

HPLC를 이용한 잎담배 중 유기산 함량 분석

민혜정* · 장석수 · 김익중 · 신준원 · 김용하 · 민영근

KT&G 중앙연구원
(2006년 12월 1일 접수)

Determination of Organic Acids in Tobacco Leaves by HPLC

Hye-Jeong Min*, Seok-Su Jang, Ick-Joong Kim, Jun-Won Shin,
Yong-Ha Kim and Young-Keun Min

KT&G Central Research Institute

(Received December 1, 2006)

ABSTRACT : This study was carried out to improve the analytical methods for determination of organic acids in tobacco leaf by HPLC. The samples for HPLC analysis were pre-treated by means of SPE. The calibration curve for each acid was linear and R^2 values ranged from 0.9990 to 1.0000. The limit of detection were obtained from the calibration curves and their values were between 1.39 to 4.87 $\mu\text{g/mL}$. Recovery rates of organic acids were between 88.6 % to 98.5 %. The concentrations of organic acids among the various tobacco leaves were compared to the concentration of organic acids, were in the order oriental, burley, flue-cured tobacco. In the case of flue-cured and oriental tobacco leaves, the order of concentration of organic acids was malic acid, oxalic acid, citric acid. But in the case of burley tobacco leaves, the order of concentration of organic acids was citric acid, oxalic acid, malic acid.

Key words : organic acids, tobacco, SPE, HPLC

유기산은 담배(*Nicotiana tabacum* L.)의 생엽과 건조엽에 중요한 성분으로 많은 종류가 존재하며, 잎담배의 품질에 중요한 역할을 한다(Davis 등, 1999). 지금까지 확인된 잎담배에 존재하는 유기산은 170여종에 이르며 일반적으로 휘발성 유기산과 비휘발성 유기산, 지방산 세 그룹으로 나눈다. 이들 유기산 중 oxalic acid, malic acid, citric acid와 acetic acid가 높은 함량으로 존재하고 건조엽의 전체 유기산 중 5~18 %를 차지한다(Leffingwell 등, 1999; Tso, 1990). 유기산

의 농도와 분포는 담배의 종류, 착엽위치, 비료의 NO_3^- 의 양에 따라 달라질 수 있다(Jinshu, 1999).

유기산은 담배의 맛과 향에 중요한 역할을 하며 잎담배 품질의 indicator로서 이용되고 있다(Jana 등, 2003). 휘발성 유기산인 acetic acid와 formic acid는 담배의 매운 맛을 주어 담배 향긋미에 영향을 주며 비휘발성 유기산인 oxalic acid, malic acid 및 citric acid는 완화된 맛이 나 매운 맛으로 대부분 담배 맛에 부드러운 효과

*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

를 주어 깃미에 도움을 주는 것으로 알려져 있다 (Jinshu 등, 2002; Abdallah 등, 1970). 이런 이유로 잎담배 내 유기산 함량을 분석하는 것은 담배품질 평가의 척도로 이용할 수 있고 제품 담배의 설계 및 평가에 중요한 인자로 작용할 수 있다.

지금까지 잎담배의 유기산을 분석하는 방법으로 gas chromatography가 주를 이루고 있으며 검출기로는 FID를 사용하고 있다. 이 방법은 유기산을 methyl, butyl esters, 또는 trimethylsilyl 유도체로 변형시켜 분석하는 방법이다(Yang 등, 2002; Bartolozzi 등, 1997). 이는 높은 분리능과 검출기 감도를 보이나(Ng 등, 2001) 복잡하고 전처리 시간이 많이 요구되고 유도체화 과정을 거쳐야 하므로 회수를 또한 낮은 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 잎담배 중 유기산 함량을 분석하고자 하였다. HPLC 분석을 위해 SPE를 사용하여 전처리를 하였으며 이는 유기산을 유도체화 하는 과정을 거치지 않으므로 분석소요 시간을 단축시키고 분석 시 소비되는 용매를 줄여줄 뿐만 아니라 시료 별도의 clean up 과정이 필요 없다는 장점이 있다. 여섯개의 유기산 oxalic acid, citric acid, malic acid, malonic acid, formic acid 및 acetic acid의 분석을 위한 추출법과 분석방법을 검토하고 잎담배 품종별 유기산 함량을 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준용액

유기산 표준물질(oxalic acid, citric acid, malic acid, malonic acid, formic acid, acetic acid)은 Sigma Aldrich(USA)사의 제품들을 구입하여 사용하였다.

표준용액은 oxalic acid 0.1~1 mg/mL, citric acid 0.1~1 mg/mL, malic acid 0.05~0.5 mg/mL, malonic acid 0.1~1 mg/mL, formic acid 0.1~1 mg/mL, acetic acid 0.1~1 mg/mL 범위로 조제한 후 표준검량선을 작성하여 유기산 정량에 이용하였다.

잎담배 중 유기산 추출법

HPLC와 GC로 담배 유기산 분석을 비교하기 위해 다음과 같은 방법들로 실험하였다. HPLC 분석을 위해 잎담배 2 g에 2 N H₂SO₄ 수용액 40 mL를 가하여 세시간동안 150 rpm에서 shaking한 후 filter paper로 여과하였다. 여과된 용액은 solid phase extraction을 이용하여 clean up 과정을 거쳤다. Oasis HLB extraction cartridge(200 mg, Waters, USA)를 MeOH 4 mL와 증류수 4 mL로 conditioning한 다음 여과된 용액 3 mL를 loading하였다. 용액이 extraction cartridge를 통과하면 20 % MeOH 수용액 2 mL로 씻어준 후 모아진 용액들을 잘 섞어준 다음 HPLC 주입시료로 이용하였다.

GC 분석을 위해 잎담배 10 g에 12 % H₂SO₄/MeOH용액 60 mL와 내부 표준물질 glutaric acid가 포함된 MeOH용액 40 mL를 가하여 20시간동안 150 rpm에서 shaking한 후 filter paper로 여과하였다. 여과된 용액 50 mL와 물 100 mL를 분액 깔대기에 넣고 CHCl₃ 15 mL씩 3회에 걸쳐 추출하고 추출한 CHCl₃ 용액은 무수 Na₂SO₄로 수분을 제거하고 50 mL 용량 플라스크에 채운 후 잘 섞어준 다음 0.45 µm filter로 여과하여 GC 주입시료로 이용하였다(KT&G 담배 성분 분석법).

회수율 시험

회수율 시험은 설정된 유기산 추출법을 이용하여 3단계 농도별로 3반복 실험하였다. Oxalic acid 0.1~1 mg/mL, citric acid 0.1~1 mg/mL, malic acid 0.05~0.5 mg/mL, malonic acid 0.1~1 mg/mL, formic acid 0.1~1 mg/mL, acetic acid 0.1~1 mg/mL 범위의 농도에 대하여 회수율을 시험하였다.

잎담배 중 유기산의 HPLC 분석

유기산 분석을 위해 HPLC(Waters, USA)를 이용하였고, 검출기로는 photodiode array detector (PDA)를 사용하였다. 칼럼은 Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm I.D., Bio-Rad, CA, USA)와 가드 칼럼(30 mm × 4.6 mm I.D., Bio-Rad,

CA, USA)을 사용하였다. 유기산의 HPLC 분석 조건을 최적화하기 위해서 분석온도와 이동상의 산의 세기를 검토하여 실험한 결과, 분석온도는 25℃, 이동상의 산의 세기는 0.032 N H₂SO₄로 하였다. 유속은 0.6 mL/min으로 하고 시료는 10 µL를 주입하였다.

잎담배 중 유기산의 GC 분석

담배 유기산 분석을 위해 GC(Hewlett-Packard 5890 II Plus, USA)를 이용하였고, 검출기로는 flame ionization detector(FID)를 사용하였다. 칼럼은 DB-WAX(30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness, J&W, USA)를 이용하였다. Oven 온도 프로그램은 90 °C에서 230 °C까지 5 °C/min 속도로 승온 시키고, 30분간 유지시켰다. Injector와 detector 온도는 230 °C, carrier gas는 N₂를 사용하였으며 유속은 1 mL/min으로 하였다. 시료는 split mode에서 10 µL를 주입하였다.

결과 및 고찰

잎담배 유기산 추출법 비교

분석 방법은 분석 값의 정확성에 영향을 미친다. 분석과정이 증가함에 따라 분석에 소요되는 시간이 증가하게 되고 분석 단계마다 발생하는 오차에 따른 불확도를 갖기 때문이다. 일반적으로 분석과정 단계가 적은 분석방법이 적은 불확도를 갖고 분석치의 더 높은 정확성을 가진다. 따라서 최대한 분석과정에서 발생될 수 있는 불확도를 줄이고 분석 값의 정확성을 높이기 위해서는 효율적인 분석방법을 선택하는 것이 중요하다. GC 방법의 전처리과정은 HPLC 방법의 전처리과정에 비해 많은 단계를 거쳐야 하고 시간 또한 많이 소요된다. 유기산을 methyl기로 유도체화 하기 위해서는 20 시간의 반응 시간을 거쳐야 하고 liquid-liquid extraction을 세 번 거쳐야 하는 등 전처리 과정이 복잡하다. Ky2R4F 표준담배의 oxalic acid와 citric acid, malic acid의 회수율과 농도를 GC 방법으로 실험한 결과를 Table 1에 나타내었다. Oxalic acid가 72.6 %, malic acid가 60.3 %

로 낮은 회수율을 나타내는 것으로 보아 정확한 분석 값을 얻는 방법으로는 적당한 분석법이 아닌 것으로 판단되었다. 반면 HPLC 방법의 전처리 과정은 유도체화 과정을 거치지 않고 간편한 solid-phase extraction(SPE)을 거쳐 유기산을 추출하므로 다른 전처리 방법에 비해 간편하고 분석 단계가 적으므로 높은 정확성을 갖는 분석 값을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

Table 1. Recovery rates and concentration of Ky2R4F individual organic acids by GC

Compounds	Recovery (%)	RSD (%)	Con. (mg/g)
Oxalic acid	72.6	2.0	16.72
Citric acid	107.8	2.3	15.15
Malic acid	60.3	2.2	25.51

RSD : Relative standard deviation.

유기산 추출법의 정확성 및 정밀도

유기산 표준용액을 HPLC로 분석 후 검량선을 작성한 결과, 결정계수(R²)가 0.9990~1.0000 범위로 높은 직선성을 나타내었다. 또한 정확성 및 정밀도는 회수율 시험 결과를 토대로 하였다. 유기산을 3단계 농도로 첨가하여 3반복 실험한 결과를 Table 2에 나타내었다.

6개의 유기산에 대한 회수율은 88.6 %~98.5 %, 상대표준편차(RSD)는 1.6 %~4.4 %의 범위를 나타내었다. 이상의 결과로부터 설정된 방법으로 전처리 후 HPLC로 분석하는 방법은 6개 유기산 분석에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Recovery rates of individual organic acids by HPLC

Compounds	Recovery(%)	RSD(%)
Oxalic acid	98.5	1.6
Citric acid	98.6	1.6
Malic acid	97.8	4.4
Malonic acid	99.5	1.9
Formic acid	95.9	2.6
Acetic acid	93.4	4.2

유기산 함량 분석

6개의 유기산들의 검출한계(LOD)와 검량한계(LOQ)는 Table 3에 나타내었다. 검출한계는 1.39 mg/mL~4.86 mg/mL를 나타내었고, 검량한계는 4.17 mg/mL~14.61 mg/mL를 나타내었다. 잎담배의 유기산 함량을 분석하기 위해 표준담배인 Ky2R4F와 황색종으로는 한국산(C2L, 2004년), 미국산(B4F, 2004년), 중국산(TYA, 2004년)을, 버어리종으로는 한국산(C1W, 2004년), 한국산(AB4TR, 2004년)을, 오리엔트종으로 불가리아산 바스마 (AB, 2005년), 아르메니아산 삼순(AG, 2004년)을 사용하여 HPLC로 분석하였다(Table 4).

표준담배인 Ky2R4F의 유기산 함량은 비휘발성 산인 oxalic acid, citric acid, malic acid가 문헌에 보고된 바와 같이 가장 많은 함량을 차지했다. 잎담배 품종별 함량도 oxalic acid, citric acid, malic acid가 대부분의 양을 차지하고 나머지는 낮은 함량으로 존재하였다. 황색종과 오리엔트종 중 유기산의 농도는 모든 시료에서 malic acid, oxalic acid, citric acid 순을 나타내난 반면, 버어리종은 citric acid, oxalic acid, malic acid 순을 나타냈다. 잎담배 종류별 유기산 함량은 대체적으로 오리엔트종, 버어리종, 황색종 순이었다.

Table 3. Limit of detection and quantitation of organic acids by HPLC

Compounds	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Oxalic acid	1.39	4.17
Citric acid	3.25	9.75
Malic acid	1.95	5.85
Malonic acid	3.00	9.00
Formic acid	3.22	9.66
Acetic acid	4.87	14.61

결론

본 연구는 잎담배 유기산 분석 소요시간을 단축시키고 분석방법을 개선하고자 HPLC를 이용하여 분석하는 방법을 모색하였다. GC를 이용하는 방법은 유기산을 추출하는 과정이 길고 복잡하여 낮은 회수율로 인해 분석 값의 정확성을 기대할 수 없어 산을 유도체화 시키는 과정 없이 간단한 추출과정과 SPE를 사용한 최적 추출법을 검토하였다. HPLC를 이용한 유기산의 분석법을 연구한 결과 표준용액의 결정계수(R^2)가 0.9990~1.0000 범위로 높은 직선성을 나타내었고, 회수율은 88.6%~98.5%로 양호한 값을 나타내었다. 따라서

Table 4. Concentrations of organic acids in reference cigarette Ky2R4F and various tobacco leaves by HPLC

		(mg/g)					
		Oxalic	Citric	Malic	Malonic	Formic	Acetic
Ky2R4F		24.24	17.90	40.97	2.17	0.22	ND
Flue-cured	Korea C2L	13.82	8.10	75.52	0.78	0.28	0.84
	America C4F	15.92	5.50	46.4	0.86	0.36	1.14
	Cina TYA	11.78	6.84	65.74	0.92	0.18	0.52
Burley	Korea AB4TR	28.04	32.12	17.48	1.32	0.10	ND
	Korea C1W	28.30	58.46	23.62	1.64	ND	ND
Oriental	Bulgaria Basma	27.98	8.90	63.92	1.44	0.56	ND
	Armenia Samsun	50.86	25.28	41.18	1.94	ND	ND

ND: Not Detected.

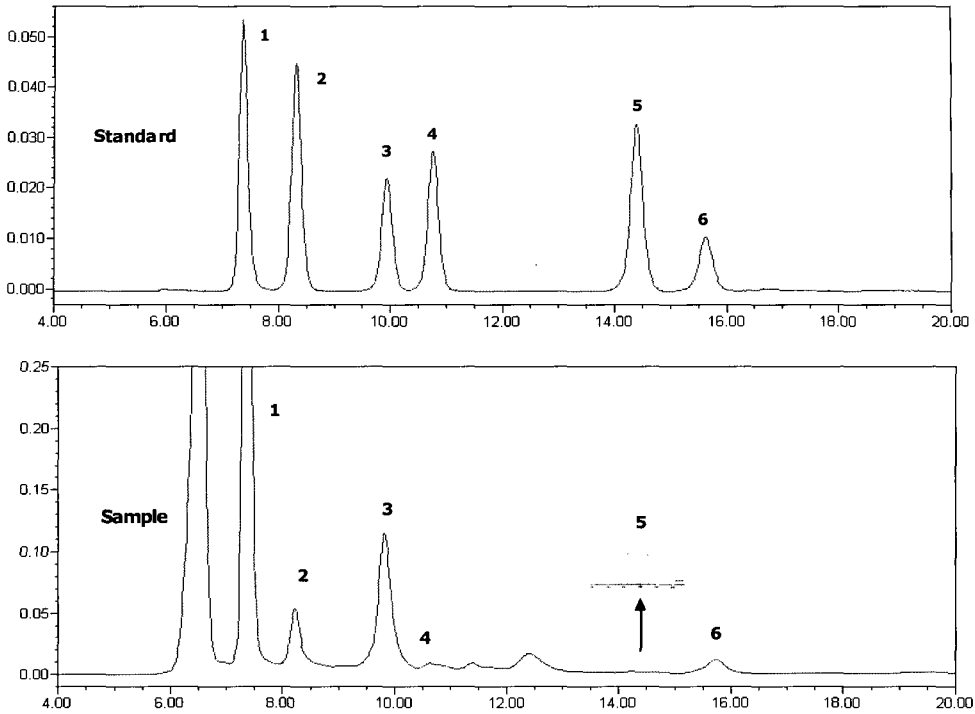


Fig. 1. Chromatograms of organic acids in standard and extract sample (1 : oxalic acid, 2 : citric acid, 3 : malic acid, 4 : malonic acid, 5 : formic acid, 6 : acetic acid).

HPLC를 이용한 분석방법이 분석소요 시간을 단축하고 정확성과 재현성 있는 유기산 분석 시 적절하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 황색종, 버어리종, 오리엔트종의 잎담배 유기산 함량을 분석한 결과 유기산 함량은 오리엔트종, 버어리종, 황색종 순으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Davis, D.L., Nielsen, M.T. (1999) Tobacco Production, Chemistry and Technology. Blackwell Science. p. 276. Oxford, UK.
- Tso, T.C. (1990) Production, Physiology, and biochemistry of tobacco plant. p. 523.
- Leffinwell, L.C. (1999) Leaf Chemistry 8A, Basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. p. 265. Oxford, UK.
- Jinshu Qiu (1999) Static aided optimization for high-performance liquid chromatographic analysis of organic acids in tobacco. *J. Chromatogr. A* 859: 153-158.
- Jana Sadecka, Jozef Polonsky (2003) Determination of organic acids in tobacco by capillary isotachopheresis. *J. Chromatogr. A* 988: 161-165.
- Jinshu Qiu, Xiaohong Jin (2002) Development and optimization acid analysis in tobacco with ion chromatography and suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr. A* 950: 81-88.
- Abdallah F (1970) Can Tobacco Quality be Measured? Lockwood Publishing Co., Inc., New York, NY.
- Yang, S.S., Huang, C.B., Smetena, I. (2002) Optimization of headspace sampling using

solid-phase microextraction for volatile components in tobacco. *J. Chromatogr. A* 42: 33-398.

Bartolozzi, F., Bassi, D., Brtazza, G., Cristoferi, G. (1997) Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 758: 99-107.

Ng, L.K., Hupe, M., Moccia, D. Vanier, M., (2001) Characterization of Cigar Tobaccos by Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis of Nonvolatile Organic Acids: Application to the Authentication of Cuban Cigars. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1132-1138.