimethylphenol	52	0.3	2

(Wilson 등, 1982)

2.5. 무기물(inorganics)

잎담배 중에는 나트륨(sodium), 칼륨(potassium), 칼슘(calcium), 마그네슘(magnesium), 염소(chlorine), 인(phosphorous) 및 황(sulfur) 등 많은 종류의 무기물이 염의 형태로 존재한다(표 9 참조).

이들 무기물들은 잎담배의 연소속도를 조절하는데 마그네슘과 칼륨은 연소속도를 증가시키고 인과 염소는 연소속도를 감소시키며 특히 염소의 함량이 높을 경우에는 키크미를 나쁘게 한다(Mendell

등, 1984; Peedin 등, 1990). 니트리트(nitrate)는 그 자체가 연소함으로써 연소속도를 증가시키는데 air-cured tobacco의 경우 니트리트가 줄기(stem)에 저장됨으로써 버어리 줄기가 황색종 줄기보다 연소성이 좋게 된다.

표 9. 잎담배 중의 무기물 함량

Component	Flue-Cured	Burley	Maryland	Oriental
	----- % -----			
Ash	10.81	24.53	21.98	14.78
Calcium as CaO	2.22	8.01	4.79	4.22
Potassium as K ₂ O	2.47	5.22	4.40	2.33
Magnesium as MgO	0.36	1.29	1.03	0.69
Chlorine as Cl	0.84	0.71	0.26	0.69
Phosphorous as P ₂ O ₅	0.51	0.57	0.53	0.47
Sulfur as SO ₄	1.23	1.98	3.34	1.40

(Tso, 1990)

3. 잎담배 성분 분석

3.1. 물질의 분리

3.1.1. 증류(distillation)

증류는 두 가지 이상의 액체가 혼합되어 있거나 혹은 고체 물질이 용액에 녹아 있을 경우에 이들의 끓는점 차이를 이용하여 분리하는 방법이다. 증류의 초기 형태는 적어도 BC 2000년 전에 지금의 이라크 지방인 메소포타미아의 바빌로니아에서 사용되어진 것으로 알려져 있다. 파키스탄 북서부 지역에서 발굴된 유물은 알코올의 증류가 BC 500부터 되었던 것을 나타내지만 일반적으로 사용된 것은 BC 150-AD 350 부터이다. AD 1세기에는 증류법이 그리스의 연금술사들에게 전해졌고, 그 후에 화주를 제조하기 위하여 대규모의 증류장치가 개발되었다(Russel, 2000).

증류의 종류에는 단순증류(simple distillation), 분별증류(fractional distillation), 감압증류(vacuum distillation), 공비증류(azotropic distillation) 및 수증기증류(steam distillation) 등이 있다.

단순증류는 증류 중에서 가장 단순한 방법인데, 불순물이 10 % 이하로 함유되어 있는 경우, 액체에 비휘발성 물질이 들어 있는 경우, 그리고 두 액체간의 비점 차이가 적어도 70 ℃ 이상의 액체를 분리할 경우에 주로 사용된다.

분별증류는 액체 혼합물 간의 비점 차이가 70 ℃ 이하이어서 단순증류로 분리할 수 없는 경우에 사용하며, 칼럼 내에서 기화와 응축이 반복적으로 일어나서 분리가 일어나게 된다. 분별증류는 정류(rectification)라고도 불리 운다(Perry, 1984).

감압증류는 액체의 비점이 높거나 열에 약해서 고온에서 분해될 위험성이 있는 경우에 사용한다.

공비증류는 공비혼합물 또는 끓는점이 비슷하여 분리하기 어려운 액체 혼합물의 성분을 완전히 분리시키기 위해 쓰이는 증류법이다. 대표적으로 수분을 함유하는 에탄올에서 순수한 에탄올을 얻기 위해서(potassium carbonate와 같은 탈수제를 넣어 줌으로써 용해성 물을 불용성 물로 바꾸어 줌) 이 증류법이 사용되고 있다.

수증기증류는 수증기 증류 비점이 높은 물질이나 분해하기 쉬운 물질에서도 물에 용해하지 않는 것이라면 수증기를 불어 줌으로써 그 물질의 비점보다 낮은 온도에서 증류할 수 있다. 즉 물질의 증기압과 물의 증기압과의 합(Rault의 법칙)이 대기압보다 약간 크게 되었을 때에 증발이 일어나기 때문에, 대개의 경우 100 ℃ 이하의 온도에서 혼합 증기가 유출된다. 수증기증류법은 11세기 초에 Avicenna가 정유(essential oil)를 얻기 위해 고안한 것으로 알려져 있으며(Wolf, 2007) 일담배 성분 중의 전 휘발성 염기(total volatile base)의 분석에 이용하고 있다.

3.1.2 여과(filter)

여과란 액체와 고체 혼합물인 경우 porous barrier를 통과시킴으로써 고체와 액체를 분리하는 것을 말한다. 이때 통과된 액체를 filtrate라하고 남아있는 고체를 filtrand(또는 residue) 또는 filter cake라 한다.

여과지의 성질과 관련된 여러 가지 용어를 살펴 보면 다음과 같다. 먼저 유속(flow rate)은 여과지를 얼마나 빨리 통과하는가 하는 속도이며, 보유능

(retention)은 여과지가 고체 입자들이 통과하지 못하도록 막아내는 능력을 말하며, 기공도(porosity)는 여과지에서 공극(pores)의 크기 및 개수를 의미한다. 또한 여과의 종류에는 상압에서 하는 상압여과와 감압 하에서 하는 감압여과가 있다.

3.1.3 추출(extraction)

추출은 액체용액에 있는 고체나 액체 혼합물로부터 유용한 물질이나 불필요한 물질을 끄집어내는 방법이며 단수(single step) 추출보다는 복수(multi step) 추출이 더 효과적이다. 추출에 사용되는 용매의 조건은 다음과 같다.

- 용매의 용해도가 커야한다.
- 추출용매는 고체나 액체와 섞이지 않거나 극히 소량만이 섞여야 한다.
- 추출용매는 쉽게 제거 될 수 있어야 한다.
- 가격이 저렴해야 한다.
- 독성이 없어야 한다.
- 발화점이 25 ℃ 이상이어야 한다.
- 화학적으로나 열적으로 안정해야 한다.

추출하는 방법은 크게 액체/액체 추출과 고체/액체 추출이 있다. 액체/액체 추출은 용매추출 또는 분할추출(partitioning)로 알려져 있는데 서로 섞이지 않는 액체(물과 유기용매)의 상대적인 용해도 차이를 이용하여 분리하는 방법이다. 이때 분액 깔대기(separating funnel)를 사용하여 두 액상(液相)을 분리하며, 물질은 두 액상 사이의 분배평형($K_d = K_o/K_w$)에 의해 분리된다. 고체/액체 추출은 고체물질, 불활성 기반물질(inert matrix) 및 필요한 물질이 들어있는 것(active agent)으로부터 용해 물질을 용매로 추출하는 것이다.

추출액은 씨앗 속의 오일이나 커피 속의 카페인과 같이 고체나 액체 형태의 추출물을 포함한다. 추출 방법으로 속슬렛 추출방법과 같은 것이 이용되기도 한다.

3.2. 물질의 분석

3.2.1. 자외선 분광분석법(UV-VIS spectroscopy)

UV-VIS 분광분석법은 UV와 visible 파장범위 내에서 흡수 가능한 고체, 액체 및 기체의 검출 및 정량을 할 수 있는 방법으로 고체는 UV-투과성

용매에 용해해야 측정이 가능하다. 이 방법은 정량 분석에 적합하므로 특수시약과 반응 후 많은 유기물 및 무기물질을 측정하는 결정단계에서 흔히 쓰인다. 또한 용액 속에 불순물 정량, 때로는 물질 확인에 관계없이 반응 측정에 사용된다.

흡수강도가 시료내의 흡수성 물질의 양에 직접 비례(Beer-Lambert 법칙) 하므로 흡수되는 종류의 농도를 정확하게 측정할 수 있다. Beer-Lambert 법칙은 $A = \epsilon bc$ 로 표기되는데, 여기에서 A는 흡광도(no units, since $A = \log_{10} P_0 / P$), ϵ 는 molar absorptivity (단위 $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b는 샘플의 path length(보통 1 cm), 그리고 c는 용액 안에 들어있는 물질의 농도(단위 mol L^{-1})이다.

UV-VIS spectra는 파장범위 200-800 nm에서 흡수로부터 얻어지는데 담배 연기 중의 HCN의 분석에 이용되며, 또한 HPLC와 자동분석기(Auto Analyzer) 등의 검출기에 활용되기도 한다.

3.2.2. 자동분석기(Auto Analyzer)

자동 분석기는 Technicon사에서 최초로 제작된 “continuous flow analysis(CFA)”라고 불리는 특수한 flow technique을 이용하여 자동으로 분석하는 장비이다. 이 장비는 1957년에 Leonard Skeggs에 의해서 발명되었으며 Jack Whitehead's Technicon Corporation사에 의해서 상업화되었다. 처음에는 임상용으로 사용되었으나 곧이어 산업용으로 사용되어졌다.

자동 분석기는 분석 속도를 빠르게 하고 습식 분석에 의해서 발생할 수 있는 오차를 줄여 주는 장점이 있는데, 그 구성으로는 pump, mixing coils, optional sample treatments(dialysis, distillation, heating 등), detector 및 data generator 등이 있다.

자동 분석기에서 continuous stream은 air bubble에 의해서 분리되어서 stream이 확산에 의해서 서로 섞이는 것을 방지하고 turbulent flow를 생성하여 용액이 섞이는 것을 용이하게 한다. 액체 시료와 반응 시약들은 tube와 mixing coil을 통하여 이동하면서 증류, 투석(dialysis), 추출, 이온교환, 가열 등을 통하여 발색을 하고 이것을 colorimeter를 사용하여 측정된 값을 기록한다.

잎담배 성분 중의 전 알칼로이드, 전당, 환원당, 전질소, 염소, 암모니아, 니트리트(nitrate) 등의 분석에 자동 분석기를 이용하고 있다.

3.2.3. 크로마토그래프법(chromatography)

크로마토그래프법이란 다성분 혼합물에서 각 성분을 분리분석하는 방법인데 1903년에 Tswett가 녹색 잎에 함유되어 있는 색소를 탄산칼슘가루를 채운 유리관에 넣고 석유에테르 용액을 흘려보내 분리한 것이 최초의 실험으로 알려져 있다. 복잡한 혼합물로 구성된 담배의 성분을 분석하는데 있어서도 크로마토그래프법이 널리 이용되고 있다. 크로마토그래피는 이동상과 고정상의 특성에 따라 다양하게 분류되고 있는데 이동상이 기체인 경우에는 다시 gas-solid와 gas-liquid로 분류되고, 이동상이 액체인 경우는 adsorption, partition, ion-exchange, gel-filtration, gel-permeation, affinity, paper, thin-layer 등으로 구분되며, 그 외에 이동상이 초임계인 supercritical-fluid가 있다. 이들 크로마토그래피법 중에서 담배 화학성분 분석에 가장 많이 활용되고 있는 기체 크로마토그래피(gas chromatography)와 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)에 대하여 좀 더 상세히 알아보도록 한다.

3.2.3.1. 기체 크로마토그래프법(gas chromatography)

기체 크로마토그래프법은 고감도, 정밀성, 정확성 및 신속성 등의 여러 가지 장점이 있어 휘발성 화합물의 분리 및 정량분석에 아주 광범위하게 사용되는 방법이다. 그 원리는 일정한 압력의 운반기체(이동상)를 사용하고, 주입부를 통하여 시료는 기화되어 운반 기체를 따라 분리가 일어나는 고정상(컬럼)을 거쳐 검출기에 이르고 검출기에 도달한 시료 성분은 전기적 신호로 변환되어 기록기에 의하여 측정된다. 이때 사용되는 운반기체는 비활성이고 충분히 건조되어야 하며 불순물이 함유되지 않은 순수한 것이어야 하며 검출기의 특성을 고려하여 선택되는데 헬륨, 질소, 수소, 알곤 등이 주로 사용되고 있다. 주입부는 분석하고자 하는 시료를 기화시켜 컬럼으로 보내는 곳인데 시료가 충분히 기화될 수 있는 온도를 유지시켜 주어야 되며, 시

료를 컬럼으로 주입시키는 방법은 분할, 비분할 및 on-column 주입법 등이 있고 시료 특성에 따라 선별하여 활용할 수 있다. 담배에서 추출된 화합물들을 컬럼에 주입하기 전에 분리 및 검출강도를 향상시키기 위한 유도체화(Green 등, 1996) 방법으로 carbonyl derivative, methylation, 및 silylation 등이 주로 이용되고 있다.

기체 크로마토그래피의 컬럼은 혼합성분이 단일 성분으로 분리되는 곳이며 초기에는 내경이 2-4 mm 이고 길이도 6 m 이내인 유리 또는 스테인레스 강관 재질의 충전용 컬럼이 이용되었으나, 근래에는 내경이 0.1-0.53 mm로 가늘고 길이는 10-100 m 정도로 긴 용융실리카 재질의 모세관 컬럼이 개발되어 분리능이 향상되었다. 컬럼 내부의 정지상 물질도 꾸준히 개발되어 극성, 반극성 및 비극성의 다양한 종류가 등장하여 광범위한 화학성분들을 선택적으로 분리할 수 있게 되었다.

기체 크로마토그래피에 장착되어 사용되는 검출기는 분석대상 성분에 대한 선택성과 감도에 따라 여러 가지 종류가 개발되어 있다.

불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector)는 수소와 공기의 불꽃에서 기체의 전기 전도도가 기체 중의 전하를 띤 입자의 농도에 의해 직접 비례하는 원리를 이용하여 측정하는 검출기로서 대부분의 화학성분들에 대하여 검출감도가 비슷하며 잎담배 중 니코틴, 정유성분, 휘발성 유기산과 지방산, 멘톨, 보습제, phytosterols 등의 분석(Franke 등, 2001; William 등, 1978; CORESTA, 2005)에 널리 활용되고 있다.

열전도도 검출기(thermal conductivity detector)는 기체가 열을 전도하는 물리적 성질을 이용하여 순수 운반기체와 시료가 섞인 운반기체간의 열전도도 차이에 의해 측정하는 검출기로서 불꽃이온화 검출기와 마찬가지로 대부분의 화학성분들에 대하여 검출감도가 비슷하며 잎담배 중 수분 등의 분석에 활용되고 있다.

전자포획 검출기(electron capture detector)는 방사선 동위원소(^{63}N , ^3H)로부터 방출되는 β 선이 운반가스를 전리하여 미세한 전류를 흘려보낼 때 시료중의 할로젠이나 산소와 같이 전자 포획력이 강한 화합물에 의하여 전자가 포획되어 전류가 감소

하는 원리를 이용하는 방법으로 분자구조 내에 할로젠족 원소를 포함하는 화합물에 감도가 매우 높으며 잎담배 중 잔류 작물보호제 등의 분석(ISO, 2000)에 유용하게 이용되고 있다.

질소 인 검출기(nitrogen phosphorous detector)는 수소 불꽃 중에 알칼리 금속염을 넣고 가열하면 알칼리 금속의 증기가 불꽃의 온도에서 이온화되는 원리를 이용하는 방법으로 질소 화합물을 선택적으로 검출할 수 있으며 잎담배 중에는 알칼로이드 화합물, 잔류 maleic hydrazide 등의 분석(Yang 등, 1998)에 이용되고 있다.

이 밖에 인과 황 화합물에 선택적인 감도가 우수한 불꽃 광 검출기(flame photometric detector)로 향기성분을 분석(Parliment 등, 1981)한 것 등이 있고, 자외선 광을 이온화 에너지로 사용하여 분자구조 내에 방향족 또는 이중결합에 대해 감도가 좋은 광 이온화 검출기(photo ionization detector)로 탄화수소류를 분석(Driscoll, 1982)한 것 등이 있다.

근래에 그 활용도가 매우 높은 기체 크로마토그래프-질량분석기(gas chromatography/mass spectrometry)는 기체 크로마토그래프에서 분리되어 나온 화합물을 이온화시켜 생성된 이온을 질량과 하전량과의 비에 따라 분리시키고 얻어진 질량 스펙트럼을 해석함으로써 미지분자의 질량 및 그 구조를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 특정 이온을 선택하여 고감도의 정량분석도 가능한 장비이며 잎담배 중 정유성분, 휘발성 유기산과 지방산, 개별 알칼로이드, 열분해산물, 잔류 작물보호제, 아미노산, 담배특이성 니트로사민, 담배 첨가제 등의 분석(Wang 등, 2008; Ali 등, 2006; Merckel 등, 2006)에 이용되고 있다.

3.2.3.2. 액체 크로마토그래피법

(liquid chromatography)

액체 크로마토그래피법은 기체 크로마토그래피법에 비해 휘발성이 없는 물질이나 열적으로 불안정한 물질 및 고분자물질의 분석에 이르기까지 광범위하게 활용될 수 있는 장점이 있다. 액체 크로마토그래피는 이동상으로 액체를 사용하므로 별도의 용매 이송 장치인 펌프가 필요하며, 이때 사용

되는 용매로는 물, 메탄올, 아세토니트릴 등이며 특히 이온성 시료인 경우에 분리능을 향상시키기 위하여 완충용액을 사용하기도 한다. 분석과정 중에 이동상 용매는 그 조성을 바꾸지 않는 일정용매 조성법(isocratic mode)과 용매의 조성을 여러 가지 형태로 바꾸어 주는 구배용매 조성법 (gradient mode)이 있는데 용매의 선택은 용매의 섞임성과 시료의 용해성을 고려하여 결정하여야 한다.

액체 크로마토그래피에서 칼럼에서의 분리 원리는 극성이 큰 물질이 가장 나중에 용출되는 흡착 작용, 비극성이 큰 물질이 가장 나중에 용출되는 분배작용, 이온화 차이에 의해 분리되는 이온교환 작용, 큰 분자가 먼저 용출되고 작은 분자가 나중에 용출되는 분자체작용 등이 있다. 또한 칼럼에서의 분리능을 향상시키기 위해서는 다양한 종류의 충전제(C₈, C₁₈, CN, NH₂, phenyl 등)와 그 입자크기 및 용매의 극성 정도와 유속 등을 고려하여야 한다.

액체 크로마토그래피의 검출기 종류로는 자외선/가시선 검출기(UV/visible detector), 굴절율 검출기(refractive index detector), 형광 검출기(fluorescence detector), 전도도 검출기(conductivity detector) 및 전기화학 검출기(electrochemical detector) 등이 있다.

자외선/가시선 검출기는 광원에서 특정 파장의 빛이 셀(cell) 내의 시료에 투사되면 일부는 흡수되고 일부는 시료를 통과하게 되는데 시료의 특정파장에 대한 흡광도 차이가 나타나는 원리를 이용하는 방법이며, 잎담배 중 polyphenol류, 색소물질, 알칼로이드, 유기산 및 solanesol 등의 분석(Snook 등, 1986)에 활용되었고, 또한 첨가제인 glycyrrhizic acid, sorbic acid 등의 분석(Stargardt 등, 1985)에도 적용되고 있다.

굴절율 검출기는 기준 셀(reference cell)에 포함된 용매와 시료 셀에 포함된 시료간의 농도 변화에 따른 굴절율 차이에 의하여 검출되므로 거의 모든 물질에 사용될 수 있으나 주로 고분자, 당 등의 분석에 이용되는데, 잎담배 중에는 개별당, 보습제 등의 분석(Battard 등, 1978)에 적용하고 있다.

전도도 검출기는 양이온과 음이온 등 이온성 화합물의 전도도 차이에 의해 측정되는데, 잎담배 중 암모니아, 유기산 등의 분석(Health Canada, 1999; Qui 등, 2002)에 활용되었다.

그 이외의 검출기인 전기화학 검출기는 금속 전극과 시료 사이의 전기화학(산화/환원) 반응으로 측정되는데 잎담배 중 저급 탄수화물 등의 분석에 이용하였고, 형광 검출기는 분자구조 내에 형광을 띠거나 형광 유도체를 만들었을 때 감도가 매우 우수한 검출기이며 잎담배 중 카바메이트계 작물보호제, 유리 아미노산 등의 분석(Yang 등, 1994)에 이용되었다.

또한 최근에 개발되어 그 활용도가 점차 증가되고 있는 액체크로마토그래프-질량분석기는 기체 크로마토그래프-질량분석기와 마찬가지로 미지 물질의 질량과 구조 확인 및 특정 이온을 선택하여 고감도의 정량분석도 가능한 장비이며 잎담배 중 담배특이성 니트로소아민, 니코틴 대사산물, 개별당, 잔류 작물보호제 등의 분석(Lee 등, 2007; Helm 등, 2008)에 적용되었다.

3.2.4. 무기원소 분석법

담배 등의 식물체 중 무기원소를 분석하는 방법이 과거에는 중량법, 용량법 및 비색법 등이 이용(AOAC, 1990)되었으나 이들 분석법은 개별 무기원소를 분석할 수 없는 단점이 있다. 근래에는 개별 원소를 극미량 수준까지 정확히 검출할 수 있는 분석 장비를 이용하여 정성 및 정량분석을 하고 있다. 무기원소를 분석하기 위한 시료분해 방법으로는 시료 중의 유기물질을 고온의 열에 의해 파괴시키는 건식회화법이 있고, 황산이나 질산 등의 산 용액을 가하여 유기물질을 분해시키는 습식회화법이 있다. 근래에는 마이크로웨이브를 이용하여 밀폐용기에서 고온, 고압으로 유기물을 산분해하는 방법이 주로 사용되고 있으며 시료의 완전한 분해를 위해 산의 선택은 매우 중요하며 분석물질에 대한 용해도와 검출기의 간섭현상을 고려하여야 한다.

주로 사용되는 무기원소 분석 장비로는 원자흡수 분광법(atomic absorption spectrometry), X-선 형광분석법(x-ray fluorescence spectrometry),

유도결합플라즈마 분광광도법(inductively coupled plasma spectrometry), 유도결합플라즈마 질량분석법(inductively coupled plasma mass spectrometry) 등이 있다.

원자흡수 분광광도법은 원자화장치를 통해서 만들어진 중성원자에 자외선 또는 가시광의 복사 에너지를 쏘여줌으로써 일어나는 복사에너지의 흡수 현상을 검출하는 방법으로서 금속원소와 일부 비금속 원소를 포함하여 70여개 원소에 대한 분석이 가능하다.

X-선 형광분석기는 고전압과 고전류를 이용하여 강한 X-선을 발생시켜 시료에 주사하고 형광 현상에 의하여 시료에 포함되어 있는 원소에서 고유의 2차 X-선을 발생하게 되면 이를 분광결정에 회절시킨 후 검출하는 방법이며, 원소의 종류와 양을 측정하는 조성분석이 가능하고 넓은 농도 범위에서 신속하게 비파괴 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다.

유도결합플라즈마 분광광도법은 불활성 기체인 아르곤 가스를 이용하여 고온의 플라즈마를 형성한 후, 이 플라즈마에 시료를 도입시켜 중성원자가 높은 열 에너지에 의해 들뜨게 되고, 들뜬 원소들이 내놓는 빛의 파장과 세기를 이용하는 방법이며 미량분석에 대한 높은 감도와 정확성이 매우 좋고 유기 및 무기화합물에 대한 광범위한 분석이 가능하다.

유도결합플라즈마 질량분석법은 원소가 아르곤 플라즈마에 의해 이온화되고 양전하를 가지고 있는 이온을 특정 질량 대 전하의 비율에 따라 추출하여 사중극 필터로 보내 다시 원소별 질량을 분석하는 방법으로 대부분의 원소에서 pg/g 이하의 농도까지 검출이 가능할 정도로 감도가 우수하다.

원자흡수 분광광도법 등의 고감도 분석 장비를 이용하여 잎담배 중의 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 인, 염소, 철, 망간, 구리, 아연, 알루미늄, 니켈, 코발트, 몰리브덴, 카드뮴, 규소, 안티몬, 셀레늄, 황, 비소, 납, 수은, 브롬 및 비스무트와 같은 다량 또는 미량으로 함유된 무기원소들을 분석(Bell 등, 1990; Green 등, 1996)하고 있다.

참 고 문 헌

- Ali, H., Patzold, R. and Bruckner, H. (2006) Determination of L- and D-amino acids in smokeless tobacco products and tobacco. *Food Chemistry* 99: 803-812.
- Association of Official Analytical Chemists (1990). *Plants, Tobacco*. pp. 40-58, 66-68, 274-311.
- Battard, J. C. and Chauvette, C. (1978) Rapid characterization of tobacco sugars by high performance liquid chromatography. *Ann. du Tabac SEITA* 16: 5-12.
- Bell, P. and Mulch, C. L. (1990) Heavy metal concentrations in cigarette blends. *Tob. Sci.* 34: 32-34.
- Brunnemann, K. D., and D. Hoffmann (1991) *Rec. Adv. Tob. Sci.* 17: 71.
- Bush, L. P., Crowe, M. W. (1989) Toxicants of plant Origin(ed. P. R. Cheeke). pp 87-107. CRC Press, Boca Raton.
- Chaplin, J. F., Miner G. S. (1980) *Rec. Adv. Tob. Sci.* 6: 3-63.
- Cochran, J. (2008) Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography - time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides in tobacco. *J Chromatogr. A.* 1186: 202-210.
- CORESTA Recommended Method No 60, (2005) Determination of 1,2-propylene glycol and glycerol in tobacco and tobacco products by gas chromatography. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco.
- Court, W. A., Hendel, J. G., and Proc, R. (1993) *Tob. Sci.* 37: 59-64.
- Dawson, R. F. (1952) Chemistry and biochemistry of green tobacco. *Ind. Eng. Chem.* 44: 266-70.
- Driscoll, J. N. (1982) Identification of hydrocarbons in complex mixtures using a variable energy PID and capillary column gas

- chromatography. *J Chromatogr. Sci.* 20: 91-94.
- Elson, L. A., Betts, T. E. (1972) Passey, R. D., *Int. J. Cancer* 9(3): 666-75.
- Franke, J. E., Bennett, C. B., Davis, R. E., Thomsen, H. V. and Johnston, K. S. (2001) Determination of nicotine in tobacco: Collaborative study. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 19(5): 251-265.
- Green, C. R. and Rodgman, A. (1996) The tobacco chemists' research conference: A half century forum for advances in analytical methodology of tobacco and its products. *Recent Advances in Tobacco Science* 22: 131-304.
- Health Canada Test Method T-302 (1999) Determination of ammonia in whole tobacco. Ottawa, Canada.
- Hecht, S. S., Chen, C. B. (1979) Hoffmann, D. *Accounts Chem. Res.* 12: 92-98.
- Helm, B. M., Hofbauer, L. and Muller, J. (2008) Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Talanta* 74: 1184-1190.
- International Organization for Standardization (2000). Tobacco and tobacco products - Determination of organochlorine pesticide residues - Gas chromatographic methods. ISO 4389.
- Jang, Gi-Chul, Yong-Ok Kim, Un-Chul Lee (1990) *J. of the Korean Society of Tobacco Science* 12(9): 20-26.
- Kalianos, A. G. (1976) *Rec. Adv. Tob. Sci.* 2: 61-79.
- Lee, H. L., Wang, C., Lin, S. and Hsieh, D. P. H. (2007) Liquid chromatography/tandem mass spectrometric methods for the simultaneous determination of tobacco-specific nitrosamine NNK and its five metabolites. *Talanta* 73: 76-80.
- Leffingwell, J. C. (1976) *Rec. Adv. Tob. Sci.* 2: 1-31.
- Leffingwell, J. C. & Leffingwell, D. (1991) *Perf. Flav.* 16(1): 1-19.
- Leffingwell, J. C., Young, H. J., Berns, E. (1972) A monograph Published by R. J. Reynolds Tob. Co., Winston-Selem.
- Mendell S., Bourlas E. C., and DeBardeleben M. Z. (1984) *Beitr. Tabakforsch. Int.* 12(3): 153-167.
- Merckel, C., Pragst, F., Ratzinger, A., Aebi, B., Bernhard, W. and Sporkert, F. (2006) Application of headspace solid microextraction to qualitative and quantitative analysis of tobacco additives in cigarettes. *J Chromatogr. A.* 1116: 10-19.
- Parliment, T. H. and Spencer, M. D. (1981) Application of simultaneous FID/NPD/FPD detector in the capillary gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr. Sci.* 19: 435-438.
- Peedin G. F. and Warren R. L. (1990) CORESTA Bull., 115.
- Perry, R. H. and Green, D. W. (1984) Perry's Chemical Engineers' Handbook, 6th Ed. McGraw-Hill.
- Phillips, M. and Bacot, A. M. (1953) *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 36: 504-524.
- Qiu, J. and Jin, X. (2002) Development and optimization of organic analysis in tobacco with ion chromatography and suppressed conductivity detection. *J Chromatogr. A.* 950: 81-88.
- Russel, C. A. (2000) Chemistry, Society and Environment: A New History of the British Chemical Industry. *Royal Society of Chemistry*, p 69.
- Sheen, S. J., Dejong, D. W., and Chaplin, J. F., (1979) *Beitr. Tabakforsch. Int.* 10(1): 57-64.
- Shmuk, A. (1953) The Chemistry and Technology of Tobacco, Vols 1,2,3

- Pishchepromizdat, Moscow.
- Smeeton, B. W. (1987) *Rec. Adv. Tob. Sci.* 13: 3-26.
- Snook, M. E., Mason, P. F. and Sisson, V. A. (1986) Polyphenol in the nicotiana species. *Tobacco Science* 30: 43-49.
- Stargardt, J. F. and Canter, G. V. (1985) Automated analysis of glycyrrhizic acid in licorice flavors and cigarette tobacco extracts by high performance liquid chromatography. 39th Tobacco Chemists' Research Conference, Montreal, Quebec.
- Tso, T. C., and Gori, G. B. (1975) *Beitr. Tabakforsch. Int.* 8(4): 167-173.
- Tso, T. C. (1990) Production, Physiology and biochemistry of tobacco plant. Ideals, Inc., Beltsville, Maryland, USA. p 602.
- Wang, B., Yang, S., Chen, G., Wu, Y., Hou, Y. and Xu, G. (2008) Simultaneous determination of non-volatile, semi-volatile, and volatile organic acids in tobacco by SIM-scan mode GC-MS. *J. Separ. Sci.* 31(4): 721-726.
- William, A. C. and Hendel, J. G. (1978) Determination of nonvolatile organic acid and fatty acid in flue-cured tobacco by gas-liquid chromatography. *J. of Chrom. Sci.* 16: 314-317.
- Wilson, R. A., Mookherjee, B. D., and Vinals, J. F. (1982) paper presented at 184th Natl ACS Meeting, Kansas City.
- Wolf, A., Bray, G. A. and Popkin, B. M. (2007) A short history of beverage and how our body treat them. *Obesity Reviews* 9: 151-164.
- Yang, S. S. and Smetena, I. (1998) Determination of tobacco alkaloids using solid phase microextraction and GC-NPD. *Chromatographia* 47(7): 443-448.
- Yang, S. S. and Smetena, I. (1994) Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in tobacco using high-performance liquid chromatography with dual post-column reaction and fluorescence detection. *J Chromatogr. A.* 664: 289-294.