

## LC-MS/MS를 이용한 담배 연기 중 Heterocyclic Amines의 분석

김익중\* · 장기철 · 지상운 · 민혜정 · 김효근 · 황건중

KT&G 중앙연구원  
(2008년 6월 4일 접수)

### Analysis of Heterocyclic Amines in Mainstream Cigarette Smoke using by LC-MS/MS

Ick-Joong Kim\*, Gi-Chul Jang, Sang-Un Ji, Hye-Jeong Min,  
Hyo-Keun Kim, Keon-Joong Hwang

KT&G Central Research Institute  
(Received June 4, 2008)

**ABSTRACT** : This study was carried out to determine the analytical methods for heterocyclic amines(HAs) of the tobacco smoke by LC/MS/MS. HAs have been found in pyrolysate of protein and cooked food including protein, were known the Sugimura compound. HAs content of the smoke were known to exist very low ppb level. Especially, some of HAs are mutagenic and carcinogenic compounds. In according to IARC, the toxicity of N-heterocyclic amines classified IARC class 2A or 2B group. Precursors of these compounds are glutamic acid, protein and free amino acids including tryptophan, therefore, the precursors have been proved in cooked food continuously. This study was investigate multiple analysis methods for HAs and HAs contents of some commercial products. In this study, we used the linear type smoking machine for HAs analysis. At the ISO conditions, mainstream smoke was collected on cambridge filter pad, and then cambridge filter pad was extracted by 0.1% acetic acid. The extracted solution were passed cation exchange SPE cartridge to remove matrix, samples were analyzed using LC/MS/MS on MRM mode. From the result that optimized this methods, the correlation coefficient(R) of the individual compounds were good linearity over 0.999, recovery rate over 96% and the limit of detection were good values between 0.06 to 0.37 ng/mL. In addition, HAs content of some commercial products were in range of 0.02 to 43.8 ng/cig.

**Key words** : mainstream cigarette smoke, heterocyclic amines, LC-MS/MS

Heterocyclic amines (HAs)은 최근에 관심이 집중되고 있는 유해물질 군들 중에 하나이다. 약 20년 전에 Sugimura 등(1977)은 숯불과 그릴로 구운 소고기와 생선에서 높은 돌연변이 유발성 물질을 확인 하였으며 이를 Heterocyclic amines

(HAs)이라 명명하였다(Nagao 등, 1977). 이후 현재까지 약 20여종의 화합물이 식품 중에서 분리 확인되었다. HAs은 베이컨, 구운 소고기와 닭고기, 생선 및 소세지 등 우리가 자주 접하는 육류 관련 식품에서 주로 발견되며 조리 방법에 따

\*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: 82-42-866-5590; fax: 82-42-866-5544; e-mail: kiz@ktng.com)

라 그 함량도 매우 다양하게 나타난다.

Heterocyclic amines의 전구체로는 아미노산과 단백질, 크레아틴 등이 알려져 있으며, 이들은 단독으로 또는 당, 지방산과의 반응을 통해 HAs로 변형되는 것으로 알려져 있다(Skog 등, 1998).

Heterocyclic amines은 식품의 조리과정에서 아주 미량 생성되므로 이들을 분석하고 정량하는 방법은 매우 까다롭다. 정제과정을 거친 시료는 liquid chromatography와 gas chromatography 또는 capillary electrophoresis 등을 이용하여 분석하는 것이 일반적인 방법이다(Pais and Knize, 2000). 그러나 식품 시료의 특성상 시료의 다양한 간섭물질들에 의한 방해효과들 때문에 이들을 효율적으로 분석하는 데에는 많은 문제점이 따르고 있다(Pais, 등, 2000). 따라서 이런 간섭효과를 줄이기 위해 보다 선택적이고 감도가 뛰어난 분석 방법이 필요하며 현재에는 ESI를 이용한 mass spectrometry 방법이 다양하게 이용되고 있다(Barcelo-Barrachina 등, 2004).

본 실험에서는 높은 감도와 선택성 등으로 최근 들어 많이 사용되고 있는 LC-MS/MS를 이용하여 담배연기 중에 존재하는 HAs의 분석법을 확립하였다. Triple quadrupole을 이용한 tandem mass spectrometry 방법은 담배연기 중 다양한 간섭물질들의 co-elution에 의한 간섭효과를 최소화 할 수 있으며, 분석 감도 또한 뛰어나 미량으로 존재하는 HAs의 분석에 적합하였다. 또한 복잡하고 다양한 시료 matrices로부터 분석 컬럼 및 장비를 보호하고 분석방법의 견고성을 높이기 위하여 cation exchange mechanism의 solid phase extraction cartridge를 이용한 시료 정제 방법을 적용하여 분석법을 최적화 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 표준물질 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AaC), 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAaC), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1), 3-

amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)는 Toronto Research Chemical(Downsview, Canada)에서 구입하였으며, 내부표준물질로 사용된 Norharman은 aldrich(Missouri, USA)에서 구입하였다. Solid-phase extraction cartridge는 Waters(Milford, MA, USA)에서 구입하고, 2R4F 표준담배는 Kentucky Tobacco Research & Development Center (University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로 부터 구입하였다. HPLC 등급의 methanol 및 acetonitrile은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, 분석용 시약 등급의 암모니아수 (25%)와 acetic acid는 aldrich(Missouri, USA)에서 구입하였다. 분석에 사용한 제품담배는 국내에서 판매되고 있는 담배를 선별하여 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 담배 흡연 및 시료 추출

담배는 선형 자동흡연장치 (Cerulean SM 450, UK)를 이용하여 ISO 표준흡연조건 (puff volume : 35 mL, puff frequency : 60 초, puff duration 2 초)하에서 5개비를 연소하였다. 입자상 물질은 44 mm Cambridge filter pad를 이용하여 포집하였으며 모든 담배는 흡연 전에 상대습도  $60 \pm 3\%$ 와 온도  $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 의 조건으로 48시간 이상 조화한 후 사용하였다.

담배의 입자상 물질이 포집된 Cambridge filter pad (CFP)는 홀더에서 분리하여 50 mL 삼각플라스크에 넣은 다음 내부표준용액 약 2.0  $\mu\text{g}$ 을 첨가한 후 0.1 % acetic acid 수용액 25 mL를 넣어 30분간 진탕 추출하였다. 추출된 시료는 분석의 견고성과 시료의 간섭물질 제거를 위하여 Waters Oasis MCX<sup>®</sup> solid phase extraction (SPE) cartridge (6 mL, 150 mg)를 이용하여 정제하였다. SPE 카트리지를 manyfold에 고정시킨 후 4 mL의 메탄올을 이용하여 세척하고 이어서 증류수 4 mL를 이용하여 평형화시킨 후 여기에 시료 추출액 20 mL를 일정한 유속으로 주입시켰다. 이후에 시료 간섭물질 제거를 위하여 4 mL의 1 % HCl 수용액과 메탄올을 이용하여 세척하였고, 시료의 용리는 5 %  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeOH}$  용액 4 mL를 이용하여 15 mL 원심분리관에 받았다. 이 용액은

분석 감도 향상을 위하여 질소를 이용하여 약 1 mL 수준으로 농축한 후 LC-MS/MS에 주입하였다. SPE를 이용한 clean up 과정은 Fig. 1에 나타내었다.

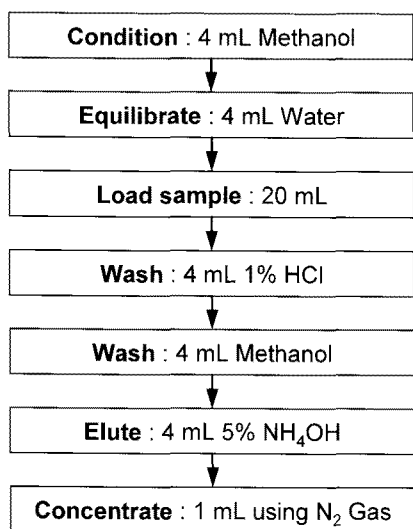


Fig. 1. Schematic flow chart of the SPE procedure.

### 분석 장비 및 MS 조건 최적화

분석에 사용한 LC-MS/MS system은 binary pump system을 사용하는 Agilent 1200 series (USA)와 Applied Biosystem (Foster City, CA, USA)의 PE Sciex API 4000 모델의 조합으로 구성되어 있다. 분석 컬럼은 2.1 mm의 내경과 150 mm의 길이를 갖는 Xtera C<sub>18</sub> 컬럼(Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다. 분석 물질의 분리를 위하여 사용한 이동상은 A : 30 mM ammonium acetate buffer (pH 4.8), B : Acetonitrile이며, 초기에 A : B의 비율을 82 : 18로 유지한 후 10분 까지 A : B의 비율을 40 : 60으로 변화시켜 기울기 용리를 시행하였다. 이때 flow rate는 0.2 mL/min이었다.

Tiriple qudrapole을 이용한 MS/MS의 검출방법은 MRM(mutiple reaction monitoring)방법을 이용하였고, 이온화 방법으로는 ESI를 선택하였다. 최적화된 ionisation source의 작업 조건은 2.5 kV의

electrospray voltage, 11 a.u.의 nebuliser gas, 14 a.u.의 curtain gas, 7 a.u.의 turbo ionspray gas flow rate, 450 °C의 turbo ionspray gas temperature, 30 V의 declustering potential이다. 이 조건은 이동상의 acetonitrile 함량의 중간 값인 30% acetonitrile 조건에서 최적화 되었다. 각각의 기기 조건은 위의 이동상 조건에서 최적의 성능을 발휘 할 수 있도록 실험적으로 결정되었다.

각 화합물의 최적화된 MRM조건은 Table 1에 나타내었다. 각 화합물은 공통적으로 위의 ionisation source 조건에서 제시된 ESI 최적 조건에서 precursor 이온(Q1)을 선택 한 후 실험적으로 최적 colision energy (V)를 선택하여 정량 분석에 사용할 product 이온(Q2)를 선택하였다. AaC는 CE = 38 V에서 M/Z = 184의 Q1과 M/Z = 167의 Q2가 최적조건으로 선택되었으며, MeAaC는 198 → 181, CE = 35 V, PhIP는 225 → 210, CE = 43 V, Trp-P-1은 212 → 195, CE = 36 V, Trp-P-2는 198 → 181, CE = 35 V, Internal STD로 쓰인 Norharman은 169 → 115, CE = 49 V 가 최적조건으로 확립되었다.

Table 1. MRM parameters using by LC-MS/MS

Analyte	Precursor ion → product ion (m/z)	CE (V)
AaC	184 → 167	38
MeAaC	198 → 181	35
PhIP	225 → 210	43
Trp-P-1	212 → 195	36
Trp-P-2	198 → 181	35
ISTD (Norharman)	169 → 115	39

### 결과 및 고찰

현재 식품 중에 존재한다고 알려진 HAs는 약 20여 종이다. 이들 중 가장 대표적인 화합물들의 구조를 Fig 2에 나타내었다. Sugimura 등(2004)에 의하면 이들의 돌연변이 유발성은 MeIQ가 가장

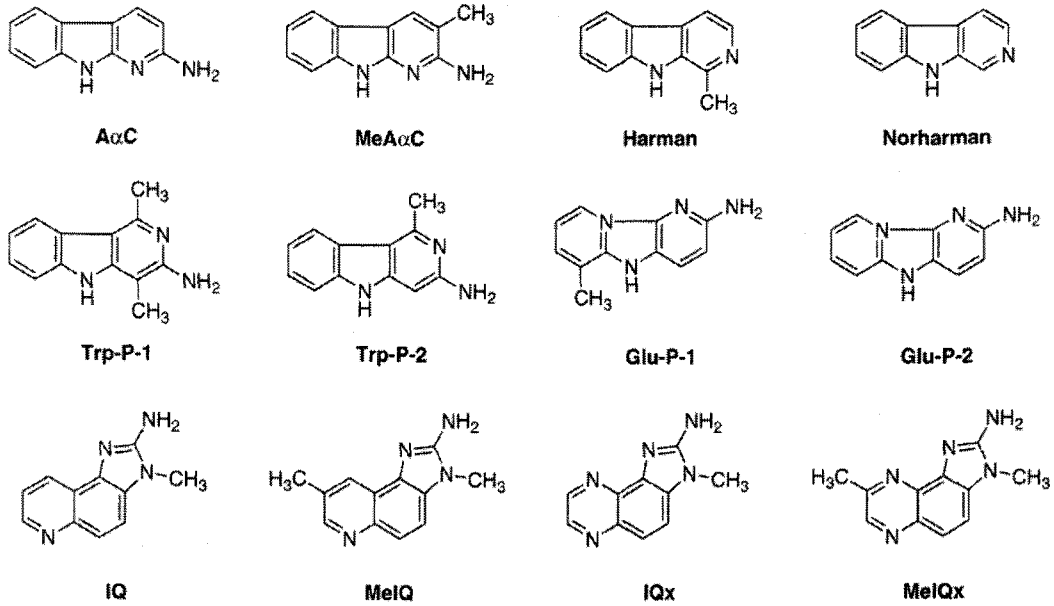


Fig. 2. Structure of some heterocyclic amines

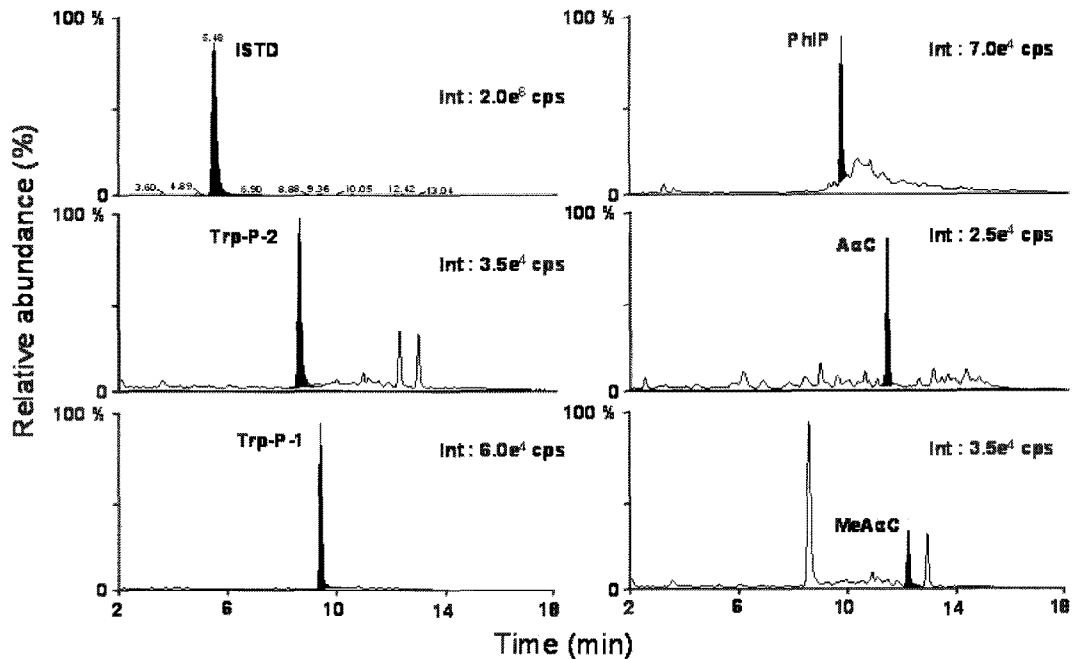


Fig. 3. Chromatogram of heterocyclic amines in 2R4F by LC-MS/MS

높고 IQ > Trp-P-2 > Glu-P-2 > Trp-P-1 > Glu-P-2 > PhIP > AaC > MeAaC 등의 순이다. 그러나 이들의 식품내 존재 비중은 PhIP > MeIQx > 4,8-DiMeIQx > 7,8-DiMeIQx 등의 순서이며 가장 돌연변이 유발성이 높다고 알려진 MeIQ와 IQ는 식품 내에 거의 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. Sugimura 등, (2004) 과 Skog 등, (1998)은 식품 내에 존재하는 HAs의 양을 감안하여 식품을 통하여 흡수되는 HAs의 양에 대한 여러 문헌을 종합하여 보고 하였다. 문헌에 의하면 다소 차이를 보이긴 하나 대다수의 논문에서 HAs의 하루 흡입량은 최고 13.8 µg 수준인 것으로 보고되고 있다(Skog, 등, 1998)

Hoffmann 등은 2001년 논문을 통하여 여러 유해한 화합물을 포함하여 HAs가 담배연기 중에 존재한다고 보고하였다(Hoffman, 등, 2001). Hoffman 등은 막권련 담배의 연기를 분석하여 담배연기 중에 주로 존재하는 HAs가 함량별로

AaC > MeAaC > PhIP > Trp-P-1 > Trp-P-2의 순이며 물질에 따라 0.3 ~ 260 ng/cig. 수준으로 존재한다고 보고한바 있다. 따라서 본 연구에서는 담배연기 중에 존재 함량이 높은 5종의 HAs 화합물에 대하여 분석법을 확립하고 국내의 판매되고 있는 몇종의 담배 중 HAs의 함량을 분석하였다.

Fig. 3은 2R4F 표준담배의 연기를 포집하여 100 ng 수준의 표준물질을 첨가한 시료에 대한 5종의 HAs의 chromatogram을 나타낸 것이다. 모든 분석 물질은 15분 이내에 시료의 matrix의 방해 없이 깨끗하게 분리되어 나옴을 알 수 있다.

본 연구에서 확립된 분석법에 대한 분석유효화 결과는 Table 2에 나타내었다. 회수율은 96.4 ~ 102.3 %이며 검출한계(LOD)는 0.06~0.37 ng/mL, 정량한계는 0.41 ng/mL~1.12 ng/mL 수준으로 나타났다. 모든 검량선은 R=0.999 이상의 직선성을 나타내었다.

Table 2. Limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and recovery for each HAs.

Analyte	Recovery (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
AaC	96.8	0.36	1.09
MeAaC	101.7	0.37	1.12
PhIP	96.4	0.21	0.64
Trp-P-1	99.3	0.14	0.34
Trp-P-1	102.3	0.06	0.41

Table 3. HAs contents of some domestic cigarette product and Ky2R4F reference cigarette.

Analyte	A		B		C		2R4F	
	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)
AaC	18.2	16.9	43.8	23.0	26.6	6.9	121.1	12.6
MeAaC	0.2	10.7	0.6	3.4	1.3	2.9	11.6	14.1
PhIP	3.6	5.9	10.3	8.0	18.5	9.1	43.0	9.1
Trp-P-1	0.02	10.9	0.02	11.7	0.03	19.6	0.10	24.4
Trp-P-1	0.06	33.0	0.08	6.3	0.08	1.6	0.20	14.8

본 연구에서 확립한 분석법을 이용하여 2R4F 표준 담배와 국내에서 시판되고 있는 몇 종의 담배에 대하여 HAs 함량을 분석하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 2R4F 표준담배의 HAs 함량은 AaC가 가장 높았으며, 121.1 ng/cig의 함량을 보였으며, Trp-P-1이 가장 낮은 0.1 ng/cig의 함량을 나타내었다. 국내 시판 담배는 18.2 ~ 43.8 ng/cig 범위의 AaC 함량과 0.02 ~ 0.03 ng/cig 수준의 Trp-P-1 함량을 나타내었다.

## 결 론

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 담배연기 중에 존재하는 heterocyclic amine의 분석법을 확립하였다. 확립된 분석법은 높은 회수율과 낮은 분석한계 값을 갖으며, 담배연기의 간섭물질들에 영향을 받지 않음을 확인하였다. 또한 확립된 분석법을 이용하여 2R4F 표준담배와 몇몇의 국내 시판 담배를 분석한 결과 2R4F 표준담배의 경우 0.2 ~ 121.2 ng/cig, 국내 시판 담배의 경우 0.02 ~ 43.8 ng/cig 수준으로 HAs가 존재하는 것으로 분석되었다.

## 참 고 문 헌

- Barcelo-Barrachina, E., Moyano, E., Puignou, L., and Galceran, M. T. (2004) Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography A* 1023: 67-78
- Skog, K. I., Johansson, M. A. E. and Jagerstad M. I. (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in modern systems and cooked food: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology* 36: 879-896.
- Nagau, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Sugimura, T. (1977) Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett.* 2: 221-226
- Sugimura T., Nagao M., Kawachi T., Honda M., Yahagi T., Seino Y., Sato S., Matsukara N., Shirai A., Sawamura M. and Matsumoto H. (1977) Mutagens-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In *Origins of Human Cancer*, ed. H. H. Hiatt, J. D. Watson and J. A.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. and Nagao, M. (2004) Heterocyclic amines : Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer science* 95: 290-299
- Pais, P. and Knize, M. G. (2000) Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *Journal of Chromatography B* 747: 139-169