

## 대기-P6 GC/NPD를 이용한 소변 중 니코틴과 코티닌의 동시 분석

김희갑\*, 박미진  
강원대학교 환경과학과

### 1. 서론

니코틴(Nicotine)은 담배 식물과 일부 식품용 식물에서 발견되는 천연 알칼로이드 화합물로서(Davis et al., 1991), 인체 내에서 짧은 시간 이내에(반감기 2시간) 코티닌(cotinine)으로 대사된다. 코티닌은 오랜 시간에 걸쳐(반감기 약 20 ~ 30시간) 소변을 통해 배설되기 때문에, 소변 중 코티닌의 농도(크레아티닌의 농도로 보정)는 환경 중 담배 연기(Environmental Tobacco Smoke, ETS)에 대한 노출의 생체지표(Biomarker of Exposure)로서 널리 이용되어 왔다(James et al., 1998).

혈액이나 소변과 같은 생체시료 중 니코틴이나 코티닌에 대한 분석 중 GC를 이용한 방법에서는 일반적으로 시료를 유기 용매(chloroform, dichloromethane 등)로 추출한 후 감압회전증발기나 질소 기체로 농축한 후에 모세관 칼럼을 통해 분리하고 MS(SIM mode)나 NPD와 같은 선택성 있는 검출기를 이용하였다(Scarping et al., 1988). 그러나, 소변의 경우 시료마다 함유된 물질들의 농도가 다르므로 추출 효율에 있어서 차이가 존재할 수 있고, 추출한 용액을 농축하는 과정에서 니코틴이나 코티닌이 일부 손실될 수 있기 때문에 소량의 용매를 이용하여 추출한 후에 직접 분석하는 방법이 제안되기도 하였다(Verebey et al., 1982).

본 연구에서는 기존의 방법들을 기초로 하여 추출 효율을 최대화하고 농축 과정에서의 손실 정도를 실험을 통해 검증하고, GC/NPD를 이용하여 니코틴과 코티닌을 동시에 분석하는 방법을 확립하였으며, 이를 일부 비흡연자와 흡연자들로부터 얻은 소변 시료에 적용하였다.

### 2. 재료 및 실험 방법

#### 2.1. 시약

(S)-(-)-Nicotine, (-)-cotinine, 2-(dimethylamino)pyridine(DMAP, 내부표준물질) 및 dichloromethane(DCM)은 Sigma-Aldrich에서, methanol(MeOH)은 Fluka Chemie에서 구입하였다. Sodium hydroxide(NaOH), sodium sulfate( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 및 hydrochloric acid(37%)는 각각 Duksan Pure Chemical Co., Shinyo Pure Chemicals Co. 및 Osaka Co.에서 구입하였다. 구입한 시료는 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

#### 2.2. 설문 조사와 소변 시료의 채취

강원대학교에 재학 중인 19 ~ 26세의 남녀 학생 37명으로 소변 시료를 채취하여 실

험실로 옮겨 분석 전까지 냉장고에 보관하였고 48시간 이내에 추출하여 분석하였다. 또한, 소변의 부피에 대하여 보정하기 위해 크레아티닌의 농도를 측정하였고, 코티닌의 농도를 크레아티닌의 농도로 나눈 값(cotinine/creatinine ratio, CCR)을 자료 분석에 이용하였다.

### 2.3. 분석 기기 조건

분석에 사용된 GC와 NPD는 도남 인스트루먼트사의 DS6200A이었으며, 분석용 칼럼은 BP-5(SGE)로 필름의 두께는  $0.25\mu\text{m}$ 이고, 길이는 30m, 내경은 0.32mm이었다. 주입구와 검출기의 온도는 각각  $240^{\circ}\text{C}$ 와  $300^{\circ}\text{C}$ 이었고, 분석 시료는 1:4로 분할 주입하였다. 오븐의 온도는 초기에  $110^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 머무른 후에,  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로  $260^{\circ}\text{C}$ 까지 온도를 상승시킨 후에 11분 동안 유지하였다.

### 2.4. 분석 시료의 제조

소변 시료 중 니코틴과 코티닌에 대하여 확립된 분석 방법은 다음과 같다. 15mL 용량의 원추형 원심분리관(Kimble 45166-15)에 소변 4mL를 넣고 5N NaOH 용액 1mL를 가하였다(pH 12.5). 여기에 4mL의 DCM을 가한 후에  $0.315\text{mg}/\text{mL}$ 의 농도로 제조된 내부 표준물질(DMAP)  $4\mu\text{L}$ 를 가하였다. 여기에  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.2g을 넣고 1분 동안 격렬하게 vortex mixing한 후에, 3,500rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. DCM층의 대부분은 50mL 용량의 분액깔때기로 옮긴 후에, 이 중 3.5mL를 또다른 원심분리관으로 옮겼다. 여기에 0.1mL의 0.5N HCl in MeOH 용액을 첨가하여 잘 섞어 준 후에 질소 가스로 불어 주어 건조시키고 0.3mL의 MeOH을 첨가하여 vortex mixing한 후에  $2\mu\text{L}$ 를 GC/NPD를 이용하여 분석하였다.

정량을 위한 검량선은 여섯 점의 농도를 이용하여 작성하였으며, 니코틴 및 코티닌의 농도 범위는 각각  $2.02 \sim 141\text{ng}/\text{mL}$  및  $13.6 \sim 952\text{ng}/\text{mL}$ 로 정하였다. 정량을 위한 식은 분석 물질의 농도( $Q_x$ )와 각 농도에 대하여 추출하여 분석한 니코틴 또는 코티닌에 대한 GC 크로마토그램의 피크 면적( $A_x$ )을 내부표준물질에 대한 피크 면적( $A_{is}$ )으로 나눈 값( $A_x/A_{is}$ )과의 직선의 관계식으로부터 구하였다.

### 2.5. 회수율 및 재현성 시험

위의 과정과 동일한 방법으로 시료를 준비하되  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 의 첨가 여부에 따른 추출 효율을 비교하기 위하여, 니코틴과 코티닌에 대하여 낮은 농도( $10.1$  및  $68.0 \text{ ng}/\text{mL}$ )와 높은 농도( $60.6$  및  $408 \text{ mg}/\text{mL}$ )에 대하여 소변 시료에 염을 첨가하지 않은 경우와 1.2g(소변 4mL를 포화시키기에 충분한 양)을 첨가하여 제조된 시료를 분석하여 얻은 피크 면적을 비교하였다. 또한, 추출 후 농축하기 전에 0.5N HCl in MeOH의 첨가 여부에 따른 내부 표준물질, 니코틴 및 코티닌의 손실 정도를 비교하여 보았다. 이와 같은 실험은 각각 두 번 반복하여 실시하였다. 회수율과 재현성에 대한 시험은 각 농도에 대하여 세 번씩 반복하여 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 검량선, 회수율 및 재현성

GC/NPD를 이용하여 분석한 시료에 대한 크로마토그램 중 하나를 Fig. 1에 나타내었다. 내부표준물질, 니코틴 및 코티닌의 머무름 시간은 각각 5.85, 9.43 및 12.65이었다. 여섯 점에 대하여 그런 니코틴과 코티닌의 정량을 위한 검량선은 Fig. 2에 나타내었는데, 니코틴 및 코티닌에 대한 검량선의 결정계수( $r^2$ )는 각각 0.9970과 0.9998로 좋은 직선의 관계를 나타내었으며, 여기에서 구한 직선의 회귀식으로부터 각 시료 중에 함유된 코티닌의 농도를 구하였다.

S/N비 3을 기준으로 추정된 니코틴과 코티닌에 대한 검출한계 값은 각각 0.60과 5.1ng/mL이었다. 여섯 농도에 대하여 측정된 재현성과 회수율은 Table 1에 나타내었다. 재현성은 백분율 변동계수(CV, Coefficient of Variation)로 나타내었는데, 니코틴의 가장 낮은 농도를 제외하면 모두 10% 이내의 범위에 들었다. 회수율은 소변 중에 표준물질을 주입하여(spike) 추출한 후에 분석하여 측정된 농도를 초기에 주입한 농도로 나눈 값을 백분율로 표시하였다. 니코틴의 한 농도(30.3ng/mL, 66%)를 제외하고는 90% 이상의 높은 회수율을 나타내었다.

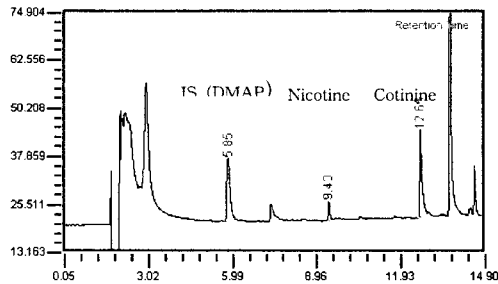


Fig. 1. Chromatogram of the internal standard (IS), nicotine, and cotinine extracted from a smoker's urine sample with 2- $\mu$ L injection.

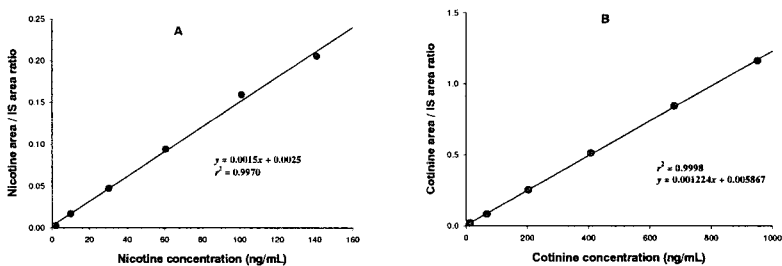


Fig. 2. The linear calibration curves for nicotine (A) and cotinine (B) in urine. The coefficients of determination ( $r^2$ ) for nicotine and cotinine are 0.9970 and 0.9998, respectively. IS stands for the internal standard spiked to each aliquot of urine in the same amount, 2-(dimethylamino)pyridine (DMAP).

Table 1. Reproducibility and average recovery at various concentrations of cotinine in urine<sup>a</sup>

| Nicotine                    |                                  |                           |                     | Cotinine                    |                                  |              |        |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------|--------|
| Concentration added (ng/mL) | Concentration determined (ng/mL) | Recovery (%) <sup>c</sup> | CV (%) <sup>b</sup> | Concentration added (ng/mL) | Concentration determined (ng/mL) | Recovery (%) | CV (%) |
| 2.01                        | 1.95                             | 96                        | 11.2                | 13.6                        | 12.0                             | 88           | 5.0    |
| 10.1                        | 9.66                             | 96                        | 4.4                 | 68.0                        | 64.5                             | 95           | 1.4    |
| 30.3                        | 20.1                             | 66                        | 4.2                 | 204                         | 203                              | 100          | 0.9    |
| 60.6                        | 61.4                             | 101                       | 6.2                 | 408                         | 393                              | 96           | 5.1    |
| 101                         | 105                              | 103                       | 2.3                 | 680                         | 686                              | 101          | 2.7    |
| 141                         | 135                              | 96                        | 7.3                 | 952                         | 946                              | 99           | 8.4    |

<sup>a</sup>A urine sample was extracted three times and analyzed on the same day.

<sup>b</sup>Percent coefficient of variation.

<sup>c</sup>Average recovery of three measurements.

### 3.2. 추출 효율과 농축과정에서의 손실

위에서 보여준 분석 방법에서 농축하기 전 HCl의 첨가 여부에 따른 내부표준물질, 니코틴 및 코티닌의 손실 정도를 평가하였는데, 그 중 높은 농도(니코틴 60.6, 코티닌 408 ng/mL)에 대하여 얻은 결과(피크의 면적)를 Fig. 3에 나타내었다. 내부표준물질과 니코틴의 경우, HCl을 첨가하지 않고 농축시킨 경우 피크를 관찰할 수 없었으며 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하지 않았을 때는 다소 면적이 감소하였다. 코티닌의 경우에는 모두 피크가 관찰되었으나, HCl이나 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하지 않았을 때 둘 다 첨가된 경우에 비해 피크 면적이 감소됨을 알 수 있었다. 따라서, 소변 시료에 염을 첨가함에 따라 추출 효율이 증가되고, 추출액에 HCl을 첨가하여 증으로써 HCl 염을 생성하여 질소 기체로 농축할 때의 손실을 최소화할 수 있음을 알 수 있었다.

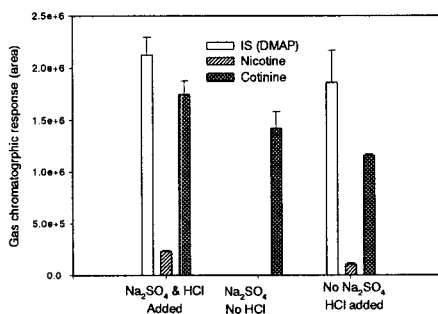


Fig. 3. Variation of chromatographic responses with/without sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) before extraction and/or hydrogen chloride (HCl) prior to the concentration of the extract using a mild stream of nitrogen gas. The addition of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and HCl resulted in the increase of responses.

### 3.3. 흡연자와 비흡연자 간의 CCR 비교

흡연자로 분류된 17명은 모두 남학생으로 최소 하루에 5개비에서 최고 30개비까지의 담배를 피웠다. 본 연구에 참여한 남학생 중 비흡연자는 단 4명에 불과하였으며, 16명의 여학생들은 모두 비흡연자로 분류되었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 흡연자 집단은 비흡연자 집단에 비해 높은 CCR값을 나타내었으며, 이는 등분산을 가정한  $t$ -검정에서 유의차가 있는 것으로 나타났다( $p = 0.0000127$ ).

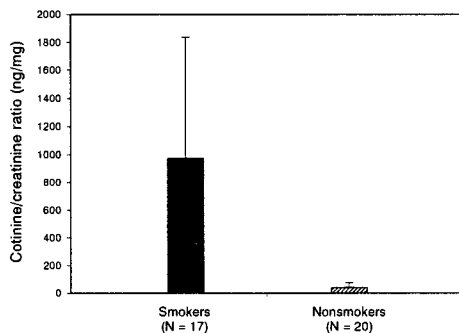


Fig. 4. Cotinine/creatinine ratios (CCR) in the groups of smokers (N=17) and nonsmokers (N=20). CCRs were significantly different between the two groups at 5% significance level.

### 4. 결론

소변 시료 중 니코틴과 코티닌을 분석하기 위해 시료를 염기성으로 만든 후,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 추출 효율을 증대시키고 DCM으로 추출한 후에, 질소 기체로 농축하기 전에 HCl을 소량 첨가하여 손실을 최소화할 수 있는 방법을 확립하였다. 이 분석 방법으로 좋은 직선관계의 검량선과 재현성 및 회수율을 얻을 수 있었으며, 이를 일부 성인 남녀 흡연자와 비흡연자에 대하여 적용시킨 결과, 흡연자 집단이 비흡연자 집단에 대해 통계적으로 유의성 있는 높은 수치를 나타내었다.

### 5. 참고 문헌

- Davis, R.A., M.F. Stiles, J.D. Debethizy, and J.H. Reynolds, 1991, Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Fd. Chem. Toxic.* 29(12), 821-827.
- James, H., Y. Tizabi, and R. Taylor, 1998, Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 708, 87-93.
- Verebey, K.G., A. DePace, J. Mule, M. Kanzler, J.H. Jaffe, 1982, A rapid quantitative GLC method for the simultaneous determination of nicotine and cotinine. *J. Anal. Toxicol.* 6, 294-296.
- Skarping, G., S. Willers, and M. Dalene, 1988, Determination of cotinine in urine using glass capillary gas chromatography and selective detection, with special reference to the biological monitoring of passive smoking. *J. Chromatogr.* 454, 293-301.