

## RRLC를 이용한 담배 연기 중 카보닐 화합물의 신속 분석

이형석\* · 김익중 · 김효근 · 황건중  
KT&G 중앙연구원  
(2009년 6월 10일 접수)

### Rapid Determination of Carbonyl Compounds in Mainstream Cigarette Smoke Using by RRLC

Hyoung-Seok Lee\*, Ick-Joong Kim, Hyo-Keun Kim, Keon-Joong Hwang  
KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea  
(Received June 10, 2009)

**ABSTRACT** : In this study, a simple gradient RRLC method for rapid determination of carbonyl compounds of cigarette smoke was developed. Within 10 min, 8 carbonyl compounds have been separated and identified on ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6×50 mm, 1.8  $\mu$ m) with gradient elution using water and acetonitrile as a mobile phase. RRLC was used for the quantification of carbonyl compounds in mainstream smoke of 3R4F reference cigarette, and evaluated those efficiencies in the recovery, repeatability and reproducibility. The correlation coefficients ( $r^2$ ) for calibration curves of carbonyl compounds were over 0.9998. The developed RRLC method was successfully applied to the analysis of smoke samples and the recoveries of carbonyl compounds were in the range of 97.5~102.1% with RSD<3.1%.

**Key words** : mainstream cigarette smoke, carbonyl compounds, RRLC

담배 연기는 약 4,800여 성분의 화합물이 고체, 액체, 기체의 형태로 혼합되어 있는 에어로졸의 일종으로 알려져 있으며, 이러한 화합물 중에는 흡연 건강에 깊이 관련된 성분들이 있음이 보고되고 있다(Green and Rodgman, 1996). 담배 연기 성분 중 Hoffmann 등(2001)에 의해 건강과 관련이 높은 성분으로 분류되어진 저분자 화합물 중에는 포름알데히드, 아세트알데히드 및 아크로레인

등의 카보닐 화합물이 있다. 이들은 담배연기의 자극성과 섬모독성, 세포독성 등의 생물학적 작용을 지니고 있고 담배 연기 중에서 다른 성분에 비해 상대적으로 많은 양이 생성되어지며 특히 아크로레인과 포름알데히드에 의한 영향이 가장 큰데, 분자량이 증가할수록 그 영향은 감소한다고 보고되고 있다(Houlgate et al., 1989; Smith et al., 2000; Smith et al., 2003).

\*연락처자 : 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: 82-42-866-5653; fax: 82-42-866-5544; e-mail: hslee@ktng.com)*

특히 WHO(World Health Organization)와 미국 소비자 생산 안전 위원회(U.S. Consumer Product Safety Committee) 등에서는 주류연의 카보닐 화합물 중에서 40% 정도를 차지하고 있는 포름알데히드와 아세트알데히드를 담배 연기중의 중요한 화합물로 분류하고 있으며(Hoffmann, 1993, World Health Organization, 2001), 2009년에는 미국 식품의약품국(FDA)이 자국 내에서 생산, 유통되는 모든 담배에 대한 포괄적인 규제를 할 수 있도록 지정하는 HR 1256, "Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act"가 의회 승인되었다. 이러한 상황은 향후 세계 담배 산업에 있어서 유해 물질 및 첨가물에 대해 규제가 더 엄격해 질 것으로 예상되어 규제 측면에서 분석 수요가 더욱 증가될 것으로 예상된다.

담배 주류연 중 카보닐 화합물을 정확하게 정량하기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 많이 사용하고 있는데(Health Canada, 1999), HPLC를 이용할 경우 분석 시간이 약 35분 정도로 다량의 시료 분석 시 많은 시간을 필요로 한다. 하지만 최근에는 분석 기기의 발달로 HPLC보다 높은 압력을 견디는 RRLC(Rapid Resolution Liquid Chromatography), UPLC(Ultra Performance Liquid Chromatography)가 개발되어 분석 조건을 바꿔 적용하면 좀 더 짧은 시간안에 분석이 가능하게 되었다.

따라서 본 연구에서는, 신속·정확하게 담배 주류연 중의 카보닐 화합물을 분석하기 위하여 기존의 HPLC 조건을 변경하여 최적의 RRLC 분석 방법을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 실험에 사용한 표준품 formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazones(DNPH), acetaldehyde-2,4-DNPH, crotonaldehyde-2,4-DNPH, propionaldehyde-2,4-DNPH, butyraldehyde-2,4-DNPH, 2-butanone-2,4-DNPH, acrolein-2,4-DNPH, acetone-2,4-DNPH는 Supelco사(USA)의 특급시약을 사용하였다. 담배 주류연 포집에 사용한 2,4-DNPH는 Aldrich사

의 특급시약을, 과염소산(Perchloric acid)과 Trizma base는 Sigma사의 특급시약을 별도의 정제없이 사용하였다. 3R4F 표준담배는 Kentucky Tobacco Research & Development Center (University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로 부터 구입하였다. 분석과정 중 용매로 사용한 water(J.T.Baker, USA), acetonitrile(Merck, Germany) 및 tetrahydrofuran(Merck, Germany)은 HPLC용 제품을 별도의 정제 없이 사용하였다.

### 표준 용액 제조 및 표준 검정 곡선의 작성

카보닐 화합물 표준품을 이용한 표준 용액 제조는 각 성분별로 필요 농도가 다르므로 표준저장용액 A는 formaldehyde-2,4-DNPH 7.86 mg, 2-butanone-2,4-DNPH 12.05 mg, crotonaldehyde-2,4-DNPH 6.00 mg, butyraldehyde-2,4-DNPH 8.38 mg, acrolein-2,4-DNPH 15.49 mg, propionaldehyde-2,4-DNPH 9.95 mg을 50 mL 용량 플라스크에 취하고 아세트니트릴로 희석하여 완전히 용해시킨다. 표준저장용액 B는 표준저장용액 A 5 mL와 aceton-2,4-DNPH 6.16 mg, acetaldehyde-2,4-DNPH 16.10 mg을 20 mL 용량 플라스크에 취하고 아세트니트릴로 희석하여 완전히 용해시킨다. 검정 곡선 작성용 표준 용액은 표준저장용액 B 혼합용액을 아세트니트릴로 희석하여 formaldehyde가 0.0351, 0.0702, 0.1404, 0.2808, 0.5615  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 각각 만든 후 RRLC에 주입하여 얻은 농도별 피크면적으로 회귀곡선을 만들어 각 성분별 검량식을 얻었다.

### 시험 용액의 조제

카보닐 화합물 분석을 위한 시험 용액은 KT&G In house manual에 따라 제조하였다. 표준담배 3R4F를 ISO 3308에 따라 선형 자동 흡연장치(Cerulean SM 450, UK)를 이용하여 ISO 표준흡연 조건 (puff volume : 35 mL, puff frequency : 60 초, puff duration : 2 초)하에서 연소하였다. 흡연 전에 ISO의 권고 사항인 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 와  $60 \pm 3\%$ 의 조건으로 48시간 이상 조화한 후 사용하였으며, 전처리 방법은 3개비를 흡연하여 80 mL의 2,4-DNPH 용액이 채워진 impinger에 포집한 후

포집 용액 4 mL와 0.2% trizma base 6 mL를 혼합하고 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF syringe filter로 여과하여 auto sampler용 2 mL vial에 담았다.

HPLC 조건의 최적화

본 연구에서 카보닐 화합물의 분석을 위해 사용한 LC는 Agilent 1200 series (Germany)로 degasser, Binary SL pump, High Performance SL sampler, 그리고 Diode array SL detector로 구성되었다. 분석 컬럼은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6 $\times$ 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ , Agilent)를 사용하였고, 주입량은 10  $\mu\text{L}$ , 유속은 2 mL/min. 컬럼 온도는

30  $^{\circ}\text{C}$ , 자외선검출기 흡광파장은 364 nm로 설정하여 분석하였다. 이동상으로는 (A) acetonitrile : tetrahydrofuran = 5 : 1 로 제조하였고, (B) water를 이용하여 분석하였다(Table 1).

분석법 검증

카보닐 화합물 표준저장용액 B를 아세트니트릴로 희석하여 제조된 표준용액을 Formaldehyde가 0.175  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 3R4F 시험용액에 첨가한 후 RRLC에 주입하여 얻은 피크 면적에서 3R4F 시험용액의 피크면적을 제한 후 검량식에 대입하여 얻은 농도를 이용하여 회수율, 검출한계 (LOD) 및 정량한계(LOQ)를 계산하였다. 그리고, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내 정밀도와 정확도를 측정하였고, 3일 동안 동일 실험을 반복 수행하여 일간 정밀도를 측정하였다.

Table 1. Composition of the mobile phase employed in the gradient RRLC system

Time(min)	Composition of mobile phase	
	Acetonitrile : Tetrahydrofuran (%) (5 : 1)	Water (%)
0	40	60
2.0	40	60
7.0	50	50
7.5	90	10
8.5	90	10
9.0	40	60
10.0	40	60

결과 및 고찰

담배 주류연 중 카보닐 화합물 함량의 신속한 정량 분석을 위하여, 이전에 카보닐 화합물 분석에 사용하고 있는 HPLC 분석방법의 컬럼, 기온기 용리조건 및 유속 등의 분석조건을 변경하여 새로운 분석 조건을 확립하였다. 이전의 분석 조건은 8종의 카보닐 화합물을 비교적 높은 정확성으로 분리할 수 있었지만, 총 분석시간이 35분으로 현재와 같이 분석 시료가 증대될 경우에는 분석시간이 길다는 단점이 있었다(Fig. 1). 새로운 분석조

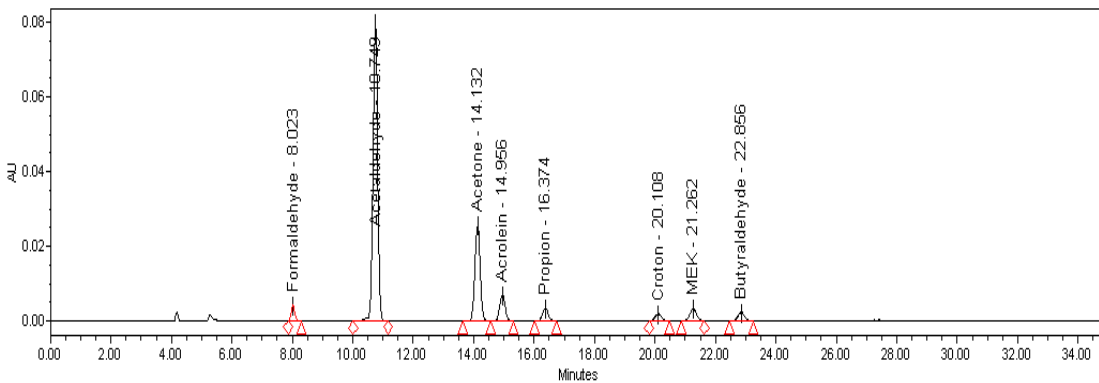


Fig. 1. HPLC chromatogram for 8 carbonyls standards

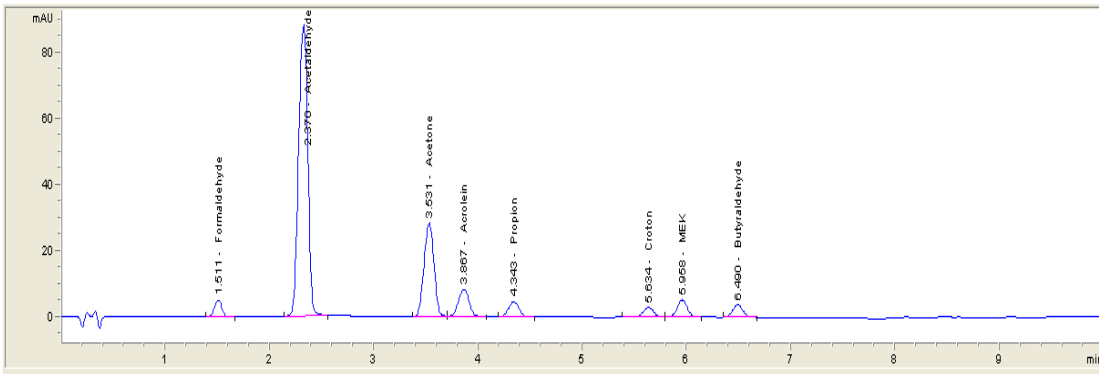


Fig. 2. RRLC chromatogram for 8 carbonyls standards

Table 2. Calibration data of the eight examined carbonyl compounds

Analyte	Calibration equation		$r^2$
	a	b	
Formaldehyde	177.938801	-0.1778249	0.9999
Acetaldehyde	137.155262	-0.7521619	1.0000
Acetone	101.404697	-0.2484392	0.9999
Acrolein	132.987408	-0.2861861	0.9999
Propionaldehyde	107.936038	-0.2060985	0.9999
Crotonaldehyde	97.831704	-0.3556469	0.9998
2-Butanone	83.105860	-0.4180554	0.9999
Butyraldehyde	86.028860	-0.0347783	0.9999

건을 이용한 결과, 8종의 카보닐 화합물의 머무름 시간은 formaldehyde 1.5분, acetaldehyde 2.4분, acetone 3.6분, acrolein 4.0분, propionaldehyde 4.4분, crotonaldehyde 5.7분, 2-butanone 6.0분, butyraldehyde 6.6분으로 7분 이내에 검출되었으며 총 분석시간도 10분으로 단축할 수 있었다. 개발된 분석 방법으로 얻어진 카보닐 화합물 표준품의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 개발된 RRLC 방법으로 주류연 내의 카보닐 화합물 8종을 동시 분석 시 서로간의 간섭이 생기지 않는다는 것을 확인하였다.

본 연구에서 개발된 카보닐 화합물 신속분석 조건의 정량 분석 직선성을 각각의 카보닐 화합물별

로 살펴보고 개별 카보닐 화합물의 정량곡선을 구한 다음 상관계수값 ( $r^2$ )을 구해본 결과, 0.9998이상으로 높은 직선성을 나타내었다(Table 2).

카보닐 화합물 표준용액을 이용하여, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내(intra-day) 정밀도를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 개발된 방법의 일내 정밀도는 RSD(relative standard deviation)값이 2.2% 이하, 일간 정밀도는 2.4% 이하로 매우 높은 정밀도와 정확도를 나타내었다(Table 3).

개발된 방법의 정확도를 검증하기 위하여 formaldehyde가 0.175  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 표준저장용액 B를 3R4F 주류연 시료에 첨가한 후 카보닐 화

Table 3. Intra- and inter-day accuracy and precision of the newly developed method

Analyte	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day(n=9)		Inter-day(n=3)	
		Measured ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)	Measured ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)
Formaldehyde	0.175	0.180 $\pm$ 0.002	1.1	0.181 $\pm$ 0.001	0.6
Acetaldehyde	4.943	5.044 $\pm$ 0.109	2.2	5.049 $\pm$ 0.081	1.6
Acetone	2.347	2.409 $\pm$ 0.032	1.3	2.427 $\pm$ 0.058	2.4
Acrolein	0.575	0.589 $\pm$ 0.008	1.4	0.593 $\pm$ 0.012	2.0
Propionaldehyde	0.379	0.387 $\pm$ 0.008	2.0	0.388 $\pm$ 0.007	1.7
Crotonaldehyde	2.263	0.269 $\pm$ 0.005	1.7	0.270 $\pm$ 0.005	2.0
2-Butanone	0.538	0.555 $\pm$ 0.006	1.0	0.562 $\pm$ 0.013	2.3
Butyraldehyde	0.374	0.384 $\pm$ 0.002	0.5	0.389 $\pm$ 0.008	2.1

Table 4. Limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and recovery for each carbonyl compounds

Analyte	Recovery (%)	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Formaldehyde	98.7	0.003	0.009
Acetaldehyde	99.6	0.004	0.012
Acetone	99.4	0.004	0.013
Acrolein	97.9	0.003	0.010
Propionaldehyde	97.5	0.004	0.011
Crotonaldehyde	102.1	0.002	0.007
2-Butanone	101.7	0.004	0.013
Butyraldehyde	98.9	0.004	0.012

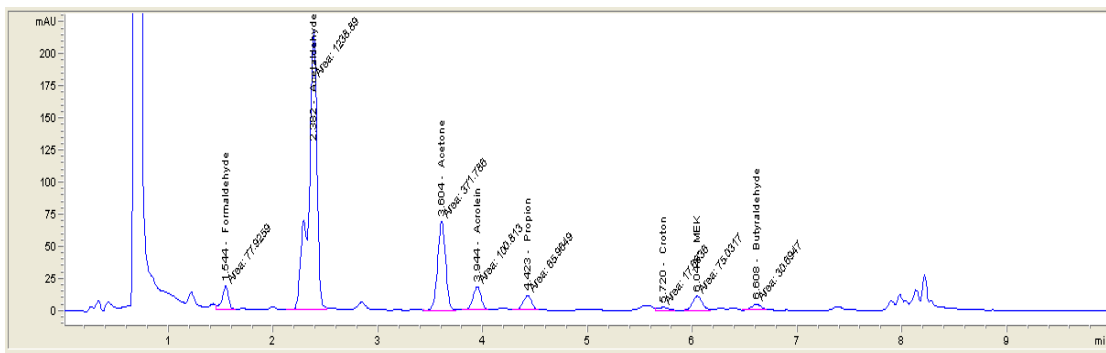


Fig. 3. RRLC chromatogram for 8 carbonyl compounds in mainstream smoke concentrate

합물의 회수율을 구해본 결과 0.174~4.651  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위에서 97.5~102.1%로 양호하였다 (Table 4).

개발된 방법의 시료 적용성을 알아보기 위하여 3R4F 표준담배를 ISO 흡연 조건으로 포집하여 제조된 시험용액을 개발된 RRLC 방법에 적용한 크로마토그램은 Fig. 3과 같다. 결과에서 보듯이 시험 용액에서 카보닐 화합물들이 서로 간섭없이 분리된 것을 확인할 수 있었다. 또한 시험 용액을 5회 반복 분석하여 반복성을 시험해본 결과 3R4F 연기 샘플내의 카보닐 화합물들의 RSD(%) 값은 5.0% 이하로 상당히 높은 수준을 나타내었다 (Table 5).

Table 5. The contents of eight carbonyl compounds in 3R4F mainstream smoke by RRLC method

Compound	Contents ( $\mu\text{g}/\text{cig.}$ )	RSD (%)
Formaldehyde	22.85	2.2
Acetaldehyde	598.58	2.5
Acetone	260.21	4.8
Acrolein	45.65	4.5
Propionaldehyde	43.00	5.0
Crotonaldehyde	11.83	4.7
2-Butanone	67.46	3.1
Butyraldehyde	27.57	4.4

## 결 론

본 연구에서는 RRLC를 이용하여 담배연기 중에 존재하는 카보닐 화합물의 신속 분석법을 확립하였다. 확립된 분석법은 양호한 회수율과 분석한계 값을 가지며, 담배연기의 복잡한 기질에 간섭을 받지 않음을 확인하였다. 또한 확립된 분석법을 이용하여 분석한 결과 기존의 HPLC 분석법보다 용매 및 소요 시간을 1/3로 줄일 수 있는 것으로 나타났으며, 앞으로 담배 연기 중 카보닐 화합물 분석에 적합하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- 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 Adv. tob. Sci.* 22 : 131-304.
- Health Canada (1999) Determination of Selected Carbonyls in Mainstream Tobacco Smoke. Tobacco Control Programme, Health Canada Official Method T-104.
- Hoffmann, D. (1993) In Toxicity Testing Plan. US Consumer Product Safety Committee, Washington, DC.
- Hoffmann, D., Hoffmann, L., and El-Bayoumy, K. (2001) The Less Harmful Cigarette: A Controversial Issue. A Tribute to Ernst L. Wynder, *Chem Res Toxicol.* 14: 767-790.
- Houlgate, P. R., Dhingra, K. S., Nash, S. J. and Evans, W. H. (1989) Determination of formaldehyde and acetaldehyde in mainstream cigarette smoke by high performance liquid chromatography. *Analyst* 114: 350-360.
- ISO 3308:2000(E) Routine Analytical Cigarette Smoking Machine Definitions and Standard Conditions.
- Smith, C. J., and Hansch, C. (2000) The Relative Toxicity of Compounds in Mainstream Cigarette Smoke Condensate. *Food Chem. Toxicol.* 38, 637-646.
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Garg, R., and Hansch, C. (2003) IARC Carcinogens Reported in Cigarette Mainstream Smoke and Their Calculated Log P Values. *Food Chem. Toxicol.* 41: 807-817.
- World Health Organization (2001) Advancing Knowledge on Regulating Tobacco Products World Health Organization. Geneva, Switzerland.