

니코틴의 미량 정량법

김 신 일 · 김 찬 호

한국인삼연초연구소 분석연구소

Determination of Microquantities of Nicotine

Sin-Il Kim and Chan-Ho Kim

Lab. of Analysis,

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul, Korea

(Received Aug. 29, 1981)

Abstract

A new spectroscopic method was developed to determine microquantities of nicotine with cyanogen chloride and pyrazolon. Absorption maximum of the derivative solution appeared at 520nm.

The color formed in the proposed method was stable for at least 30 min. at pH 7.5, and followed the Lambert-Beer's law between the limits of 1 and 5 micrograms of nicotine. The relative errors in burley and flue-cured tobacco leaves were $\pm 5\%$ in comparison with the Griffith method.

서 론

담배중 니코틴 알카로이드의 정량은 용매추출에 의하는 방법(8), 캐스크로마토그래피에 의하는 방법(10)이 있지만 조작의 편의에 따라 흡수분광도법이 보다 자주 이용 된다. 흡수분광도법은 수증기 증류법에 의해 유출된 니코틴을 자외부에서 흡광도를 측정하는 방법(4, 9)과 니코틴의 피리딘 고리를 개환시키고 개환된 화합물을 발색시약으로 발색시켜서 가시부에서 흡광도를 측정하는 방법(1, 3, 5, 6, 7)으로 나누어 진다.

가시부에서 흡광도를 측정하는 방법은 피리딘고리를 시안화브롬을 사용하여 개환하는데 이 시안화브롬은 용액중에서, 실온에서도 휘발하여 독성을 나타내기 때문에 실제 조작상에 불편한 점이 없지 않다. 그리고 이 방법은 니코틴의 최종농도가 $10\mu\text{g}$ 이상이어야 하며 $10\mu\text{g}$ 이하에서는 측정값이 비례성을 유지하지 않는다. 특히 이 조작에서는 잎담배중의 색

소물질을 제거시키기 위해 활성탄을 첨가하는데 이 활성탄은 색소물질 이외에도 니코틴 알카로이드를 흡착하기 때문에 (-)의 오차원인이 될 수 있는 결점을 가지고 있다.

이 연구에서는 니코틴의 피리딘 개환제로 시안화칼륨과 클로라민 T(chloramine T)를 사용하여 시안화클로르(cyanogen chloride)를 용액중에서 생성하도록 하였으며, 이 시안화클로르가 반응에 참여하여 글루타콘 알데히드(glutacon aldehyde)를 생성하게 되고, 알데히드가 피라졸론(pyrazolon)과 반응하여 핑크빛 염료 물질을 만든다. 여기서 생성된 염료색상을 측정하여서 니코틴량을 간접적으로 정량하는 방법을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

클로라민 T시약은 클로라민 T(chloramine T, SH-OVA, 특급) 0.25g을 증류수 100ml에 용해시켜 조제하였다.

시안화칼륨 시약은 시안화칼륨(potassium cyanide, WAKO, 특급) 0.125g을 증류수 100ml에 용해시켜 조제하였다.

인산염완충용액(phosphate buffer solution)은 인산이수소칼륨(potassium phosphate, monobasic, WAKO, 1급) 0.5g와 인산수소칼륨(potassium phosphate, dibasic, WAKO, 1급) 3.5g를 증류수에 용해하여 10가 되도록 조제하여 사용하였다.

피라졸론(pyrazolone)시약은 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(TOKYO KASEI, 특급) 2.5g와 bis-1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(WAKO, 특급) 0.2g 그리고 염화나트륨(NaCl) 97.3g을 함께 충분히 섞어서 분말시약으로 조제하였다.

니코틴(nicotine) 1차 표준용액(stock standard solution)은 이타르타르산 니코틴(nicotine bi-(+) tartrate, $C_{10}H_{14}N_2 \cdot 2 C_4H_6O_6 \cdot 2 H_2O$, TOKYO KASEI, 특급) 313.7mg를 증류수 100ml에 용해시켜 정확하게 조제하고 실제 조작에 사용한 2차 표준용액(working standard solution)은 이 1차 표준용액을 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml를 정확하게 취하여 각각 100ml로 희석하였다. 2차 표준용액은 니코틴으로서 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml에 상당한다.

2. 조 직

일당배 시료 0.1g를 정확히 취하여 100ml 눈금 플라스크에 넣고 증류수로 눈금까지 조정하고, 진탕기(shaking machine)로 20분간 진탕하여 니코틴을 추출한 다음 거름종이로 거른다.

거른액 1ml와 대조액으로 증류수 1ml를 각각 시험관에 취하고 시안화칼륨용액 1ml와 클로라민 T 시약 1ml씩을 넣는다. 다음에 인산염 완충용액 7ml를 가하고 2분간 흔들어 주어 잘 섞는다.

피라졸론 시약을 100mg씩 각 시험관에 가하여 충분히 반응시킨 다음 50분간 방치한다. 흡수분광도장치(spectrophotometer) Carry 17D를 사용하여 파장 520nm에서 흡광도를 측정하여 시료 용액의 흡광도를 대조액의 흡광도로서 보정한다.

니코틴 표준액을 취하여 같은 조작을 한 다음 흡광도를 측정하고, 이 흡광도의 값과 표준액중의 니

코틴의 농도로서 검량선(calibration curve)을 작성하고 위 조작으로 보정한 시료용액중의 니코틴값을 검량선을 기준으로 계산하여 구한다.

$$\text{시료중니코틴(\%)} = \frac{\text{검량선에서 구한 니코틴}(\mu\text{g}) \times 1000}{\text{시료의 무게}(\text{mg})} \times 100$$

결과 및 고찰

1. 흡수극대 파장

상온 상압에서 안정한 시안화칼륨은 클로라민 T와 반응, 수용액중에서 시안화칼로르(cyanogen chloride)를 생성하여 같은 용액중에 존재하는 니코틴의 피리딘핵과 반응하여 피리딘(pyridine) 핵이 개환되어서 결국 글루타론 알데히드(glutacon aldehyde)를 생성한다(2). 이렇게하여 생성된 알데히드 화합물은 두 분자의 피라졸론(pyrazolone)과 핑크빛의 염료 물질을 생성한다.

실제 니코틴의 최종농도가 3 μg 되도록 조작하고 위의 반응제에 따라 발색시킨 다음 가시부에서 흡수분광도를 측정하면 그림 1 과 같다.

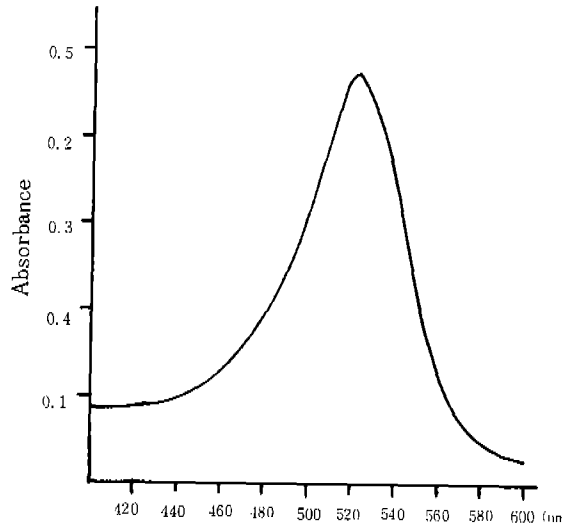


Fig. 1. Absorption spectrum of nicotine-pyrazolone complex.

그림 1 에서 나타난 바와 같이 흡수극대파장은 520 nm였으며, 흡광도의 강도가 대단히 민감하였다.

2. pH의 영향

수용액중 니코틴-피리졸론 복합체의 pH에 따른 영향을 보기 위하여 pH값을 달리하면서 최대흡수분광도를 나타내는 전개시간(분)과 색상의 안정도를 조사한 결과 표1과 같다.

Table 1. pH effect on development and stability of maximum absorbance

pH	Development time for maximum absorbance (min)	Stability of color (min)
6.0	10	10
6.5	23	15
7.0	35	20
7.5	50	30
8.0	60	30
8.5	70	30
9.0	—	—

최대흡수분광도를 나타내는 전개시간은 흡수극대파장인 520nm에서 강도가 최대로 될 때까지의 시간으로 표시한 것이며, 안정도는 최대강도를 지속하는 시간으로 표시하였다. 이 때의 최대흡수분광도는 같은 농도의 니코틴으로 조작용을 하였기 때문에 같은 값을 가진다.

표1에서 보는 바와 같이 pH 6 이하에서는 전개시간이 짧을 뿐만 아니라 최대강도의 유지시간도 짧았으며 pH 9 이상에서는 발색현상이 나타나지 않았다. 이러한 현상을 보면, 색상의 안정도가 가장 높을 때에는 전개시간이 대체로 길었지만 pH 조건은 pH 7.0—8.5로 나타났다.

다른 조건을 검토할 때에 pH의 조건은 pH 7.5—8.5로 하고 전개시간을 50분 이상으로 최적조건을 유지시키면서 실험하였다.

3. 클로라민 T의 적정량

피리딘핵의 개환제로 작용을 하는 시안화클로르는 시안화칼륨과 클로라민 T의 반응으로 생성된다.

클로라민 T의 사용량은 시안화클로르의 생성량과 깊은 관계에 있으므로 니코틴의 피리딘핵 개환과 관련성이 크며 이의 사용량이 적을 때는 분석결과 얻어지는 니코틴의 값은(—)의 오차를 가질 것이 짐작된다.

그러나 클로라민 T의 과량사용은 시료용액중에 유리 시안화클로르의 양을 증대시키는 결과가 되며, 또

시료용액을 표백시킨다(2). 따라서, 클로라민 T의 적정량을 조사하기 위하여 이의 사용량을 달리하면서 흡광도를 측정된 결과는 그림 2와 같다.

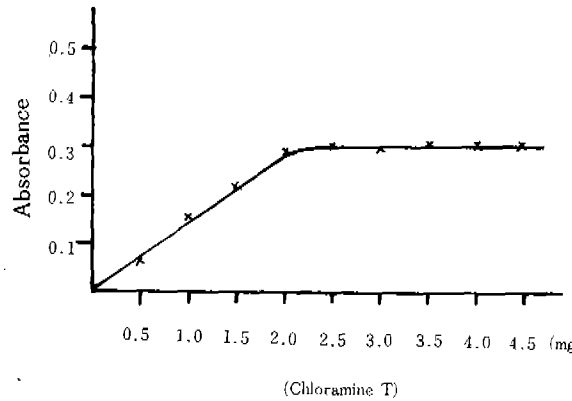


Fig. 2. Absorbance change according to chloramine T amount at 520nm. (nicotine 2 μ g/ml soln.)

이때 시료용액중의 니코틴의 최종농도는 2 μ g 이었다. 그림 2에서 나타난 바와 같이 클로라민 T 2mg 이하에서는 예상했던 바와 같이 니코틴 2 μ g에 상당하는 흡광도 0.3에 이르지 못하고 클로라민 T의 사용량을 2mg까지 증가시킴에 따라 니코틴 2 μ g의 흡광도에 접근하며 비례성을 가졌다. 그러나 2mg 이상에서 4.5mg까지의 흡광도는 0.3으로 대단히 안정하였다.

니코틴의 함량에 따라 적정한 클로라민 T의 양은 달라지겠지만 니코틴 2 μ g일 때 클로라민 T의 적정량은 3mg였다.

4. 온 도

반응이 진행되는 과정이 반응계내의 온도에 영향을 받을 것으로 예상되어 이러한 정도를 보고자 위에서 검토한 최적조건에서 다만 반응온도만을 변화시키면서 흡수분광도를 측정된 결과는 표2와 같다.

Table 2. Relation between solution temperature and absorbance at 520nm.

Temp. (°C)	10	15	20	25	30
Abs.	0.192	0.240	0.280	0.302	0.304

시료용액의 온도가 10°C에서는 니코틴 약 2 μg에 상당하는 흡광도의 값을 보여서 발색시약과의 반응이 매우 늦게 일어나고 있음을 알 수 있었으나, 25°C 이상에는 흡광도 값은 안정성을 가졌다. 따라서 분석값이 재현성을 가지도록 하기 위하여는 시료용액의 온도를 25°C 이상으로 유지해야 함을 알 수 있었다.

5. 검량선

니코틴 1 μg ~ 5 μg까지를 각각 취하고 검토한 최적 조건으로 검량선을 작성한 결과는 그림 3에서와 같이 비례성을 잘 유지하였다.

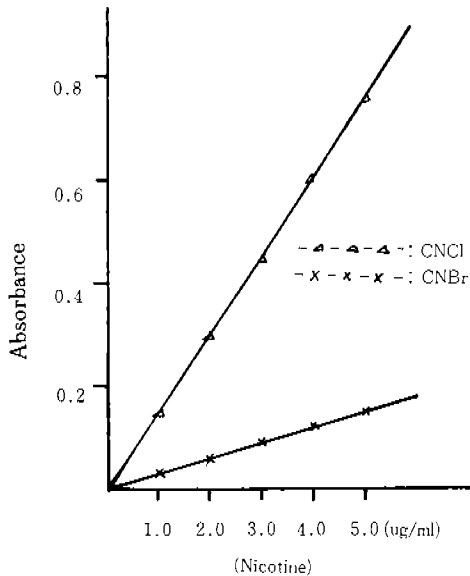


Fig. 3. Calibration curve at 520 nm.

그림 3 중 한 직선은 같은농도의 니코틴을 시안화브롬(cyanogen bromide)으로 피리딘핵을 개환시키고 피라졸론을 사용하여 발색시킨 것이다.

이 두 검량선에서 보는바와 같이 시안화브롬을 사용했을 때의 니코틴 5 μg의 흡광도는 시안화칼륨과 클로라민T를 개환제로 사용했을 때의 약 1 μg의 흡광도 값에 해당된다. 본 연구에서 검토한 방법이 시안화브롬을 사용한 종래의 방법에 비하여 약 5배의 흡광도를 가진다는 것을 쉽게 알 수 있는데, 이는 종래의 방법에 비하여 1 μg이하의 미량으로 존재하는 니코틴량도 재현성이 높게 분석할 수 있음을 보여주고 있다.

6. 담배의 화학성분이 니코틴의 분석값에 미치는 영향

니코틴과 피라졸론이 반응할 때 담배중의 다른 성분이 분석값에 미치는 영향을 보기 위하여 니코틴 일정량을 첨가하여 첨가된 니코틴의 분석값을 구하였다. 담배시료중 니코틴의 최종농도 범위가 5 μg이하가 되어야 하므로 담배추출액의 분취용액에 니코틴 표준물질을 첨가하였으며, 회수율(recovery)은 같은 실험을 12회 되풀이 하여 평균한 값을 표 3에 표시하였다.

Table 3. Recovery of nicotine

Tobacco sample extract(ml)	Nicotine added(μg)	Nicotine found(μg)	Recovery (%)
1	0	2	
1	0.5	2.49	98.2
1	1.0	2.99	99.2
1	1.5	3.50	100.0
1	2.0	4.00	100.0
1	2.5	4.50	100.0

표 3에서 보면 니코틴 0.5 μg, 1.0 μg를 첨가했을 때 회수율이 98~99% 였으나 1.5 μg 이상에서는 회수율이 100%로서 담배성분중 다른 성분이 니코틴의 분석에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

7. Griffith 방법과의 비교

CORESTA의 표준방법으로 채택하고 있는 Griffith 방법과 이 방법과를 비교하기 위하여 실제 황색종 잎담배와 burley 잎담배 시료를 사용한 분석결과는 표 4와 같다.

Table. 4. Comparison of the proposed method with the Griffith in nicotine analysis.

Sample		Griffith method	Proposed method	Relative error (%)
Flue-cured	1	5.77	5.79	0.3
"	2	3.20	3.10	-3.1
"	3	2.98	2.98	0
"	4	3.10	2.99	-3.5
"	5	2.20	2.17	-1.3
"	6	1.50	1.55	3.3
Burley	1	6.15	6.00	-2.5
"	2	5.52	5.40	-2.2
"	3	5.75	5.67	-1.4
"	4	3.24	3.32	2.5
"	5	4.03	3.89	3.5
"	6	0.88	0.85	-3.4

Griffith방법으로 얻은 분석값에 비하면 상대오차 $\pm 5\%$ 범위내로서 이 방법은 재현성이 높은 것을 알 수 있다.

결 론

니코틴의 피리딘 고리룰 시안화칼로르를 사용하여 개 환시키고 피라졸론으로 발색시켜 흡수극대파장

520nm에서 니코틴을 정량하는 방법을 개발하였다.

흡수분광도의 값은 pH 7.5에서 30분간 안정하였으며 니코틴의 농도 $1 \mu\text{g/ml}$ 로부터 $5 \mu\text{g/ml}$ 까지는 Lambert-Beer의 법칙을 잘따라 주었다.

일담배에 대한 이 방법의 분석결과는 Griffith방법과 상대오차 5% 범위내에서 두 값이 일치하였다.

인 용 문 헌

1. Collins, P.E., N.M. Sarji, and J.F. Williams, *Tob. Sci.* 13 : 79-81 (1969).
2. Epstein, J. *Anal. Chem.* 19 : 272-274 (1947).
3. Fuentes, J. D. and E. Casassas, *Anal. Chem. Acta.* 44 : 462-465 (1969).
4. Griffith, R. B. *Tob. Sci.* 1 : 130-137 (1957).
5. Harvey, W. R., P. G. Baker, and B.M. Handy, *Tob. Sci.* 15 : 29-34 (1971).
7. Kim, S. I. and C. H. Kim, *한국연초학회지* 2 (2) : 14-19 (1980).
8. Robert, H. and P. C. Markunas, *Anal. Chem.* 27 : 1650 (1955)
9. Willits, C. O., L. Margaret, J. A. Swain, and B. A. Brice, *Anal. Chem.* 22 : 430-433 (1950).
10. 安松節郎. 秦野たばこ試験場研究報63 : 75 (1969).