

니코틴 알카로이드, 환원당, 전당, 암모니아의 동시자동분석법

김신 일 · 황건 중 · 김찬 호

한국인삼연초연구소 분석연구실

Simultaneous - Automated Determination of Nicotine Alkaloid, Reducing Sugar, Total Sugar and Ammonia on the Same Extract of Tobacco Leaf.

Sin-Il Kim, Keon-Joong Hwang and Chan-Ho Kim

Lab. of Analysis

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul, Korea

(Received Mar. 28, 1982)

Abstract

A procedure for the simultaneous determination of reducing sugar, nicotine alkaloid, total sugar and ammonia has been developed.

The four components of tobacco extracted from ground tobacco sample with 2% acetic acid were determined with a Technicon autoanalyzer system.

The relative errors in burley and flue-cured tobacco leaves were 3.6% in comparison with each official methods.

서 론

담배중의 화학성분을 분석함에는 두가지의 특징적인 면모를 가지는 것으로 보여진다. 그중에 하나는 담배식물이 가지는 새로운 화합물의 분리 확인이며 다른 하나는 이미 알려진 화합물의 정량적인 취급이다. 담배중에서 니코틴이나 당의 함량을 조사하는 것은 후자에 해당이 되며 이들의 함량을 자주 분석하게 되는것은 담배중에서 이 화합물들이 가장 기본이되는 성분일뿐만 아니라 담배의 품질 평가에 대단히 중요한 인자가 되기 때문이다. 더우기 인위적으로 제조되는 물질은 구성물질의 함유량 수준이 어느 수준을 유지하여 변화폭이 작은데 비하여 담배식물은 재배작물이기 때문에 구성물질의 함유량은 대단히 유동적일 뿐만 아니라 한 화합물을 정량적으로 표시하기 위하여는 여러개의 시료에서 구한 함량을

통계적으로 취급하지 않으면 안되는 또 다른 일면을 가지고 있다.

이러한 필요에 따라 많은 시료를 동시에 처리하여 한 화합물에 대한 여러개의 분석값을 얻는 자동분석 기술이 개발되고 있는데 Sadler(7)가 니코틴알카로이드 분석을 자동화한 것이나 Harvey(2)나 Rechard(6)가 당과 니코틴을 동시에 자동분석한 것, 그리고 또 Harvey(3)가 총휘발성 염기와 니코틴을 자동분석한 것이 모두 이와 같은 필요성에 연유된 것으로 보인다. 그리고 부수적으로 자동화 분석방법은 동시에 많은 시료를 처리함으로써 분석에 소요되는 시간을 줄일수 있을뿐 아니라 분석인력이나 사용되는 시약을 절감할 수 있다.

이 연구에서는 담배중의 기본성분인 니코틴알카로이드, 전당, 환원당, 그리고 암모니아 4개성분을 1개의 시료를 사용하여 동시에 분석할 수 있는 방

법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시 료

담배 시료는 우리나라에서 재배하고 있는 황색종

파 버어리종을 분쇄하여 $80 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3시간 건조하여 사용하였다.

2. 장 치

자동화 장치는 자동분석기, Technicon Type II를 사용하여 각성분의 처리 조작에 따라 그림 1과 같은 Catridge를 각각 제작하여 사용하였다.

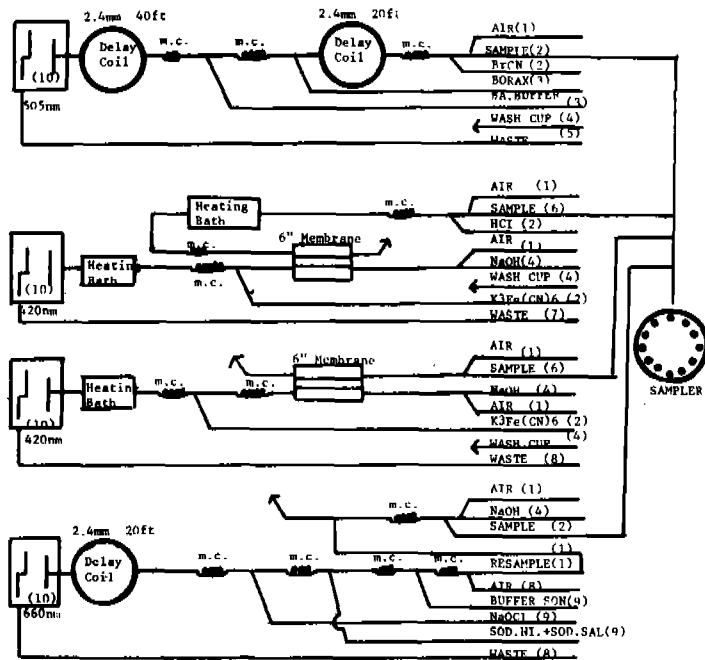


Fig. 1. Flow diagram for determination of nicotine alkaloid totalsugar, reducing sugar and ammonia.

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1) Pump tube (0.32ml/min.) | 6) Pump tube (0.23ml/min.) |
| 2) Pump tube (0.42ml/min.) | 7) Pump tube (2.00ml/min.) |
| 3) Pump tube (1.60ml/min.) | 8) Pump tube (1.0ml/min.) |
| 4) Pump tube (1.20ml/min.) | 9) Pump tube (0.1ml/min.) |
| 5) Pump tube (2.90ml/min.) | 10) Spectrophotometer |
- m. c. ; mixing coil.

3. 시 약

Barbituric acid buffer 시약은 barbituric acid, Tokyo Kasei, 특급 1g과 sodium diethyl barbiturate, Tokyo Kasei, 특급 1g을 물 100ml에 용해시키고 잘저은 다음 걸러서 Brij-35 0.1ml를 첨가하여 사용하였다.

Cyanogen bromide는 cyanogen bromide, Wako, 특급 2g을 100ml의 물에 용해시켜 Brij-35를 0.1ml첨

가하고 냉장고에 보관하였다가 사용할때 실온에서 30분 이상 두었다가 사용하였다.

Borax 시약은 sodium borate decahydrate, Kanto, 특급 3.814g을 물에 용해시켜서 0.01M로 조제하고 Brij-35 0.5ml를 첨가하여 사용하였다.

추출액은 초산올 물에 희석하여서 2%가 되도록 하여 사용하였다.

0.5N 수산화나트륨 시약은 수산화나트륨 20g을

100ml의 물에 용해시켜 Brij-35 0.5ml를 첨가하여 사용하였다.

육시아노철(Ⅲ) 산칼륨(potassium hexacyano ferate(Ⅲ))은 육시아노철(Ⅲ) 산칼륨 Merk, 특급 0.35g을 200ml의 물에 용해시키고 따로 수산화나트륨 40g을 200ml의 물에 용해시켜 두 용액을 1000ml의 눈금 플라스크에 넣고 물로 표선까지 채운다. 조제된 시약 1ℓ에 Brij-35 0.5ml를 첨가하여 사용하였다.

1N 염산시약은 염산, Cica, 특급 90ml를 물로 1ℓ가 되도록 희석하고 Brij-35 0.5ml를 첨가하여 사용하였다.

0.33N 수산화나트륨 시약은 수산화나트륨 13.2g을 1000ml의 물에 용해시켜 Brij-35 0.5ml를 첨가하여 사용하였다.

인산완충액은 인산수소칼륨(sodium phosphate, dibasic dihydrate, Merk) 특급 9g을 1000ml의 눈금 플라스크에 넣고 물 200ml를 가하여 녹이고 1N 수산화나트륨 10ml를 가한다. 물로서 1000ml가 되도록 표선까지 채우고 Brij-35 0.5ml를 첨가하여 사용하였다.

차아염소산나트륨 시약은 10% 차아염소산 나트륨 용액(sodium hypochlorite solution, Shimakyus) 1ml을 물 100ml에 용해한다. 따로 수산화나트륨 0.8g을 물 100ml에 용해하여 사용할 때 두 용액을 섞어서 Brij-35 0.2ml를 첨가하여 사용하였다.

Sodium salicylate/sodium nitroprusside 시약은 sodium salicylate 4g을 물 100ml에 용해한다. 따로 sodium nitroprusside, Merk, 특급 0.5g을 물 100ml에 용해하여 사용할 때 두 시약을 충분히 섞어서 Brij-35 0.2ml를 첨가하여 사용하였다.

이외의 시약은 일반실험실에서 사용이 되는 시약을 필요에 따라 조제하여 사용하였다.

니코틴 표준용액은 Tokyo Kasei 특급시약 nicotine Bi-L(+), tartrate dihydrate 314mg을 정확히 취하고 추출액으로 사용한 2% 초산으로 정확히 100ml로 조제하고 stock solution으로 하였으며 실제 조작에 사용한 표준시약은 stock solution을 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml를 정확히 취하여 100ml 눈금 플라스크에 넣고 황성탄 0.5ml를 넣은 다음 2% 초산으로 눈금을 맞추었다. 이렇게 조제한 표준시약을 진탕기(shaking machine)에서 20분간 진탕한 뒤 거름종이로 걸렀다. 이용액은 니코틴 50μg/ml, 100μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml, 250μg/ml에 해당된다.

전당및 환원당 표준용액은 Tokyo Kasei 특급시약 무수글루코오스 1g을 정확히 취하고 추출액으로 사용한 2% 초산으로 정확히 100ml로 조제하고 stock solution으로 하였으며 실제 조작에 사용한 표준시약은 stock solution을 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml, 12.5ml을 정확히 취하여 100ml 눈금플라스크에 넣고 이하 니코틴 표준용액 조제시와 같이 조작한다.

암모니아 표준용액은 Wako 특급시약 황산암모늄 388.6mg을 정확히 취하고 추출액으로 사용한 2% 초산으로 정확히 1ℓ로 조제하고 stock solution으로 하였으며 실제조작에 사용한 표준시약은 stock solution을 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml를 정확히 취하여 100ml 눈금 플라스크에 넣고 이하 니코틴 표준용액 조제시와 같이 조작한다. 이용액은 암모니아 0.5μg/ml, 1.0μg/ml, 1.5μg/ml, 2.0μg/ml, 2.5μg/ml에 해당된다.

4. 조 작

1) 전처리 조작

시료 0.5g을 정확히 취하여 100ml 눈금플라스크에 넣고 황성탄 0.5g을 넣은 다음 2% 초산으로 표선까지 맞추고 진탕기로 20분간 진탕한 다음 거름종이로 거른다. 거른액을 자동분석기의 sampler에 담은 시료용액으로 한다.

2) 자동분석기에 의한 조작

자동분석기의 시료용액및 모든 시약 공급 tube를 Brij-35 0.5ml/1000ml를 넣은 물로서 proportioning pump를 작동시켜 충분히 씻는다. 30분이상 시간 간격을 두었다가 비색제와 recorder를 작동시킨다. sampler에는 니코틴, 글루코오스, 암모니아의 표준시약을 농도별로 차례 차례로 놓고 다음에 시료용액을 놓는다.

그림 1에서와 같이 각 pumping tube로서 모든 시약의 공급을 위하여 cup washing 용액으로부터 tube를 각각의 시약명으로 바꾸어 놓는다. 약 10분이 경과하면 표준용액과 시료용액을 공급한다.

Recorder에 기록된 각 표준물질의 그래프로 작성된 점랑선을 기준으로 각 시료의 니코틴 알카로이드, 전당, 환원당, 암모니아량을 다음식에 따라 계산하여 구한다.

$$\text{Nicotine Alkaloid (\%)} = \frac{\text{mg/ml Nicotine} \times 100 \times 100}{\text{mg Sample}}$$

$$\text{Reducing Sugar (\%)} = \frac{\text{mg/ml Glucose} \times 100}{\text{mg Sample}}$$

$$\text{Total Sugar (\%)} = \frac{\text{mg/ml Glucose} \times 100}{\text{mg Sample}}$$

$$\text{Ammonia (\%)} = \frac{\text{mg/ml Ammonia} \times 1000 \times 100}{\text{mg Sample}}$$

결과 및 고찰

1. 전처리 조작 조건

시료 일정량을 취한 다음 조작에서와 같이 2% 초산으로 니코틴, 전당, 환원당의 추출조건은 Harvey와 그의 공동연구자(2) 그리고 Richard(6)에 의하여 이미 분석적 재현성이 있음을 보고하였기 때문에 이 연구에서 암모니아 추출관계를 보면 그림 2와 같다.

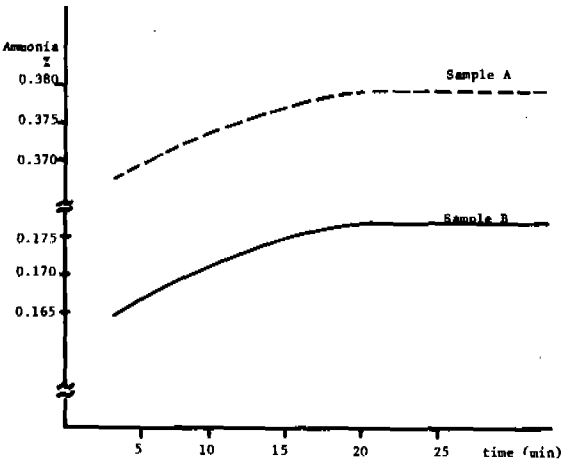


Fig. 2. Effect of time of extraction with 2% acetic acid (100ml)

시료중에 암모니아의 함유량이 0.174~0.181%의 시료와 0.371~0.378%의 시료에 대해 추출시간에 따라 분석값을 표시한 것으로 두 시료 모두 추출시간 20분을 전후하여 일정값에 대단히 접근하고 있음을 볼 수 있다.

니코틴, 전당, 환원당에 관한 추출시간이 대체로 5~10분으로 보고한 연구자(2,6)의 결과와 5~10분 정도의 추출시차가 있을 뿐으로서 4개 성분을 자동분석하기 위한 추출시간은 20분 정도이면 충분함을 알 수 있었다.

적정 시료량을 검토하기 위하여 시료량과 암모니아의 분석값과의 관계는 표 1과 같았다.

Table 1. Effect of amount of sample.

| Amount of sample (g) / 100cc | Ammonia value (%) | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Hicks H ₃ | Burley L ₃ |
| 0.2 | 0.183 | 0.380 |
| 0.4 | 0.182 | 0.378 |
| 0.6 | 0.182 | 0.378 |
| 0.8 | 0.181 | 0.380 |
| 1.0 | 0.178 | 0.372 |
| 2.0 | 0.176 | 0.369 |

위에서 검토한 추출시간을 20분으로 할 때 시료량이 약 0.8g까지는 암모니아의 분석값이 일정값을 유지하다가 시료량이 1~2g으로 증가할때 분석값은 작아지는 경향을 보였다. 이는 20분의 추출시간으로 추출이 충분한 시료의 양을 0.8g이하임을 나타낸 것으로서 시료는 0.5g정도 추출시간은 20분 이상으로 시험조작을 고정할 수 있음을 알 수 있었다.

2. 담배의 화학성분이 암모니아 분석값에 미치는 영향

암모니아가 차아염소산나트륨, sodium nitroprusside 그리고 sodium salicylate와 반응할때 담배중의 다른 성분이 분석값에 미치는 영향을 보기 위하여 암모니아 일정량을 첨가하여 첨가된 암모니아의 분석값을 구하였다. 회수율은 같은 실험을 10회하여 평균한 값으로서 표 2와 같았다.

Table 2. Recovery of Ammonia in the Samples.

| Sample | Ammonia (mg/g) | | | |
|--------|----------------|-------|-------|--------------|
| | leaf only | added | found | recovery (%) |
| 4 | 0.182 | 0.10 | 0.285 | 103 |
| 6 | 0.035 | 0.20 | 0.238 | 102 |
| 5 | 0.055 | 0.20 | 0.251 | 98 |
| 1 | 0.435 | 0.05 | 0.440 | 100 |
| 2 | 0.378 | 0.10 | 0.475 | 97 |
| 3 | 0.190 | 0.20 | 0.393 | 102 |

암모니아를 담배 1g에 0.05mg~0.2mg을 첨가하였을 때 회수율이 97~103%로서 담배중의 다른 성분이 암모니아의 분석에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

3. 다른 분석 방법과의 비교

이 연구에서 설정한 자동분석 조작에 따라 구한 분석값과 일반적으로 사용하고 있는 다른 방법으로 구한 분석값을 비교 하였다.

환원당에 대하여는 Masao(4)방법과 비교 하였는데 환원당의 함유량이 2.8~20.0% 까지를 비교한 결과 표 3에서와 같이 상대오차 $\pm 3.5\%$ 이내에서 재현성이 있음을 알수 있었다.

Table 3. Comparison of reducing sugar values of official method with autoanalyzer.

| Sample | official method(%) | autoanalyzer (%) | relative error |
|--------|--------------------|------------------|----------------|
| 1 | 20.0 | 20.2 | +1.0 |
| 2 | 19.6 | 19.4 | -1.0 |
| 3 | 17.3 | 17.2 | -0.5 |
| 4 | 15.8 | 15.9 | +0.6 |
| 5 | 12.7 | 12.8 | +0.7 |
| 6 | 9.4 | 9.3 | -1.0 |
| 7 | 7.2 | 7.4 | +2.7 |
| 8 | 5.7 | 5.6 | +1.7 |
| 9 | 4.3 | 4.2 | -2.3 |
| 10 | 2.8 | 2.7 | -3.5 |

특히 환원당은 함유량이 적은 값일때 상대오차가 크나 절대오차는 $\pm 0.2\%$ 이내로서 비교되는 두 값은 잘 일치하고 있음을 알수 있었다.

전당에 대하여도 Masao (4)방법과 비교하면 표 4와 같았다.

Table 4. Comparison of total sugar values of official method (with autoanalyzer.)

| Samples | official method(%) | autoanalyzer (%) | relative error |
|---------|--------------------|------------------|----------------|
| 1 | 27.2 | 27.1 | +0.4 |
| 2 | 23.0 | 22.9 | +0.4 |
| 3 | 22.7 | 22.5 | -0.9 |
| 4 | 21.1 | 21.1 | 0 |
| 5 | 18.7 | 18.9 | +1.1 |
| 6 | 13.5 | 13.4 | -0.7 |
| 7 | 10.4 | 10.3 | -0.9 |
| 8 | 8.7 | 8.8 | +1.1 |

| | | | |
|----|-----|-----|------|
| 9 | 5.5 | 5.3 | -3.6 |
| 10 | 3.3 | 3.2 | -3.0 |

환원당의 경우와 같은 경향의 오차가 있었으며 비교 값들은 서로 같은 경향이였다.

니코틴은 CORESTA에서 표준법(1)으로 채택하고 있는 Griffith 방법과 비교하였다. 니코틴 함유량이 2.3~6.15%의 시료를 사용하여 분석한 결과 표 5에서와 같이 자동분석법에 의한 값이 대체로 큰 값을 보였으나 상대오차는 $\pm 2.8\%$ 이내였다.

Table 5. Comparison of nicotine alkaloid values of Griffith method with autoanalyzer.

| Samples | Griffith method(%) | autoanalyzer (%) | relative error |
|---------|--------------------|------------------|----------------|
| 1 | 6.15 | 6.20 | +0.8 |
| 2 | 5.35 | 5.40 | +0.9 |
| 3 | 4.22 | 4.30 | +1.9 |
| 4 | 3.44 | 3.52 | +2.3 |
| 5 | 3.28 | 3.25 | -0.6 |
| 6 | 3.27 | 3.28 | +0.3 |
| 7 | 3.22 | 3.20 | -0.6 |
| 8 | 2.80 | 2.86 | +2.8 |
| 9 | 2.56 | 2.60 | +1.5 |
| 10 | 2.30 | 2.30 | 0 |

암모니아는 Nikolin의 방법(5)과 비교하였다. 암모니아는 0.044~0.465% 범위의 시료를 분석한 결과 상대오차 $\pm 3.2\%$ 이내에서 서로의 값은 일치하였다.

Table 6. Comparison of ammonia values of Nikolin method with autoanalyzer.

| Samples | Nikolin method(%) | autoanalyzer (%) | relative error |
|---------|-------------------|------------------|----------------|
| 1 | 0.465 | 0.460 | -1.1 |
| 2 | 0.442 | 0.450 | +1.8 |
| 3 | 0.430 | 0.435 | +1.2 |
| 4 | 0.390 | 0.378 | +3.2 |
| 5 | 0.340 | 0.342 | +0.6 |
| 6 | 0.281 | 0.282 | +0.4 |
| 7 | 0.196 | 0.190 | +3.1 |
| 8 | 0.178 | 0.182 | +2.2 |
| 9 | 0.106 | 0.108 | +1.9 |
| 10 | 0.044 | 0.045 | +2.3 |

Table 7. Error range of automated analysis.

| item | relative error range |
|-------------------|----------------------|
| reducing sugar | ± 3.5 |
| total sugar | ± 3.6 |
| nicotine alkaloid | ± 2.8 |
| ammonia | ± 3.1 |

이들의 결과에서 보인 최대 상대오차는 표 7 과 같다.

자동분석에 의한 니코틴, 전당, 환원당, 그리고 암모니아의 분석값은 최대 상대오차 ±3.6%이내로 분석적 재현성이 대단히 높은 것을 알수 있었다.

결 론

자동분석기를 이용하여 담배성분중의 니코틴알카로이드, 전당, 환원당, 암모니아를 동시에 자동분석할 수 있도록 설계하였다.

동시에 4 성분을 추출할 수 있는 가장 적합한 조건은 담배시료 0.2~0.8g을 2%초산 100ml로 추출할 때이며 이때의 분석값들의 상대오차는 ±3.6%이내였으며 4 성분 모두 재현성이 있었다.

참 고 문 헌

1. Criffith, R. B., Tob. Sci., 1 : 130-137 (1975)
2. Harvey, W. R., H. M. Starr and W. C. Smith, Tob. Sci., 13 : 13~15 (1969)
3. Harvey, W. R., P. G. Baker and B. H. Handy, Tob. Sci., 20 : 136-138 (1976)
4. Masao, Y., H. Kimara and T. Namiki, 専売中研報 111 : 77~83 (1969)
5. Nikolin, B., A. Nikolin and H. Butmir, Tob. Sci. 18 : 10~11 (1974)
6. Richard, E., Tob. Sci., 20 : 139-146 (1976)
7. Sadler, W. W., R. R. Chesson and A. W. Schoenbaum, Tob. Sci., 4 : 208~212 (1960)