

고효율 컬럼과 RRLC를 이용한 담배 주류연 중 페놀 화합물의 분석 효율화

민혜정* · 강영희 · 이정민 · 장기철
KT&G 연구원

(2010년 5월 13일 접수 ; 2010년 5월 27일 수정 ; 2010년 6월 4일 승인)

Enhancement of Analytical Method for Phenolic Compounds in Mainstream Cigarette Smoke Using High Efficiency Column and RRLC system

Hye-Jeong Min*, Young-Hee Kang, Jeong-Min Lee and Gi-Chul Jang

KT&G Research Institute, Daejeon 305-805, Korea

(Received May 13, 2010; Revised May 27, 2010; Accepted June 4, 2010)

ABSTRACT : This study was carried out to enhance the analytical methods of phenolic compounds in mainstream cigarette smoke using high efficiency column and RRLC(Rapid Resolution Liquid Chromatography) system, and to compare these methods. RRLC system offers significantly faster results with higher data quality of phenolic compounds than conventional HPLC, but it is disadvantage that it is expensive. On the other hand, the method using monolithic column offers faster results by the use of conventional HPLC system without new equipment introduction. In this study, we used the linear type smoking machine and Health Canada method for pre-treatment process of phenolic compounds. The analysis time of phenolic compounds using RRLC and monolithic column was individually 8 and 15 minutes, whereas in the conventional HPLC it was 45 minutes. These new methods were accompanied with the minimal solvent consumption and had lower analysis costs. Also, we proved that there were no difference between new methods and conventional method in accuracy by statistic.

Key words : phenolic compounds, mainstream cigarette smoke, monolithic, RRLC

현재 페놀 화합물은 식품 산업에서 aroma와 flavoring agent로써 널리 이용되고 있고 중요한 성분으로 관심을 받고 있다(Brown *et al.*, 2009). 담배의 경우, 페놀화합물은 담배 성분의 열분해에 의해서 생성되는 담배 연기의 입자상 성분으로 약 280 여종이 존재하는 것으로 보고되어 있다

(Chortyk *et al.*, 1987). 담배 주류연 중에 존재하는 선택적인 페놀 화합물은 담배 열분해를 통해 지속적으로 확인되고 있으며, 이들 물질은 담배 앞에 존재하는 lignin, cellulose, protein, amino acid와 sugar 등으로부터 생성되는 것으로 알려져 있다(Count *et al.*, 2005; Dooly *et al.*, 2000). 담배

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 연구원

*Corresponding author : KT&G Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea
(phone: 82-42-866-5559; fax: 82-42-866-5544; e-mail: 20055216@ktng.com)

주류연에 존재하는 주요 페놀 화합물로는 hydroquinone, resorcinol, catechol, phenol, cresol 등이 있으며, 이 중 hydroquinone, catechol과 이들의 유도체들은 독성을 가지고 돌연변이를 유발한다고 알려져 있다(Chouchane *et al.*, 1987). 현재 페놀 화합물은 Hoffman's 성분으로써 담배 유해성 감소 목적으로 분석되고 있다.

현재 7종의 페놀 화합물이 분석되고 있으며 Fig. 1에 나타내었다. 기존의 상업적인 C₁₈ 컬럼과 HPLC 시스템을 이용한 방법은 전처리 과정이 간단하고 성분에 대한 좋은 분리능을 가지는 장점이 있으나, 분석 시간이 길어 하루에 처리할 수 있는 시료의 양이 제한적이고 분석에 필요한 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 따라서 이런 단점을 보완하기 위해 보다 선택적이고 뛰어난 분석방법이 필요하다.

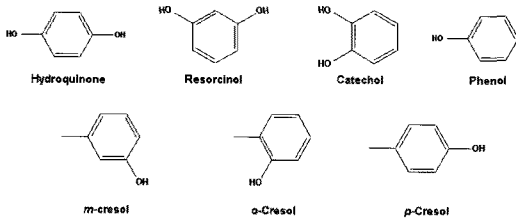


Fig. 1. Structure of major phenolic compounds.

고효율 컬럼인 monolithic 컬럼은 작은 입자를 가진 기존의 컬럼과는 달리 한 덩어리의 실리카 겔(silica gel)을 가공한 컬럼으로써 빠른 유속 조건에서 낮은 압력과 높은 분리능을 가져 HPLC 시스템을 빠르게 안정화시킬 수 있고, 분석 시간을 단축시킬 수 있다. RRLC(Rapid Resolution Liquid Chromatography) 시스템과 RR(Rapid Resolution) 컬럼은 기존의 HPLC 시스템에 비하여 좋은 분리능을 가지며 월등히 빠른 시간 안에 목적 화합물의 분석이 가능하다. 따라서 본 실험에서는 최근 들어 많은 연구가 이루어지고 있는 빠르고 효율화된 RRLC 시스템과 고효율 컬럼 기술을 적용하여 담배 주류연 중 페놀 화합물의 분석 방법을 효율화하였고, 분석기술을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 표준물질인 hydroquinone, resorcinol, catechol, phenol, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol은 aldrich(Missouri, USA)에서 구입하였다. 3R4F 표준담배는 Kentucky Tobacco Research & Development Center(University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로 부터 구입하였다. HPLC 등급의 acetonitrile은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, 분석용 시약 등급의 acetic acid는 aldrich(Missouri, USA)에서 구입하였다. 분석에 사용한 제품담배는 국내에서 시판되는 담배를 구입하여 사용하였다.

담배 흡연 및 시료 추출

담배는 선형 자동흡연장치(Cerulean SM 450, UK)를 이용하여 ISO 표준흡연조건 (puff volume : 35 mL, puff frequency : 60초, puff duration 2초) 하에서 3 개피를 연소하였다. 주류연의 입자상 물질은 44 mm Cambridge filter pad(CFP)를 이용하여 포집하였으며 모든 담배는 흡연 전에 상대습도 60 ± 2%와 온도 22 ± 1°C로 조절되는 조화실에서 48시간 이상 조화한 후 사용하였다.

담배 주류연의 입자상 물질이 포집된 Cambridge filter pad는 홀더에서 분리하여 50 mL 삼각플라스크에 넣은 다음 1% acetic acid 수용액 30 mL를 넣어 30분간 진탕 추출하였다. 추출된 시료는 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 LC로 분석하였다.

분석 장비 및 분석 조건 최적화

HPLC 시스템과 monolithic 컬럼 적용

분석에 사용한 HPLC 시스템은 quaternary pump 시스템을 사용하는 Waters Alliance 2690(USA)을 사용하였고 검출기는 형광 검출기를 이용하였다. 분석용 컬럼은 4.6 mm의 내경과 100 mm의 길이를 갖는 Chromolith Performance RP-18e 컬럼(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 분석 물질의 분리를 위하여 사용한 이동상은 A : 2% acetonitrile + 1% acetic acid 수용액, B : acetonitrile이며, 초기에 A : B의 비율을 100 :

0로 유지한 후 10분 까지 A : B 의 비율을 40 : 60으로 변화시킨 후 15분 까지 A : B 의 비율을 다시 100 : 0으로 변화시키는 기울기 용리 방법을 시행하였다. 이때 이동상의 유속은 1.0~3.0 mL/min, 컬럼 온도는 30~40℃(컬럼 최대 온도 : 45℃)으로 변화시켜 분석 조건을 최적화 하였다.

RRLC 시스템과 RR 컬럼 적용

분석에 사용한 RRLC 시스템은 binary pump 시스템을 사용하는 Agilent 1200 series (USA)와 형광 검출기의 조합으로 구성되어 있다. 분석용 컬럼은 4.6 mm의 내경과 50 mm의 길이, 1.8 μm의 입자크기를 갖는 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 컬럼 (Agilent, USA)을 사용하였다. 분석 물질의 분리를 위하여 사용한 이동상은 A : 1% acetonitrile + 1% acetic acid 수용액, B : acetonitrile이며, 초기에 A : B의 비율을 100 : 0로 유지한 후 6.5분 까지 A : B 의 비율을 40 : 60으로 변화시킨 후 8분 까지 A : B 의 비율을 다시 100 : 0으로 변화시키는 기울기 용리 방법을 시행하였다. 이때 유속은 1.0~3.0 mL/min, 컬럼 온도는 30~40℃(컬럼 최대 온도 : 60℃)으로 변화시켜 분석 조건을 최적화 하였다.

분석대상 성분들의 최적 분석 조건을 확립한 후 3R4F와 국내 시판 담배를 분석하여 두 결과값의 차이를 검증하는 통계적 방법인, T-test를 실시하여 정확성을 검증하였다.

결과 및 고찰

HPLC 시스템과 monolithic 컬럼 적용

이동상의 유속을 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 mL/min로 변화시킨 결과 유속이 증가 할수록 분석 속도, 압력과 peak sensitivity가 증가하였다. Monolithic 컬럼의 특성상 유속이 크게 증가하더라도 시스템과 컬럼에 무리를 주지 않으면서 압력이 증가하는 경향을 보였다. 유속 변화에 따른 분리능은 목적 성분과 담배 시료와의 matrix를 고려하여 2.5 mL/min로 최적화 하였다. 컬럼 온도를 30, 35 및 40℃로 변화시킨 결과 monolithic 컬럼은 분석 온도의 영향을 크게 받지 않고 각 온도마다 유사한 분리능 결과를 나타내었다. HPLC 시스템과 monolithic 컬럼을 사용한 페놀 화합물의 최적 분석 조건은 유속 2.5 mL/min, 컬럼 온도 30℃로 분석 조건을 확립하였다. 본 연구에서 확립한 분석법과 기존 분석법을 이용하여 3R4F 표준 담배에 대하여 페놀 화합물을 분석하여 Fig. 2에 나타내었다. 기존 분석법의 총 분석 시간인 45분에 비하여 monolithic 컬럼을 사용한 분석법에서는 좋은 분리능을 유지하면서 총 분석 시간을 15분으로 현저하게 감소시킬 수 있었다. 통계적인 방법을 이용하여 기존의 방법과 본 연구의 방법을 사용하여 3R4F와 국내 시판 담배로 정확성을 검증하였으며 그 결과를 Table 1 과 2에 나타내었다. 95% 신뢰구간에서 두 데이터간

Table 1. Contents of phenolic compounds in the 3R4F cigarette smoke using HPLC system and Monolithic column.

Analyte	HPLC / C ₁₈		HPLC / Monolithic		T-test
	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)	p-value
Hydroquinone	32.52	3.3	31.96	4.3	0.489
Resorcinol	0.58	9.1	0.54	5.5	0.178
Catechol	34.57	6.8	36.44	4.2	0.174
Phenol	6.90	4.5	6.82	4.5	0.208
<i>m+p</i> -Cresol	5.80	3.7	5.76	4.9	0.218
<i>o</i> -Cresol	2.13	12.6	2.07	6.8	0.730

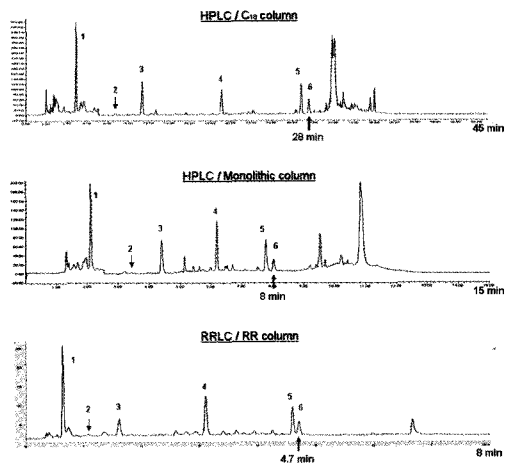
Table 2. Hydroquinone contents of some domestic cigarette smoke using HPLC system and Monolithic column

Tar	HPLC / C ₁₈		HPLC / Monolithic		T-test
	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)	p-value
1 mg	7.94	4.3	7.60	7.5	0.420
3 mg	18.63	3.3	18.90	5.1	0.710
5 mg	31.01	4.8	32.71	2.5	0.159
7 mg	29.93	0.8	31.08	3.0	0.115

T-test를 실시하여, p-value를 비교한 결과 유의차가 없음을 확인하였다(p-value > 0.05 : 두 데이터 간 차이 없음).

RRLC 시스템과 RR 컬럼 적용

기존의 C₁₈ 컬럼(내경 4.6 mm, 길이 300 mm)의 경우 컬럼 내 충전 물질의 입자 크기가 5 μm인데 반하여 RR 컬럼은 1.8 μm로 동일 유속에서 압력이 2배 이상 증가하므로 HPLC보다 고성능의 LC인 RRLC가 필요하다. 이동상의 유속을 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 mL/min로 변화시킨 결과 유속이 증가할수록 분석 속도와, 압력은 증가하나 peak sensitivity가 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다. 분석대상 성분의 분리능과 담배 시료의 matrix, RRLC 시스템의 안정성을 고려하여 유속은 2.0 mL/min로 최적화 하였다. 컬럼 온도를 30, 35 및 40 °C로 변화시킨 결과 온도가 증가함에 따라 분석 속도는 증가하면서 압력은 감소하는 경향을 보였고, 분석대상 성분의 분리능에 영향을 주지 않으면서 분석 속도를 향상시키는 40 °C에서 분석 온도를 최적화 하였다. RRLC 시스템과 RR 컬럼을 사용한 페놀 화합물의 분석은 유속 2.0 mL/min, 컬럼 온도 40°C로 분석 조건을 확립하였다. 본 연구에서 확립한 분석법과 기존 분석법을 이용하여 3R4F 표준 담배에 대하여 페놀 화합물을 분석하여 Fig. 2에 나타내었다. 기존 분석법의 총 분석 시간인 45분에 비하여 RRLC 시스템과 RR 컬럼을 사용한 분석법에서는 총 분석 시간이 8분으로 기존 분석법에 비해 5배 이상 감소시킬 수 있었다. RRLC 시스템과



1 : Hydroquinone, 2 : Resorcinol, 3 : Catechol, 4 : Phenol, 5 : m+p-Cresol, 6 : o-Cresol

Fig. 2. Chromatogram of 3R4F reference cigarette smoke.

RR 컬럼 분석법 또한 통계적인 방법을 이용하여 기존의 방법과 본 연구의 방법을 사용하여 3R4F와 국내 시판 담배로 정확성을 검증하였으며 Table 3 과 4에 나타내었다. 95 % 신뢰구간에서 두 데이터 간 T-test를 실시하여, p-value를 비교한 결과 유사한 값을 가짐을 확인하였다(p-value > 0.05 : 두 데이터 간 차이 없음).

담배 주류연 중 페놀 화합물을 분석하는 기존의 분석법과 본 연구로 최적화한 방법들을 비교하여 Table 5에 나타내었다. HPLC 시스템과 monolithic 컬럼으로 최적화한 방법은 기존의 방법보다 분석

Table 3. Contents of phenolic compounds in the 3R4F cigarette smoke using RRLC system and RR column.

Analyte	HPLC / C ₁₈		RRLC / RR column		T-test
	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)	p-value
Hydroquinone	31.24	4.6	31.42	4.2	0.841
Resorcinol	0.73	6.0	0.67	6.4	0.071
Catechol	38.36	5.2	38.21	6.2	0.918
Phenol	7.26	8.4	7.81	7.9	0.192
<i>m+p</i> -Cresol	6.16	7.0	5.84	6.7	0.256
<i>o</i> -Cresol	2.47	6.9	2.42	7.0	0.696

Table 4. Hydroquinone contents of some domestic cigarette smoke using RRLC system and RR column.

Tar	HPLC / C ₁₈		RRLC / RR column		T-test
	Contents (ng/cig)	CV (%)	Contents (ng/cig)	CV (%)	p-value
1 mg	8.3	3.2	8.4	3.1	0.713
3 mg	20.97	5.1	21.13	4.9	0.818
5 mg	35.84	4.2	36.42	4.7	0.589
7 mg	30.55	3.2	31.71	2.8	0.087

Table 5. Comparison of analytical method.

	HPLC		RRLC
	Conventional C ₁₈	Monolithic	RR
Flow Rate (mL/min)	1.5	2.5	2.0
Analysis Temp. (°C)	30	30	40
Analysis Time (min)	45	15	8
Solvent Consumption (mL)	68	38	16
1 Day Sample (ea)	32	96	180

시간과 용매 소비량을 각각 1/3과 1/2로 절약하면서 1일 시료 처리량을 2배까지 증가시킬 수 있음을 확인하였다. RRLC 시스템과 RR 컬럼을 적용한 방

법은 짧은 시간에 적은 용매 사용으로 가장 많은 시료의 페놀 화합물 분석이 가능하여 분석 효율이 가장 좋으며, 분석에 소요되는 비용 또한 절감할 수

있음을 확인하였다. HPLC 시스템과 monolithic 컬럼을 적용한 방법의 경우 새로운 장비의 도입 없이 기존 장비를 이용할 수 있는 반면, RRLC 시스템과 RR 컬럼을 적용한 방법은 고가의 장비를 구입해야 하는 단점이 있었다.

결 론

본 연구에서는 Hoffman's 성분으로써 담배 유해 성분의 모니터링을 위해 분석되고 있는 7가지 폐놀 화합물에 대한 분석 효율화를 시도하였다. HPLC 시스템과 monolithic 컬럼, RRLC 시스템과 RR 컬럼을 사용하여 분석법을 확립하였다. 그 결과 분석 시간과 용매 소비량을 줄이면서 처리할 수 있는 분석 시료량을 증가시킬 수 있는 분석 효율화를 꾀할 수 있었으며, 확립된 분석법을 이용하여 3R4F 표준담배와 몇몇의 국내 시판 담배를 분석한 결과, 통계분석을 이용하여 기존의 분석법과 정확도에 차이가 없음을 확인하였다. 고효율 컬럼과 RRLC 시스템을 이용한 방법은 HPLC를 이용하는 성분에 선택적으로 적용되어 기존의 분석법 개선과 새로운 분석법 개발에 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Brown A. P., Chan W. G., McGrath T. E., Meruva N. K. (2009) Phenolic compound formation from the low temperature pyrolysis of tobacco. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 84: 170-178.
- Chortyk O. T., Schlotzhauer W. S. (1987) Recent advances in studies on the pyrosynthesis of cigarette smoke constituents. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 12: 193-222.
- Counts M.E., Cox R.H., Laffoon S.W., Lipowicz P.J., Morton M.J., (2005) Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regul. Toxicol. Pharmacol* 41: 185-227.
- Dooly G. L., Forehand J. B., Moldoveanu S. C. (2000) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols and aromatic amines in particulate phase cigarette smoke using simultaneous distillation and extraction as a sole sample clean-up step. *J. Chromatogr. A* 898: 111-124.
- Chouchane S., Diekmann J., Müller B. P., Tewes F. J., Veltel D., Wittig A., Wooten J. B. (2006) Involvement of Semiquinone Radicals in the in Vitro Cytotoxicity of Cigarette Mainstream Smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 1602-1610.