Journal of the Korean Society of
Tobacco Science Vol. 31, No. 2, 107～114(2009)
Printed in Republic of Korea

GC/MS를 이용한 담배연기중 Melamine과 Cyanuric Acid 분석

곽호근* · 이수현 · 임흥빈
충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
(2009년 11월 9일 접수 ; 2009년 11월 27일 수정 ; 2009년 12월 4일 승인)

Analysis of Melamine and Cyanuric Acid in Cigarette Mainstream Using GC/MS

Ho-Geun Kwak*, Soo-Hyun Lee, Heung-Bin Lim
Department of Industrial Plant Science & Technology, Chungbuk National University Choengju, 361-763, Republic of Korea
(Received November 9, 2009; Revised November 27, 2009; Accepted December 4, 2009)

ABSTRACT : In this study, we investigated the existence of melamine and cyanuric acid in cigarette smoke because leaf tobacco contains lots of nitrogen compounds and they are capable of pyrolytic synthesis while smoking. The extraction and derivatization conditions of two compounds were performed according to the procedure of U.S. Food and Drug Administration(FDA). Ky3R4F as reference cigarette was smoked on ISO condition(Puff volumne : 35 ml, duration : 60 sec, Interval : 2 sec). Compared with the results Ky3R4F and standard solution, retention time of two compounds was not corresponded. As a result, we concluded that melamine and cyanuric acid were not existed in cigarette smoke.

Key word **: melamine, cyanuric acid, cigarette smoke.**

최근 미국에서는 애완용 개와 고양이가 중국산 가축사료를 먹고 사망하는 일이 발생하여, 대대적인 반납이 이루어지기도 하였다. 또한 중국에서는 분유를 먹은 유아들이 신장의 결석이나 신장에 관련된 질환으로 사망하는 경우가 있고, 이것들이 가축사료나 분유에 첨가된 melamine이 오염원으로 작용해 신장 결함을 일으켜 발생한 것으로 확인되었다(Puschner et al., 2007; Guan et al., 2009). Melamine이 인체에 미치는 독성에 관한 메카니즘으로 melamine은 가수분해 산물인 cyanuric acid와 동등한 양의 두 성분이 수용액 상태에서 수소결합으로 인한 광범위한 2차원의 결합체, 즉 melamine-yanurate를 형성하고,(Perdigão et al., 2006; He et al., 2008) 이 복합체가 인체내에서 결정화가 되면, 신장의 결석을 초래하여 극심한 신장 결함을 일으킨다고 보고되고 있다(Thomson et al.,2008; Dobson et al., 2008; Reimschuessel et al., 2008). 가축사료나 분유에서 단백질 함량의 측

*연락저자 : 361-763 충북 천주시 흥덕구 성봉로 410번지, 충북대학교 특용식물학과
*Corresponding author : *Department of Industrial Plant Science & Technology, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Republic of Korea (phone: 82-43-261-3288; fax: 82-43-276-1030; e-mail: luffey@nate.com)*

정이 고전적인 켈달 분석법 등으로 이루어지고 있다. 그러나 이 분석법은 질소원의 질소와 단백질원의 질소에 대한 구별이 어렵기 때문에 단백질을 첨가하기 보다는 질소함량이 높은 melamine을 첨가하여 인위적인 조작을 하였고, melamine에 의한 파동이 이러한 과정 중에서 비롯되었다. 따라서 기존의 분석방법보다 효과적인 melamine과 cyanuric acid에 관한 분석이 필요하게 되었다(WHO, 2009).

Melamine과 cyanuric acid의 분석방법으로는 GC-MS를 이용하거나(Yokley et al., 2000), TMS trimethylsilyl group) 유도체화를 시켜 분석하는 방법(Agilent, 2008; FDA, 2009; Li et al., 2009) 또는 GC-MS/MS를 이용하는 방법이 보고되고 있다.(Agilent, 2009) 또한 HPLC(Yokley et al., 2000; Pukkila et al., 1987; Cantu et al., 2000; Ehling et al., 2007), LC-MS(Johes and Patel, 2007) 및 LC-MS/MS(Andersen et al., 2008; Filigenzi et al., 2008) 를 이용한 분석 방법이 있다. 이 외에도 모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis)장치를 이용한 분석방법(Yan et al., 2009)과 ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)을 이용하여 분석하는 방법(Garber, 2008)이 연구되었다. 이와 같은 분석방법들에 대한 melamine과 cyanuric acid의 분석은 토양(Yokley et al., 2000), 유제품(Li et al., 2009), 공기(Pukkila et al., 1987), 수분(Cantu et al., 2000), 곡류(Ehling et al., 2007), 어류(Johes and Patel, 2007), 신장 조직(Filigenzi et al., 2008) 등 다양한 범위에서 이루어져 왔다.

Melamine은 3가지의 다른 전구체(urea, dicyandiamide, hydrogen cyanide)로부터 생성된다. 이 중에서 urea는 흡열 반응에 의한 분해 후 발열반응에 의한 중합 과정을 거쳐서 melamine을 생성한다. 또한, 이 과정은 공업적으로 melamine 합성에 이용되고 있다(WHO, 2009). 한편, 담배연기에는 4,800 여가지의 성분이 존재하고, 함질소 화합물이 많이 존재한다고 보고되어 있며, urea는 담배의 생산공정 중 일부 첨가한다고 보고되어 있다(Dube and Green, 1982; Doull et. al., 1994). 따라서 잎담배의 열분해와 생합성 과정 중에서 urea와 같은 함질소 화합물이 담배연기 중 melamine과 cyanuric acid로 이행될 가능성이 있지만, 아직 두 성분에 관한 연구는 미비하다. 따라서 본 연구에서는 표준담배를 ISO조건에서 연소하고, GC/MS를 이용하여 담배연기 중 melamnie과 cyanuric acid의 존재에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Melamine, 2,6-diamino-4-chloro-pyrimidine, pyridine 등은 Aldrich(USA)사의 제품을 사용하였고, cyanuric acid는 TCI America(Japan)사의 제품을 사용하였다. 1 % TMCS(trimethylchlorosilane)로 된 BSTFA(bistrifluoroacetamide)는 Supelco(USA)사의 제품을 사용하였고, diethylamine은 Junsei(Japan)사 제품, acetonitrile은 Merck(Germany)의 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 표준담배(Ky3R4F)는 Kentuky대학(USA)으로부터 직접 구입하여 실험에 사용하였다.

담배 흡연

표준담배(Ky3R4F)는 흡연 전에 상대습도 60 ± 3 %, 온도 22 ± 1 ℃의 조화실에서 48시간 이상 조화시킨 후 사용하였고, 담배 연기 포집은 Cerulean(UK)사의 자동흡연장치(ASM 500, Liner type)을 사용하여, 표준담배 5개피를 ISO 표준흡연조건(흡연 부피 : 35 ml, 흡연 주기 : 60초, 흡연 시간 : 2초)에서 연소시키고, 연기응축물은 44 mm Cambridge Filter Pad로 포집하였다.

시료 추출

시료의 추출과정은 미국 FDA의 추출방법(FDA, 2009)을 참고하여 수행하였고, Table 1과 같다. 연기 포집이 끝난 Pad에 추출용매 20 ml(10:40:50/diethylamine:water:acetonitrile)을 첨가하여 30분간 초음파 처리한 다음 0.45μm nylon filter discs에 여과하였다. 여과한 시료는 분석을 위해 유도체화를 시켰다. 시료의 200 μl을 취하여, 질소 가스를 이용해 완전 농축을 시킨 후, 200 μl의 Pyridine을 첨가해 준 뒤, 유도체화를 위한 1 % TMCS로 된 BSTFA를 200μl 첨가하고, ISTD stock solution (2,4-diamino-4-chloropyridine, 5 ug/ml in pyridine)

Table 1. scheme of sample extraction process.

Extract filter pad with 20ml extraction solvent (10:40:50/DEA:D.W:ACN).

↓

Sonicate for 30 minutes.

↓

Transfer 200µl to a GC vial.

↓

Evaporate to dryness(nitrogen).

↓

Add 200µl pyridine, 200µl BSTFA and 100µl ISTD.

↓

Incubate at 70℃ for 45 minutes.

을 100 µl 첨가한다. 여기서 ISTD의 최종농도는 1 µg/ml이 되도록 하였다. 위 과정을 마친 다음 70 ℃에서 45분간 반응시켜 분석시료로 사용하였다.

기기 및 분석 조건

Melamine과 cyanuric acid 분석은 Agilent 6890 GC/5975 MSD system(USA)를 사용하였다. Column은 DB-5ms(30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm firm thickness, J&W, USA)를 이용하였고, MS분석은 Electron Impact Ionization(EI) 방법으로 분석하였다. 그 밖의 GC와 MS조건은 기존 Agilent사의 분석조건(Agilent, 2008)을 수정하여 사용하였고, 그 조건은 Table 2과 같다.

검정 시험

Melamine과 cyanuric acid의 정량을 위한 검량선을 작성하기 위해, 각각의 표준시약을 diethylamine/water(20:80) 용액에 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 µg/ml 의

Table 2. GC/MS conditions of melamine and cyanuric acid.

GC parameter	
Column	DB-5ms(30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness)
Injection mode	Pulsed splitless(25 ml/min at 0.5min)
Temperature	280℃
Volume	1µl
Carrier Gas	He, constant flow, 1.3 ml/min
Oven parameter	75 ℃(1 min) → 30 ℃/min → 300 ℃(2 min)
Transfer line temp.	290 ℃
MS condition(MS-EI-Sim)	
Acquistion parameters	Selected ion monitering
Source/Quadrupole temp.	230 ℃, 150 ℃
Electron energy	70 eV
Sim mode ion(m/z)	
Melamine	99, 171, 327*(target ion), 342 m/z
Cyanuric acid	188, 330, 345* m/z
DACP(ISTD)	99, 237, 273*, 288 m/z

농도로 희석하여, 전처리 과정을 거친 후 분석하였다.

회수율 시험은 추출용매에 표준용액을 3단계의 농도로 조제하고, 유도체화 과정을 거쳐 3회 반복하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Melamine과 cyanuric acid 표준용액(0.5 ~ 4.0 μg/ml)을 GC/MS 분석한 결과는 Fig. 1에 나타냈다. 상관계수(R^2)의 값이 melamine은 0.998, cyanuric acid은 0.999로 높은 직선성을 나타내었고, 두 성분의 chromatogram의 area 값은 농도에 따라 상대적인 비율을 잘 나타내었다. 정밀도와 정확성을 위한 회수율 시험에 대한 결과는 Table 3에 나타내었다. Melamine은 농도별로 96.77 % ~ 100.13 %, cyanuric acid는 72.71 % ~ 91.83 %의 회수율을 나타내었다. Cyanuric acid는 melamine의 회수율에 비해 농도가 감소할수록 비교적 낮은 회수율을 나타내었지만 두 성분 모두 유도체화 과정을 거친 후 GC/MS 분석하는 방법에 적용하는 것에는 문제가 없다고 사료된다.

Melamine과 cyanuric acid의 전체 chromatogram들을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2의 A는 Ky3R4F 표준담배, Fig. 2의 B는 Ky3R4F의 추출용매에 표준용액을 첨가한 것, Fig. 2의 C는 표준용액의 chromatogram을 각각 나타내었고, Fig. 2의 D는 각각의 chromatogram들을 합성하여 나타내었다. A와 B의 chromatogram을 비교한 결과, melamine과 cyanuric acid의 peak 대한 retention time의 일치를 보이지 않았다. 또한 Ky3R4F 표준담배 중 melamine과 cyanuric acid의 증감을 확인하기 위해, Ky3R4F 표준담배의 추출물에 표준용액(melamine : 0.1 μg/ml, cyanuric acid : 0.1 μg/ml)을 첨가한 시료의 분석 결과는 0.093 μg/ml, cyanuric acid는 0.068 μg/ml를 각각 나타내었다.

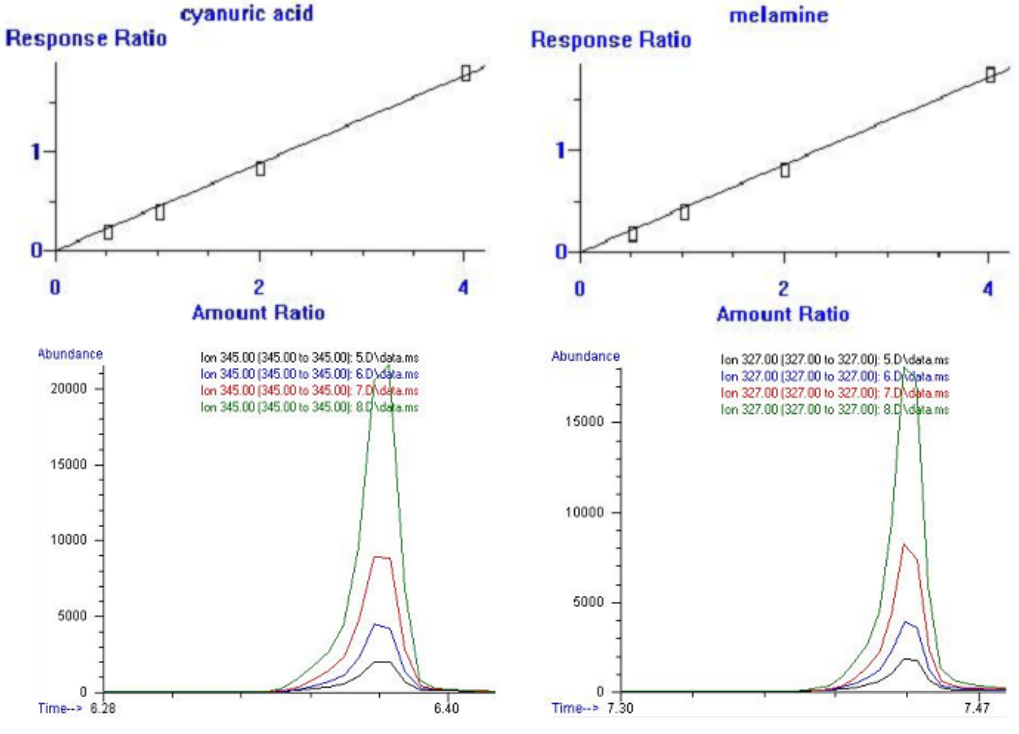

Fig 1. Calibration curves with ion chromatogram of melamine and cyanuric acid.

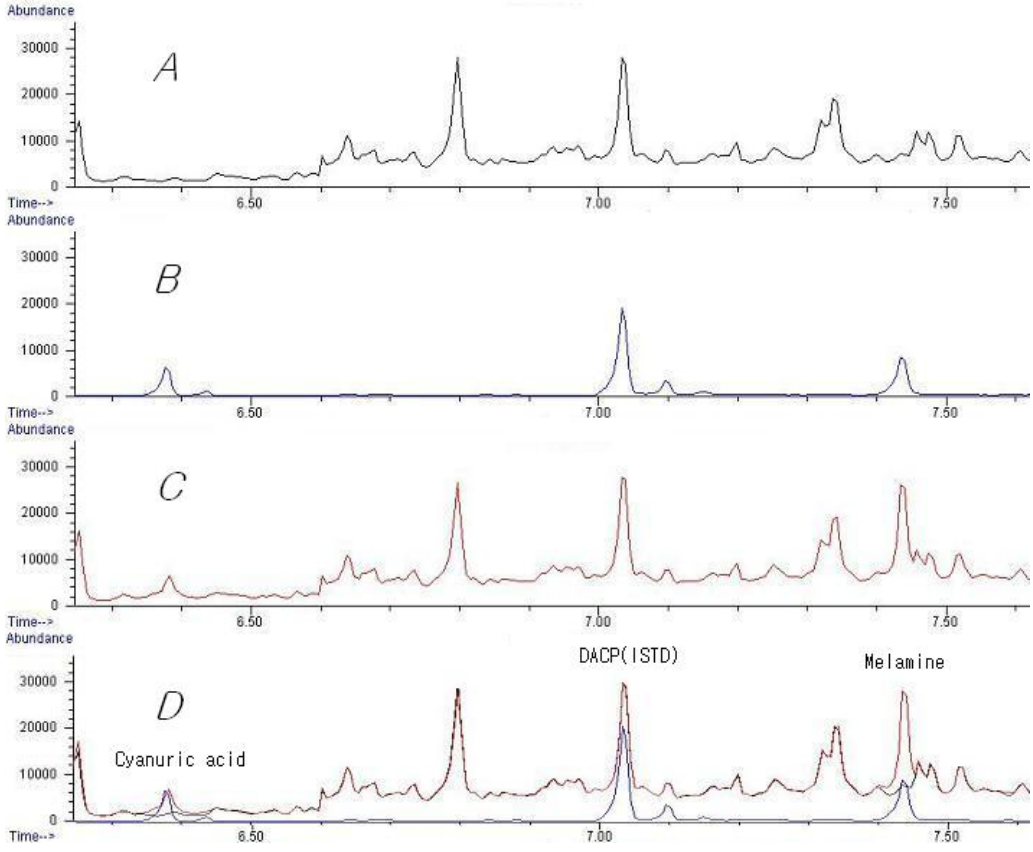

Fig 2. GC/MS chromatograms of melamine and cyanuric acid.
(A : Ky3R4F, B : Standard, C : Ky3R4F with Standard, D : Combination of A, B and C)

Table 3. Recovery rate of melamine and cyanuric acid.

Compound	Spiked level (μg/ml)	Recovery (%)
Melamine	0.08	99.46±3.47[1)]
	0.10	96.77±1.12
	0.30	100.13±5.96
Cyanuric acid	0.08	72.71±1.38
	0.10	86.40±0.82
	0.30	91.83±3.74

[1)] Standard deviation

이 결과, 표준용액에 비해 두 성분의 뚜렷한 증가를 보이지 않는 것을 확인하였다.

Fig. 3은 melamine과 cyanuric acid의 각각의 이온 chromatogram을 나타내었다. Ky3R4F 표준담배의 시료에서 두 성분에 대한 이온이 검출되지 않았다. 이 결과들은 담배의 생산과정 중 첨가제인 urea와 연기성분인 hydrogen cyanide와 같은 질소화합물이 담배가 연소 시 열분해나 합성으로 인하여 melamine과 cyanuric acid가 합성되어 연기로 이행되지 않음을 나타내는 결과라고 판단하였다.

결 론

본 연구에서는 풍부한 질소함량을 가진 담배가

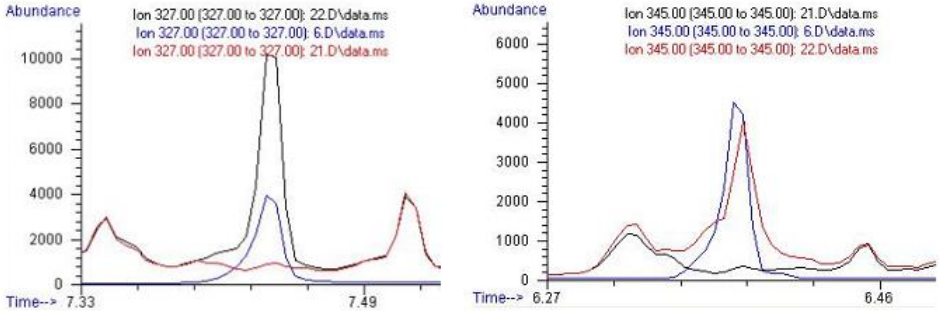

Fig 3. Ion chromatograms of Melamine and Cyanuric acid from Ky3R4F.

연소 시 열에 의한 합성이나 열분해로 인해 melamine과 cyanuric acid가 연기로서의 이행되는지를 분석하기 위해 GC/MS를 이용하여 담배연기 중 두 성분에 대한 성분 분석을 수행하였다. 이들 성분은 미국 FDA 방법을 참고하여 추출 및 유도체화하였다. 흡연은 표준담배(Ky3R4F)를 사용하여, ISO 조건하에 연기를 포집 하였다. 정량을 위한 검량선의 상관계수(R^2)는 melamine은 0.998, cyanuric acid은 0.999의 높은 직선성을 나타냈으며, 회수율은 melamine과 cyanuric acid 각각 98.79 %와 83.65 %이었다. 표준담배(Ky3R4F) 담배연기를 분석한 결과, melamine과 cyanuric acid가 검출되지 않았다. 이와 같은 결과는 담배연기 중에 melamine과 cyanuric acid가 존재하지 않는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

Puschner, B., Poppenga, R. H., Lowenstine, L. J., Filigenzi, M. S. and Pesavento, P. A.(2007) Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. J. Vet. Diagn. Invest. 19:616-624

Guan, N., Fan, Q., Ding, J., Zhao, Y., Lu, J., Ai, Y., Xu, G., Zhu, S., Yao, C., Jiagn, L., Miao, J., Zhang, H., Zhao, D., Liu, X. and Yao, Y. (2009) Melamine-contaminated powdered formula and urolithiasis in young children. N. Engl. J. Med. 360:1067-1074

Perdigão, L. M. A., Champness, N. R. and Benton, P. H.(2006) Surface self-assembly of the cyanuric acid-melamine hydrogen bonded network. Chem. Commun. 5:538-540

He, L., Liu, Y., Lin, M., Awika, J., Ledoux, D. R., Li, H. and Mustapha, A.(2008) A new approch to measure melamine, cyanuric acid and melamine cynurate using surfase enhanced raman spectroscopy coupled with gold nanosubstrates. Sens. & Instrumen. Food Qual. 2:66-71

Thompson, M. E., Lewin-smith, M. R., Kalasinsky, V. F., Pizzolato, K. M., Fleetwood, M. L., Mcelhaney, M. R. and Johnson, T. O.(2008) Characterization of melamine-containing and Calcium oxalate crystals in three Dogs with suspected pet food-induced nephrotoxicosis. Vet. Pathol. 45:417-426

Dobson, R. L. M., Motlagh, S., Quijano, M., Thomas Cambron, R., Baker, T. R., Pulllen, A. M., Regg, B. T., Bigalow-Kern, A. S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. and Daston, G. P(2008) Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. Toxicological sciences. 106:251-262

Reimschuessel, R., Gieseker, C. M., Miller, R. A., Ward, J., Boehmer, J., Rummel, N., Heller,

D. N., Nochetto, C., Hemakanthi de Alwis, G. K., Bataller, N., Aendersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Satzger, R. D., Crowe, J. B., Wilder, N. R., Reinhard, M. K., Roberts, J. F.and Witkowski, M. R.(2008) Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric aicd to fish and pigs. American Journal of Veterinary Research. 69:1217-1228

WHO.(2009) Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid:Report of a WHO Expert Meeting in collaboration with FAO supported by Health Canada

Yokley, R. A., Mayer, L. C., Ruhi Rezaaiyan., Manuli, M. E. and Cheung, M. W.(2000) Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD. J. Agric. Food Chem. 48:3352-3358

Agilent Technologies.(2008) Trace-level analysis of melamine in milk products on agilent 7890A/5975C GC/MSD using a New agilent J&W DB-5ms ultra inert column and sampliq SCX cartridges.

U. S. Food and Drug Administration.(2009) GC-MS Screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid.

Li, J., Qi, H. Y. and Shi, Y. P.(2009) Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1216:5467-5471

Agilent Technologies.(2009) Rapid screening and confirmation of melamine and its analogs in baby formula and soy products using triple quadrupole GC/MS and Backflushing.

Pukkila, J., Peltonen, K. and Savolainen, T.(1987) Determination of melamine in air by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Chromatography A. 411:409-414

Cantu, R., Evans, O., Kawahara, F. K., Shoemaker, J. A. and Dufour, A. P.(2000) An HPLC method with UV detection, pH control, and Reductive ascorbic acid for cyanuric acid analysis in water. Anal. Chem. 72:5820-5828

Ehling, S., Tefera, S. and Ho. I. P.(2007) High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid. Food Additives and Contamination. 24:1319-1325

Johes, K. and Patel, K.(2007) Analytical method for the quantitative determination of cyanuric acid as the degradation product of sodium dichloroisocyanurate in urine by liqid chromatography mass spectrometry. Journal od Chromatography B. 853:360-363

Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Clack, S. B., Madson, M. R., Gieseker, C. M., Miller, R. A., Rummel, N. G. and Reimschuessel, R.(2008) Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapoa, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 56:4340-4347

Filigenzi, M. S., Puschner, B., Aston, L. S. and Poppenga, R. H.(2008) Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 56:7593-7599

Yan, N., Zhou, L., Zhu, Z. and Chen, X.(2009) Determnation of melamine in dairy products, fish feed, and fish by Capillary zone elecrtophoresis with diode array detection. J.

Agric. Food Chem. 57:807-811

Eric A. E. Garber.(2008) Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology. Journal of Food Protection. 71:590-594

Dube, M. F. and C. R. Green.(1982) Methods of collection of smoke for analytical purposes. Rec. Advanc. Tob. Sci. 8:42-102

Doull, J., Frawley, J. P., George, W.(1994) List of ingredients added to tobacco in the manufacture of cigarettes by six major American cigarette companies. Tobacco Journal International. 196:32-39