

질소 화합물이 담배연기성분 및 안전성에 미치는 영향

신한재* · 박철훈 · 손형옥 · 이형석 · 김용하 · 현학철

KT&G 중앙연구원

(2009년 11월 3일 접수 ; 2009년 11월 24일 수정 ; 2009년 12월 1일 승인)

Effect of nitrogen compounds on the chemical composition and biological activity of mainstream smoke

Han-Jae Shin*, Chul-Hoon Park, Hyung-Ok Sohn,
Hyeong-Seok Lee, Yong-Ha Kim and Hak-Chul Hyun

KT&G Central Research Institute

(Received November 3, 2009; Revised November 24, 2009; Accepted December 1, 2009)

ABSTRACT : The objective of this study was to investigate the effect of nitrogen compounds such as protein on the chemical composition and toxicity of cigarette mainstream smoke. BSA protein was treated into the tobacco leaf of original 2R4F cigarette at 1~4 % level. The studies were performed which included a bacterial mutagenicity assay and a mammalian cell cytotoxicity assay for total particulate matter(TPM), and glutathione(GSH) consumption assay for gas/vapor phase(GVP) and determination of smoke chemical constitute. Cigarettes treated with protein were observed dose-dependent increase in yield of volatiles, semi-volatiles and aromatic amines compared with control cigarette. However, carbonyl compounds such as acrolein was lower than that of control cigarette when calculated on an equal TPM basis. The cytotoxicity of TPM obtained from the protein-added cigarettes was not different from that of control cigarette. However, the mutagenicity of the TPM from protein-treated cigarettes(1~4 %) was up to 10-27 % higher than that of control. On the other hand, toxicity of GVP from protein-treated cigarette(4 %) was significantly decreased compared with control cigarette. An overall assessment of our data suggests that nitrogen compounds such as protein should be important for the chemical composition and biological activity of cigarette mainstream smoke.

Key words : Total particulate matter, gas-vapor phase, mutagenicity, cytotoxicity

담배 원료엽의 중요한 화학 성분은 니코틴, 전질소 및 당 함량으로 알려져 있으며, 원료엽 중 전질소는 담배 향기와 맛과 관련된 화학물질을 생성하

는데 중요한 역할을 한다. 일반적으로 담배 원료엽의 건조 과정 중 아미노산으로의 가수분해와 amides의 생성으로 엽중 단백질은 감소되어 전질

*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: 82-42-866-5542; fax: 82-42-866-5495; e-mail: hjshim@ktng.com)

소가 일부 손실이 일어난다(Hamilton, 1974; Hamilton and Lowe, 1978). 일반적으로 단백질과 아미노산 수준이 높아지면 담배연기 향기에 영향을 주고, 약간의 단백질은 일부 흡연자에게 짝연 강도와 쓴맛을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Shmuk, 1953). 건조 전 버어리종이나 시가엽은 3~4 %의 단백배 질소를 함유하나, 황색종은 버어리종이나 시가엽의 약 15~20 % 정도만 함유하고 있다고 알려져 있다. 아울러 버어리종은 건조 중 단백질의 약 50 %가 가수분해되지만 황색종은 건조 중에 단지 20 % 정도가 가수분해 된다. 따라서 버어리종은 황색종에 비해 상대적으로 유리아미노산 함량이 높다고 알려져 있다(Leffingwell and Leffingwell, 1988).

최근에 담배의 품질에 있어서 생물학적 안전성에 관한 사항이 중요시되고 있다. 담배의 안전성 평가에 사용되는 시료는 주로 담배연기응축물(cigarette smoke condensate)이며, 안전성 평가 방법으로는 세균을 이용한 돌연변이성 평가와 포유류 세포를 이용하는 세포독성 및 유전독성 평가 등이 이용된다(DeMarini, 1983; Doolittle *et al.*, 1990; Bombick *et al.*, 1998; Putnam *et al.*, 2002; Andreoli *et al.*, 2003).

Cooper 등(1954)이 담배연기 성분 중 발암성 물질로서 benzo(a)pyrene을 최초로 보고한 이후, 50여종의 PAHs 및 aromatic amines 성분들이 DNA 손상 및 adduct 형성에 관련이 있다는 연구결과들도 보고되고 있다(Manabe and Wada, 1990; Phillips, 2002). 또한 aldehyde 화합물과 hydrocarbon 및 alcohol류 등은 담배연기의 세포독성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Curvall *et al.*, 1984). 그러나 전체 담배독성에 대하여 특정 염증 성분들의 독성 기여도에 관한 연구와 어떠한 mechanism을 통하여 독성이 발현되는지에 대하여는 거의 잘 알려져 있지 않고 있다(Rodgman and Green, 2003).

따라서 본 연구에서는 염증 주요 화학성분의 하나인 전질소가 담배연기의 안전성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 대표적인 질소화합물인 알부민 단백질이 함량별로 첨가된 시제품을 제조하여 고체상(TPM) 및 가스상(GVP) 분획에 대한 돌연변이 유

발성 및 세포독성을 조사하였고 담배연기성분들과의 상관성을 비교 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin solution, phosphate-buffered saline (PBS) 등은 GIBCO(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), sodium dodecyl sulfate(SDS), neutral red, Bovine Serum Albumin(BSA) 등은 Sigma-Aldrich(USA) 제품을 사용하였다. 대사활성제(S-9 mix)는 Moltox(Boone, NC, USA) 제품을 사용하였고, 대사활성제에 사용된 cofactor는 Wako Pure Chem.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 그 외의 유기용매들은 특급시약을 사용하였다.

담배시료의 제조

본 연구에서 사용된 담배시료는 표준담배(Kentucky reference cigarette 2R4F)를 기준으로 해서, 증류수에 희석시킨 BSA용액(200 mg/mL)을 시료 주입기를 이용해서 담배 각초부에 1 %, 2 %, 4 %(w/w) 되도록 첨가 하였다. 증류수만 첨가된 시제품을 대조구로 사용하였으며, 제조된 담배를 CORESTA 조건(온도 22±2 °C, 상대습도 60±5 %)에서 48시간 이상 조화시킨 후 실험에 사용하였다.

담배연기 입자상 및 가스상 분획의 제조

담배 주류연의 포집을 위해 모든 담배 시료를 ISO 3402(1999)에 따라 조화 시킨 후, Health Canada Official Method T-502(2004) 방법에 따라 담배를 연소시켰다. 담배 시제품 10 개피를 자동흡연장치(Borgwaldt RM20/CS, Germany)를 이용하여 ISO 표준흡연조건(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 연소시키고(ISO 4387, 2000a), 44 mm Cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. 적당량의 DMSO를 사용하여 Cambridge filter pad로부터 TPM을 추출해서, 농도가 10 mg/mL이 되도록 한

후 -70 °C에 보관하면서 시험에 사용하였다. 담배 연기로부터 가스상 분획(GVP)의 제조를 위해 100 mL gas washing bottle를 사용하였다. 흡연조건에 따라 10 개비를 자동흡연장치를 이용하여 연소시킨 후, Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 20 mL의 ice-cold PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas washing bottle에 포집하였다. 제조한 가스상 분획(GVP)은 -70 °C에 보관하면서 시험에 사용하였다.

화학성분의 분석

담배연기 중 tar, 니코틴 등과 같은 일반연기 성분은 ISO 3308(2000b)에 준하여, 담배시료를 RM20 자동흡연 장치를 이용하여 연소시키면서 Cambridge filter pad를 사용하여 TPM을 포집하면서 분석하였다. 연기응축물 중의 니코틴분석은 ISO 10315(2000c)에 준하여 분석하였다. 담배의 주류연 중 carbonyl 화합물은 Health Canada Official Method T-104(1999a)에 따라서 분석했으며, 휘발성 및 반휘발성 성분 역시 Health Canada Official Method T-116(1999b) 및 T-112(1999c)에 따라 ATD-400이 장착된 HP5890 GC를 이용하여 분석하였다.

시험균주 및 배지

복귀돌연변이 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98 균주는 Molecular Toxicology Inc.(USA)에서 구입하였다. 균주는 냉동 보관 되어 있는 시험균주 용액 50 µL를 25 mL의 액체배지 (2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종해 shaking incubator를 이용하여 37 °C에서 약 10 시간 배양한 후 사용하였다. 최소배지(minimal glucose agar plate)는 Vogel-Bonner medium E에 1.5 % Bacto agar와 2 % glucose가 함유되도록 조제하였고, top agar는 0.6 % agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, top agar에는 0.05 mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

복귀돌연변이 시험

복귀돌연변이 시험은 Maron과 Ames(1983)이 제시한 방법에 따라 수행하였고, 담배연기 TPM에

대한 돌연변이 유발성 검색을 위해서 *Salmonella typhimurium* TA98 균주를 사용하였다. 시험물질의 처리는 대사활성효소계(S-9 mix)가 적용된 direct plate incorporation 방법으로 하였다. 고압증기로 멸균한 top agar를 dry bath에서 45 °C로 예열한 멸균 tube에 2 mL 씩 분주한 다음, S-9 mix 0.5 mL 시험물질 용액 0.1 mL과 균배양액 0.1 mL을 top agar에 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 균게 하였다. 부형제균(음성대조균)은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL를, 양성대조균은 같은 방법으로 양성대조물질 용액을 가하여 실시하였다. top agar가 굳은 후 플레이트 뚜껑을 닫은 상태에서 플레이트를 뒤집어 37 °C에서 약 48 시간 배양 후 집락을 계수하였다.

세포주 및 세포배양

실험에 사용한 BALB/c 3T3 fibroblast 세포주(BALB/c 3T3)는 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포주기는 18 ± 2시간이었다. BALB/c 3T3 세포는 10 % FBS, 100 U penicillin/mL와 100 µg streptomycin/mL이 포함된 DMEM 배양액을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 0.25 % trypsin - 0.03 % EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 세포주의 자연발생적 돌연변이 생성을 최소화하기 위하여 구입 후부터 18번미만으로 계대 배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO₂ 배양기(Forma, USA)를 이용하여 포화 습도 하에서 37 °C, 5 % CO₂ 상태로 배양하였다.

세포독성 시험

시험에 사용된 담배의 TPM에 대한 세포독성은 리소좀(lysosome)에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 neutral red cytotoxicity assay 방법을 사용하였다(Borenfreund and Puerner, 1985). BALB/c 3T3 세포(1×10⁴ cells)를 96 well plate(n=6)에 이식해서 24 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 시료가 첨가된 1.5 %의 DMSO 처리군으로 하였다. 시험물질의 처리 후 22 ± 2시

간 동안 5% FBS, 100 U penicillin/mL와 100 µg streptomycin/mL이 포함된 DMEM 배양액에서 배양하였으며, 세포배양이 끝나면 배양액을 제거한 후 150 µL의 neutral red 용액(40 µg/mL)을 처리하여 37 °C에서 배양하였다. 3 시간 경과 후 neutral red 용액을 제거하고, 200 µL의 고정액(0.5 % formaldehyde - 1 % CaCl₂)으로 세포를 세척하였다. 유기용매 용액(50 % ethanol - 1 % acetic acid) 200 µL을 첨가해서 실온에서 15 분간 neutral red를 추출한 후 microplate reader (BIO-TEK, USA)를 사용해서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

GSH 소모율 측정

GSH 소모율 측정실험은 DTNB[5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)]를 이용한 비색분석법으로 Cahours 등에 의한 방법을 일부 변경하여 실시하였다(Cahours X. *et al.*, 2006). 간략하게 소개하면, 각 담배시료의 GVP 용액을 500 µL 씩 2개 준비한 다음 0.8 mM GSH 용액 500 µL와 반응시키고 다른 하나는 PBS와 반응시켰다. 표준시료는 0.4 mM GSH 용액을 사용하였다. 반응 직 후 모든 시료는 뚜껑을 닫고 잘 섞어주고, 공기와 빛에의 노출을 최대한 차단하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 96 microtiter plate well에 100 µL 씩 분주한 다음 1 mM DTNB 100 µL와 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Bio-Tek, USA). GSH와 반응시킨 시료의 흡광도는 PBS와 반응시킨 시료의 흡광도를, 0.4 mM GSH 용액의 흡광도는 PBS만을 측정된 흡광도를 빼줌으로써 타르의 색에 의해 나타날 수 있는 영향을 보정하였다.

통계학적인 방법

복귀돌연변이 시험 결과는 시료로부터 각 농도군 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차와, 용량상관성이 나타나는 초기농도 범위에서 구해진 기울기 값을 이용해서 계산된 활성화도 값

(Specific activity, revertants/µg)을 표시하였다. 돌연변이 유발성에 대한 시료들 간의 유의적인 차이 ($p < 0.05$)는 선형회귀분석을 통해서 구해진 각각의 시료들에 대한 활성화도 값에 대한 일원분산분석(ANOVA)과, 사후분석으로는 Duncan test를 이용하여 검증하였다. 시료에 대한 세포독성의 수치는 EC₅₀ 값으로 표기하였다. EC₅₀ 값은 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내는 시료의 농도이며, 용량-반응식을 이용하여 값을 구하였다. 세포독성 결과의 모든 EC₅₀ 측정값은 µg/mL로 환산하여 표시하였다. SPSS(version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 일원분산분석(ANOVA)을 실시하였고 사후 분석으로는 Duncan test를 통해서 $p < 0.05$ 의 수준에서 각 시험군과의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

단백질 첨가에 의한 엽중 및 연기 성분 변화

담배연기의 화학성분은 원료엽 종류 및 구성성분 등에 따라 달라지며, 담배연기의 안전성 역시 원료엽의 엽중 성분 함량에 따라 차이가 있을 수 있다. 본 연구에서는 원료엽 주요 성분 중 하나인 질소화합물이 담배 주류연 성분 및 안전성에 미치는 영향을 조사하였다. 대표적인 질소화합물인 알부민 단백질(BSA)을 2R4F 표준담배 각 초 무게당 각각 1, 2, 4 %가 되도록 첨가하여 증류수만 처리한 대조 담배와 엽중 및 연기성분을 비교 분석하였다. 각 제조된 담배에 대한 엽중 니코틴, 전당 및 전질소 함량을 측정된 결과, 니코틴과 전당의 함량은 대조

Table 1. Some blend chemistry data in % for the test tobacco in test cigarettes treated with BSA

Compounds	Added amount of BSA (% in tobacco weight)			
	None	1	2	4
Nicotine	2.10	2.08	2.11	2.09
Total sugar	9.81	9.74	9.55	9.49
Total nitrogen	3.44	3.50	3.67	3.92

Table 2. Results of mainstream smoke constituent analysis of cigarettes treated with BSA

Analytes	Added amount of BSA (% in tobacco weight)			
	None	1	2	4
FTC parameter (mg/cig)				
Puff. No	8.5	9.0	9.8	10.6
TPM	11.3	11.1	12.0	11.6
Tar	9.2	9.0	9.8	9.5
Nicotine	0.76	0.75	0.75	0.7
Carbon monoxide	12.7	12.6	14.1	13.1
Ammonia ($\mu\text{g}/\text{cig}$)	10.3	10.5	7.7	8.5
Carbonyls ($\mu\text{g}/\text{cig}$)				
Formaldehyde	20.6	16.0	16.9	16.0
Acetaldehyde	495.0	516.7	529.8	474.6
Acetone	235.3	249.2	254.8	228.3
Acrolein	42.6	40.5	41.2	37.6
Propionaldehyde	37.6	38.1	39.2	35.3
Crotonaldehyde	11.0	11.2	12.3	11.1
Methylethylketon	53.6	56.8	59.3	54.1
Butyraldehyde	24.2	26.5	27.5	25.4
Volatiles ($\mu\text{g}/\text{cig}$)				
Acrylonitrile	7.8	7.9	9.1	10.3
Isoprene	363.6	403.5	442.5	444.5
Benzene	34.3	35.7	39.4	41.7
Toluene	56.5	62.5	74.9	80.0
Semi-volatiles ($\mu\text{g}/\text{cig}$)				
1,3-butadine	38.5	43.0	49.2	51.6
Pyridine	5.3	5.6	6.6	6.2
Quinoline	0.3	0.3	0.3	0.3
Styrene	3.5	4.7	5.9	5.9
3-vinylpyridine	0.8	0.8	1.0	1.1
Phenols ($\mu\text{g}/\text{cig}$)				
Resorcinol	1.0	0.7	0.8	1.0
Phenol	6.8	6.6	7.0	6.8
Catechol	38.0	32.6	35.3	31.9
m.p-cresol	5.4	5.1	5.8	5.3
o-cresol	2.1	2.0	2.2	2.0
Hydroquinone	21.1	18.9	21.0	20.3
Aromatic amines (ng/cig)				
1-aminoaphthalene	10.0	11.1	15.2	17.4
2-aminoaphthalene	6.0	6.6	8.6	9.4
3-aminobiphenyl	1.0	1.1	1.5	1.7
4-aminobiphenyl	0.8	0.9	1.2	1.4
N-nitrosoamine (ng/cig)				
NNN	137.0	134	144.9	124.2
NNK	118.6	122.8	127.2	112
NAT	116.4	113.8	116.6	109.2
NAB	13.7	14.4	14.6	13.7

Abbreviations: TPM, total particulate matter; NNN, *N*-nitrosornicotine; NNK, 4-(*N*-methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; NAT, *N*-nitrosoanatabine; NAB, *N*-nitrosoanabasine.

군 대비 차이가 없었으나, BSA 1, 2, 4 % 첨가 시 앞담배의 전질소 함량은 각각 3.50 %, 3.67 %, 3.90 %로서 BSA 첨가량 의존적으로 각초의 전질소 함량이 증가 하였다(Table 1). 즉 단백질 성분인 BSA가 1 % 증가하면 앞담배의 전질소 함량은 약 0.1 %가 증가되었다.

단백질 함량에 대한 연기성분의 특성을 파악하고자 BSA를 농도별로 첨가한 담배에 대한 TPM, tar 및 nicotine 등 일반성분과 carbonyl류와 같은 가스상 특수 성분 그리고 phenol류와 같은 입자상 특수성분들에 대한 이행량을 측정하였다(Table 2). 조사된 담배의 TPM, tar 및 nicotine 등 일반 성분들에 대한 이행량은 BSA 첨가량과 관계없이 비슷한 값을 보여주었다. 각 담배들에 대한 연기 입자

상 특수성분인 phenol류, aromatic amine류 및 nitrosamine류에 대한 이행량을 조사한 결과, phenol류와 nitrosamine류의 이행량은 담배별 차이가 없었으나 aromatic amine류의 함량은 BSA 첨가량에 따라 농도 의존적으로 증가하였다. 전질소 함량이 0.1 % 증가함에 따라 단위 TPM 당 aromatic amine류의 이행량은 평균 16±5 %씩 증가 하였다(Fig. 1). BSA를 농도별로 첨가한 담배들에 대한 연기 가스상 특수성분인 carbonyl류 및 volatile류에 대한 이행량을 조사한 결과, 1,3-butadiene 및 isoprene과 같은 휘발성이 높은 성분들의 이행량은 BSA 첨가량에 따라 농도 의존적으로 증가하였으나, 대표적인 carbonyl류 화합물인 acrolein의 단위 TPM 당 이행량은 BSA 무처리 담배에 비해 유의적으로 감소되었다(Fig. 1).

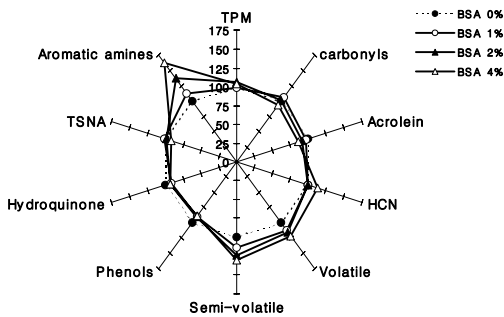


Fig. 1. Relative composition of chemical compounds from mainstream smoke cigarettes. Relative yields for cigarettes treated with 1%, 2 %, and 4 % of BSA represent the relative % to the amount found in the cigarette treated with 0 % of BSA on an equal TPM basis. Concentric rings represent the % found in the BSA-treated cigarettes relative to the amount found in the none added cigarette. Carbonyls: formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, propionaldehyde, crotonaldehyde, MEK, butylaldehyde. Volatiles: acrylonitrile, isoprene, benzene, toluene. Semi-volatiles: 1,3-butadiene, pyridine, quinoline, styrene, 3-vinylpyridine. Phenols: Resorcinol, phenol, catechol, m,p-cresol, o-cresol, hydroquinone. Aromatic amines: 1-aminoaphthalene, 2-aminoaphthalene, 3-aminobiphenyl, 4-aminobiphenyl. TSNA: NNN, NNK, NAT, NAB.

담배연기 입자상(TPM) 분획에 대한 안전성 특성

In vitro 세포독성은 미토콘드리아의 활성을 측정하는 MTT/XTT법과 세포질 막의 손상을 측정하는 LDH법 등 다양한 방법에 의해서 측정된다. 담배시료에 대한 세포독성은 리소솜에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 neutral red uptake 법이 가장 효과적이라고 알려져 있으며 (Putnam *et al.*, 2002), CORESTA에서도 세포독성의 표준방법으로 권장하고 있다(Bombick *et al.*, 2001). 본 연구에서도 BALB/c 3T3 세포를 이용한 neutral red uptake 법을 사용해서 BSA가 0~4 % 첨가된 담배로부터 포집된 TPM에 대한 세포독성을 측정 비교 하였다. Fig. 2에서와 같이, 모든 TPM시료 20~150 ug/ml 처리 시 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소되었으며, 용량-반응식을 이용해서 구해진 TPM 단위 농도당 EC₅₀ 값은 약 60.6-72.5 μg TPM/mL으로서 담배시료 간 유의적인 차이는 없었다(Table 3). 이와 같은 결과는, 담배연기 입자상 성분 중 세포독성에 미치는 기여도가 높은 것으로 알려진 phenol류 화합물의 함량이 담배 간에 차이가 없는 연기성분 분석결과와 일치 된다(Shin, *et al.*, 2007).

화학물질의 돌연변이 유발성 측정은 Maron과 Ames(1983) 등의 plate incorporation 방법이 널리 사용되고 있다. 지금까지의 연구결과에 따르면 대

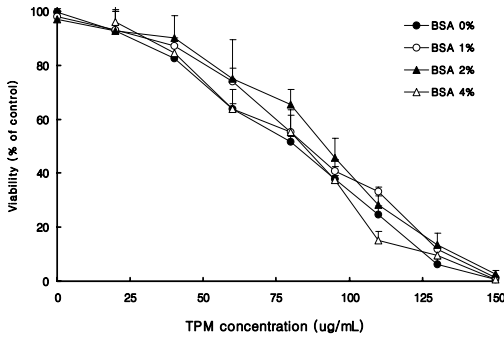


Fig. 2. A comparison of the cytotoxicity of TPM from the test cigarettes. BALB/c 3T3 cells were incubated in the presence of various doses of TPM. Cell viability was determined after 24 hours post-exposure incubation using neutral red uptake assay and calculated as a percentage of the control. Data were expressed as mean±S.D.

Table 3. EC₅₀ values calculated from dose-response curve referring to different definition of exposure dose

Cigarettes	Cytotoxicity (EC ₅₀ , ug-TPM/mL)
BSA 0%	60.6 ± 15.9
BSA 1%	67.7 ± 14.5
BSA 2%	72.5 ± 16.4
BSA 4%	63.8 ± 15.7

EC₅₀ means effective concentration that reduced the number of viable cells in the exposed culture by 50 % compared to the untreated control. Values are the mean±SD of three batches

사활성효소계(S-9 mix)를 처리한 TA98 균주를 사용했을 경우 담배연기 TPM 성분에 대한 돌연변이 활성의 민감도(sensitivity)가 가장 높은 것으로 보고되고 있다(Doolittle *et al.*, 1990). 그러므로 본 연구에서는 TA98 균주를 이용하여 TPM에 대한 돌연변이 유발성을 조사하였다. TA98 균주에 S-9

mix를 첨가한 대사활성법에서 2 µg/plate의 양성대조 물질(2AA) 첨가 시 음성대조군(30-50 집락수)에 비해 복귀돌연변이 집락수가 증가(1000~2000 집락수)되어 본 실험이 적정히 이루어졌음을 알 수 있었다(Data not shown). BSA 함량별 첨가된 담배의 TPM 시료를 0~200 ug-TPM/plate 농도로 처리 시 최고 농도에 이르기까지 용량상관성 있는 집락 수의 증가가 관찰되었으며, BSA 첨가량이 높을수록 집락수의 증가폭이 현저히 높았다(Fig. 3). 용량-반응 기울기를 이용해서 구해진 TPM 단위 농도 당 specific activity는 BSA가 처리되지 않은 대조담배의 경우 집락수는 2720±327 이었으며, BSA를 각각 1, 2, 4 % 첨가시 집락수는 2978±230, 3293±273, 3450±237로 첨가된 BSA 함량 의존적으로 돌연변이 유발성이 증가하였다 (Table 4). 이와 같은 결과는, 담배연기 입자상 성분 중 돌연변이 유발성에 미치는 기여도가 높은 것으로 알려진 aromatic amine류 화합물 함량이, 담배에 처리된 BSA 첨가량이 높을수록 증가된 연기 성분 분석결과와 일치한다(Tewes *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2007). BSA 2 % 이상 첨가 시 무처리 담배에 대한 돌연변이 유발성이 통계학적 유의적인

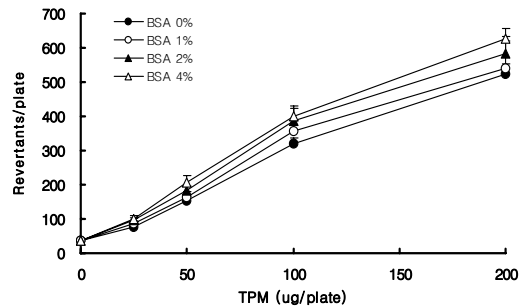


Fig. 3. Dose-response relationship obtained in the *Salmonella*(Ames) assay with TPMs from the test cigarettes in strains TA98. The *Salmonella typhimurium* strains with an S9 metabolic activation system were utilized to examine the potential of the cigarette smoke condensate to induce mutation. The number of revertant colonies in DMSO-treated (0.1 mL/plate) group was 35±6. Values are the mean±SD of three TPM batches.

Table 4. Mutagenicity of TPMs from the test cigarettes in the presence of S9 mix using strains TA 98.

Cigarettes	Specific activity (Revertants/mg-TPM)
BSA 0%	2720 ± 327
BSA 1%	2978 ± 230
BSA 2%	3292 ± 273
BSA 4%	3450 ± 237

Values are the mean±SD of three TPM batches.

차이를 보였으므로, 돌연변이 유발성에 유의적인 차이를 나타내는 전질소 함량은 0.2 % 이상인 것으로 판단된다(Fig. 4).

담배연기 가스상 성분(GVP)에 안전성 평가

담배연기 가스상 성분들에 대한 독성평가는 시료의 휘발성 때문에 평가의 어려움이 있다. 담배연기에 의한 GSH 소모율을 비교함으로써 담배의 독성을 평가하는 방법이 Cahours 등에 의해 제안된 이후, GSH 소모율 측정법은 담배연기 가스상 분획의 독성 평가에 널리 사용되고 있다(Cahours *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007). 본 연구에서는 담배 연소 시 Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 20 mL의 PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas-washing bottle에 포집한 GVP의 GSH 소모율을 측정함으로써 가스상 분획에 대한 독성을 비교 분석 하였다. Table 5에서와 같이, 담배 GVP 시료에 대한 GSH 소모율은 무처리 담배에 비해 BSA 처리 함량이 높을수록 감소되었다.

BSA 4 % 첨가된 담배의 GSH 소모율은 BSA 무처리 담배의 GVP 독성에 비해 유의적으로 낮았다(Fig. 4). 담배연기의 세포독성은 가스상에 들어 있는 carbonyl 계열의 화합물들과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었으며(Wynder and Hoffmann, 1967), acrolein 등은 세포독성 및 GSH 소모율과 정적 상관성이 있다고 알려져 있다(Bombick *et al.*, 1997; Tewes *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2007).

Table 5. GSH consumption caused by GVP from test cigarettes treated with BSA.

Cigarettes	GSH consumption (umol/mg-TPM)
BSA 0%	0.0747 ± 0.0057
BSA 1%	0.0718 ± 0.0109
BSA 2%	0.0651 ± 0.0128
BSA 4%	0.0555 ± 0.0022

Data represent mean±SD of 3 individual experiments.

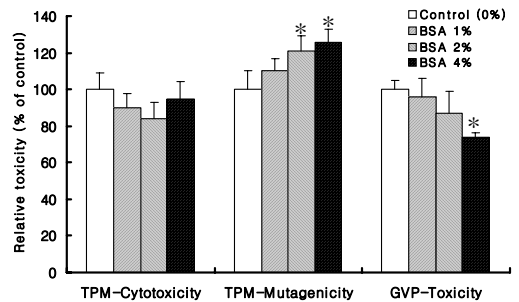


Fig. 4. A comparison of the relative toxicity from the test cigarette. Relative toxicity of the BSA-treated cigarettes represents the relative % of the control cigarette on per an TPM basis. *p<0.05, significant difference from the control cigarette.

BSA 첨가량이 높은 담배의 GVP에 대한 GSH 소모율이 낮아진 결과는, 담배에 처리된 BSA 첨가량이 높을수록 acrolein 이행량이 낮아진 결과와 일치한다.

결 론

본 연구에서는 원료엽의 주요 성분 중 하나인 질소화합물이 담배 주류연 성분 및 안전성에 미치는 영향을 조사하였다. 대표적인 질소화합물인 알부민 단백질(BSA)을 2R4F 표준담배 각초 무게 당 1, 2,

4 %이 되도록 첨가하여 증류수만 처리한 대조담배와 엽중 및 연기성분을 비교 분석하였다. 각 담배들에 대한 연기 이행량을 조사한 결과, aromatic amine류 및 volatile류 들은 BSA 첨가량에 따라 농도 의존적으로 증가하였으나, carbonyl류 화합물인 acrolein의 동일 TPM 농도당 이행량은 BSA 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. BSA가 0~4 % 첨가된 담배로부터 포집된 입자상 분획(TPM)에 대한 세포독성 및 돌연변이 유발성을 측정 비교한 결과, TPM 세포독은 담배시료 간 유의적인 차이는 없었다. BSA 0, 1, 2, 4 % 첨가시 돌연변이 유발성을 나타내는 지표인 specific activity는 각각 2720±327, 2978±230, 3293±273, 3450±237으로서 첨가된 BSA 함량 의존적으로 돌연변이 유발성이 증가하였다. GSH 소모율 측정에 의한 담배 가스상 분획(GVP)에 대한 독성을 비교한 결과, BSA 4 % 첨가 담배의 GSH 소모율은 BSA 무처리 담배에 비해 유의적으로 낮았다. 이와 같은 결과는, 원료엽의 질소화합물은 담배 주류연의 특수성분 및 안전성에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Andreoli, C., Gigante, D. and Nunziata, A. (2003) A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol. in Vitro* 17: 587-594.
- Bombick, D. W., Ayres, P. H., Putnam, K., Bombick, B. R. and Doolittle, D. J. (1998) Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3. *In vitro* toxicity of whole smoke. *Food Chem. Toxicol.* 36: 191-197.
- Bombick, D. W., Bombick, B. R., Ayres, P. H., Putnam, K., Avalos, J., Borgerding, M. F. and Doolittle, D. J. (1997) Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smoke condensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fund. Appl. Toxicol.* 39: 11-17.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.
- Cahours, X., Blanchet, M., Haond, C., Marchand V. and Dumery, B. (2006) A cell-free method to assess the gaseous phase cytotoxicity of cigarette smoke. *Coresta Conference Paris, France* 4.
- Cooper, R. L., Lindsey, A. J. and Wallwe, R. E. (1954) The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke. *Chem. Ind.* 46: 14-18.
- Curvall, M., Enzell, C. R. and Pettersson, B. (1984) An evaluation of the utility of four *in vitro* short term tests for predicting the cytotoxicity of individual compounds derived from tobacco smoke. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 173-193.
- DeMarini, D. M. (1983) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutat. Res.* 114: 59-89.
- Doolittle, D. J., Lee, C. K., Ivett, J. L., Mirsalis, J. C., Riccio, E., Rudd, C. J., Burger, G. T. and Hayes A. W. (1990) Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environ. Mo. Mutag.* 15: 93-105.
- Park, C. H., Sohn, H. O., Shin, H. J., Lee, H. S., Min, Y. K. and Hyun, H. C. (2007) Toxicity assessment of gas phase in cigarette smoke using cell-free assay. *J. Kor. Soc. Tob. Sci.* 29: 110-117.
- Health Canada (1999a) Determination of selected carbonyls in mainstream tobacco smoke. Tobacco Control Program Health Canada-Official method T-104.
- Health Canada (1999b). Determination of 1,3-butadiene, isoprene, acrylonitrile, bensene, and toluene in mainstream tobacco smoke. Official method T-116.

- Health Canada (1999c). Determination of pyridine, quinoline and styrene in mainstream tobacco smoke. Official method T-112.
- Health Canada (2004). Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official method T-502.
- Hamilton, J. L. (1974) *Changes during curing of burley tobacco*. PhD dissertation, University of Kentucky, Xerox University Microfilms, Ann Arbor, Michigan.
- Hamilton, J. L. and Lowe, R. H. (1978) Changes in the concentrations of proteins, amino acids and ammonia in burley tobacco during air curing. *Tob. Sci.*, **22**, 89-93.
- ISO Standard 3402, fourth ed., (1999) International Organization for Standardization. Tobacco and tobacco products-atmosphere for conditioning and testing.
- ISO Standard 4387, third ed., (2000a) International Organization for Standardization. Cigarettes-determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine.
- ISO Standard 3308, fourth ed., (2000b) International Organization for Standardization. Routine analytical cigarette smoking machine-definitions and standard conditions.
- ISO Standard ISO 10315, second ed. and Corrigendum I, (2000c) International Organization for Standardization. Cigarettes determination of nicotine in smoke condensates-gas chromatographic method.
- Leffingwell, J. C. and Leffingwell, D. (1988) Chemical and sensory aspects of tobacco flavor. *Rec. Adv. Tob. Sci.*, **14**, 169-218.
- Manabe, S. and Wada, O. (1990) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in cigarette smoke condensate and cigarette smoke-polluted indoor air. *Environ. Pollute.* **64**: 121-132.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
- Phillips, D. H. (2002) Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* **23**: 1979-2004.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W. and Doolittle D. J. (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. in Vitro* **16**: 599-607.
- Rodgman, A. and Green, C. R. (2003) Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke-hazard and hoopla. *Beitrage zur Tabakforschung* **20**: 481-545.
- Shin, H. J., Sohn, H. O., Park, C. H., Lee, H. S., Min, Y. K. and Hyun, H. C. (2007) Evaluation of the *in vitro* biological activity of selected 35 chemicals. *J. Kor. Soc. Tob. Sci.* **29**: 30-40.
- Shmuk, A. A. (1953) *The Chemistry and Technology of Tobacco*. Pishchepromedat, Moscow
- Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J., Roemer, E. and Patskan, G. (2003) Toxicological evaluation of electrically heated cigarette. Part 3: genotoxicity and cytotoxicity of mainstream smoke. *J. Appl. Toxicol.* **23**: 341-348.
- Wynder, E. L. and Hoffmann, D. (1967) Tobacco and tobacco smoke: studies in experimental carcinogenesis, Academic Press, New York.