

SPME-GC-MS를 이용한 담배와 관련된 향료의 분석

박 교 범 · 이 석 근*

한국화학연구소 분석실
(2001. 1. 18 접수)

Analysis of Flavor-related Compounds from Tobacco using SPME-GC-MS

Gyo-Beom Park and Sueg-Geun Lee*

Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yusung, Taejon 305-600, Korea

(Received January 18, 2001)

요약: 담배에 포함된 향료 성분을 headspace solid phase microextraction (SPME)를 이용하여 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)의 selected ion monitoring (SIM)방법으로 분석하였다. 본 연구에서 사용한 담배향과 관련된 성분은 estragole, pulegone, trans-anethole, safrole, piperonal, eugenol, methyleugenol, coumarin, trans-isoeugenol, trans-methylisoeugenol 및 myristicin 등 11종이며 분석결과 모든 담배에서 한가지 또는 그 이상의 담배향 성분을 0.001-1.3 µg/g 검출할 수 있었으며 회수율은 89.1-102.9%로 나타났고 상대표준편차는 2.6-25.2%를 얻었다.

Abstract: The flavor-related compounds contained in tobacco were analyzed by selected ion monitoring (SIM) method using headspace SPME gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Flavor-related compounds were estragole, pulegone, trans-anethole, safrole, piperonal, eugenol, methyleugenol, coumarin, trans-isoeugenol, trans-methyleugenol and myristicin. More than one of the flavor-related compounds were detected in the range of 0.001-1.3 µg/g from all brands of tobacco studied. The recovery was ranged from 89.1 to 102.9% and relative standard deviation was ranged from 2.6 to 25.2%.

Key words: tobacco analysis, flavor, SPME, GC-MS

1. 서 론

담배연기 중에는 대략 밝혀진 화합물만 하여도 4,000여 종이나 된다.¹ 특히 담배에는 독특한 맛과 향을 나타내기 위하여 첨가제로 향료성분²을 사용한다. 담배에 관련된 향은 자연적인 것과 합성한 것이 있으며 담배의 잎을 건조시키거나 숙성되는 조건에 따라서도 많은 차이가 난다. 본 연구에서는 담배의 향을 나타

내는 많은 물질이 있으나 그 중에서도 주로 향료로 사용되고 유해한 물질로 알려져 있는 11종의 향료성분을 선택하였다. 이들은 trans-anethole,³ methyleugenol,⁴ estragole,⁵ safrole,⁵ eugenol⁶ 등을 포함한 alkenyl benzene류 등으로 발암성 물질로 알려져 있으며 특히 eugenol은 폐에 부종⁷을 일으키고 myristicin은 환각성^{8,9}이 있으며 piperonal¹⁴은 우울증을 유발 그리고 pulegone과 coumarin은 간장에 손상¹⁰을 준다고 알려져 있다. 지금까지는 이러한 담배향을 분석하기 위한 방법으로 수증기 증류법¹¹과 용매 추출법¹²이 사용되어 왔다. 그러나 이런 방법은 시료의 양이 많이 필요할 뿐 아니라 추출방법이 복잡하고 시간이 많이 소요

* Corresponding author
Phone : +82-(0)42-860-7710 Fax : +82-(0)42-860-7704
E-mail : leesg@pado.krict.re.kr

되며 용매를 많이 사용해야하는 단점이 있다. 용매의 사용 없이 간단하고 쉽게 추출할 수 있는 방법으로 알려진 solid phase microextraction (SPME)¹³ 방법은 휘발성 시료의 분석¹⁴에도 아주 좋으며 시료를 추출시 fiber에 흡착됨과 동시에 농축이 이루어짐으로써 사용이 간편하고 감도가 높다는 장점이 있다. SPME를 이용한 전처리 기술은 물과 같은 수용액¹⁵이나 음료¹⁶, 향료¹⁷, 식품¹⁸ 등의 다양한 매질로부터 향료성분을 쉽게 추출하는데 매우 유용하다. 따라서 본 연구에서는 SPME의 방법으로 국내산 담배 5종과 외제담배 3종을 선택하여 담배에 함유된 향료와 관련된 성분을 분석¹⁹하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 표준물질은 estragole, pulegone, trans-anethole, safrole, piperonal, eugenol, coumarin, trans-isoeugenol은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서 methyleuge-nol은 Wako사 (Japan), trans-methylisoeugenol은 Merck사에서 myristicin은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 내부표준 물질인 3',4'-methylenedioxycacetophenone (MDA)은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였으며 potassium chloride는 Junsei Chemical사 (Tokyo, Japan) 제품이다. 표준물질을 회석하는데 사용한 용매는 Berdick & Jackson사 (Muskegon, MI, USA)의 분석용 에탄올이었다.

기기는 Hewlett-packard HP5890 Series II gas chromatograph/HP 5971 A mass selective detector를 사용하였으며 MS의 이온화 방식은 전자이온화(electron impact)법을 사용하고 이온화 에너지는 70eV로 하였다. 분석 컬럼은 HP-5MS cross linked 5% phenyl methylsilicone fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness)을 사용하였다. 컬럼은 이온원에 직접 연결하고 운반가스는 헬륨(99.99%)을 사용하여 운반속도를 1.0 mL/min의 유속으로 흘려주었으며 transfer line 및 ion source온도는 각각 280°C와 180°C로 하였다. 컬럼의 온도는 60°C에서 1분간 유지한 다음 20°C/min로 승온하여 110°C까지 올리고 다시 4°C/min로 150°C까지 승온한 후 10°C/min로 290°C까지 올리고 5분간 머물게 하였다. 시

Table 1. Retention time, quantitation and confirmation ions

Compounds	Retention time (min)	Characteristic ions (m/z)		
		Quantitation ion	Confirmation ion	
Estragole	7.57	148	147	121
Pulegone	8.41	152	81	109
Anethole	9.33	148	147	133
Safrole	9.43	162	161	131
Piperonal	10.46	149	150	121
Eugenol	10.98	164	131	149
Methyleugenol	12.07	178	147	163
MDA ^a (ISTD) ^b	12.94	149	164	121
Coumarin	13.07	146	90	118
Isoeugenol	13.30	164	149	131
Methylisoeugenol	14.47	178	163	107
Myristicin	15.10	192	165	161

^a 3',4'-methylenedioxycacetophenone

^b Internal standard

로 주입방법은 비분할(splitless)주입 방법을 사용하였고 주입구의 온도는 230°C이고 injection port liner는 0.7 mm (i.d.)를 사용하여 특정질량을 가지는 이온만을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring (SIM)방법을 사용하여 분석하였다. SIM검출 방법에 사용된 각 화합물의 특성이은 Table 1에 나타내었다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 표준용액의 조제

각 화합물의 표준용액의 조제는 위에서 구입한 순수한 표준품 즉 estragole, pulegone, trans-anethole, safrole, piperonal, eugenol, methyleugenol, coumarin, trans-isoeugenol, trans-methylisoeugenol 및 myristicin 등을 0.1 mg까지 무게로 에탄올을 사용하여 2,000-5,000 μg/mL의 표준원액이 되도록 만들었다. 내부 표준액은 3',4'-methylenedioxycacetophenone (MDA)을 2,080 μg/mL의 표준원액을 만들어 다시 에탄올로 회석하여 20 μg/mL의 표준액으로 제조하여 사용하였다. 3 M-KCl 용액은 중류수를 사용하여 만들었다.

2.2.2. 검정곡선의 작성

검정곡선을 작성하기 위한 표준 검정용액은 다음과 같이 만들어 사용하였다. 이미 만든 표준용액을 0.1,

0.5, 2.0, 20, 50, 100 µg/mL의 농도 범위로 희석하여 만들고 각각의 14 mL vial에 3 M-KCl 용액 7 mL을 넣고 위에서 만든 0.1-100 µg/mL의 표준용액을 각각 1 µL씩 첨가하고 내부표준용액으로 20 µg/mL의 농도의 용액을 2 µL씩 spike하여 뚜껑을 닫은 후 밀봉하였다.

검정곡선은 각 검정용액의 내부 표준물에 대한 각 화합물의 피크 면적비에 대한 농도비의 관계를 표시하는 표준검정곡선을 작성하였다. 즉, 각 화합물의 면적비 (A_i/A_{is}) 와 농도비 (C_i/C_{is})의 관계를 단순 선형회귀곡선으로 작성하였다.

2.2.3. 시료의 조제

시료는 시중에서 유통되는 담배를 구입하여 필터와 종이부분을 제거한 후 무게를 달아 0.6-0.7 g 정도 되는 양을 14 mL vial에 넣고 3 M-KCl 용액 7 mL를 넣은 후 내부표준용액 2 µL를 spike한 후 뚜껑을 막아 밀봉한다.

2.2.4. SPME의 추출

본 실험에 사용된 SPME의 장치는 manual holder (supelco. Cat. No. 5-7330)이고 fiber는 65 µm Carbo-wax-divinylbenzene (supelco. Cat. No. 5-7312)를 사용하였으며 사용하기 전 SPME의 fiber는 250°C에서 30 분간 pre-conditioning 후 사용하였다.

앞에서 만든 표준용액과 시료를 넣은 vial은 oil bath에서 95°C로 10분간 가열한 후 시료채취는 SPME fiber를 이용하여 시료를 넣은 뚜껑의 septum

을 뚫고 넣어 headspace 공간 부분에서 5분간 노출시켜 분석물을 fiber에 흡착시킨 후 시료가 흡착된 fiber를 GC의 주입구 안으로 주입하여 5분간 탈착시켰다

2.2.5. 회수율 측정

회수율을 측정하기 위하여 14 mL의 vial에 3 M-KCl 용액을 7 mL씩 넣은 후 표준용액 50 µg/mL 농도의 용액 1 µL와 내부 표준액 2 µL를 넣어 spike한 후 뚜껑을 닫고 밀봉한다 이렇게 만든 용액은 앞에서와 같은 방법으로 추출하여 크로마토그램의 피크를 측정한 후 면적을 구하여 앞에서 작성한 표준검정곡선으로부터 농도를 구하여 회수율을 계산하였다. 위의 과정을 5번을 반복하여 회수율과 표준편차를 계산하여 정확도와 정밀도를 측정하였으며 검출한계 (limits of detection, LOD)는 S/N비가 3일 때로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

각 표준물질은 농도 별로 혼합용액을 만들어 분석한 결과로 11종의 각각에 대한 검정곡선을 얻었다. 검정곡선을 작성하기 위해 만든 용액 중 piperonal, eugenol, coumarin, trans-isoeugenol 등은 다른 물질에 비해 감도가 낮아서 더 높은 농도 범위로 표준용액을 제조하여 사용하였다. 이에 대한 농도 범위와 상관계 수는 Table 2에 나타내었고 R^2 값이 모두 0.9821 이상

Table 2. Results of simple liner regression for the standard calibration

Compounds	Concentration range (µg)	Regression eqn.	Correlation coefficient (r)
Estragole	0.00012-0.1225	$y=101.09x + 0.4404$	0.9838
Pulegone	0.00027-0.2625	$y=52.853x + 0.2119$	0.9974
Anethole	0.0001-0.1153	$y=215.51x + 0.8052$	0.9901
Safrole	0.00014-0.1392	$y=175.29x + 0.6813$	0.9927
Piperonal	0.00207-2.0708	$y=19.638x + 0.1702$	0.9998
Eugenol	0.00128-1.1284	$y=34.525x + 0.3783$	0.9990
Methyleugenol	0.00029-0.2851	$y=125.70x + 0.6261$	0.9974
MDA ^a (ISTD) ^b	0.02087 (spiked)		
Coumarin	0.02891-5.782	$y=2.6583x - 0.1746$	0.9959
Isoeugenol	0.05534-2.7672	$y=54.296x - 6.9065$	0.9977
Methylisoeugenol	0.00029-0.2999	$y=108.62x + 0.6385$	0.9960
Myristicin	0.00026-0.2548	$y=135.27x + 0.4554$	0.9986

^a 3',4'-methylenedioxyacetophenone

^b Internal standard

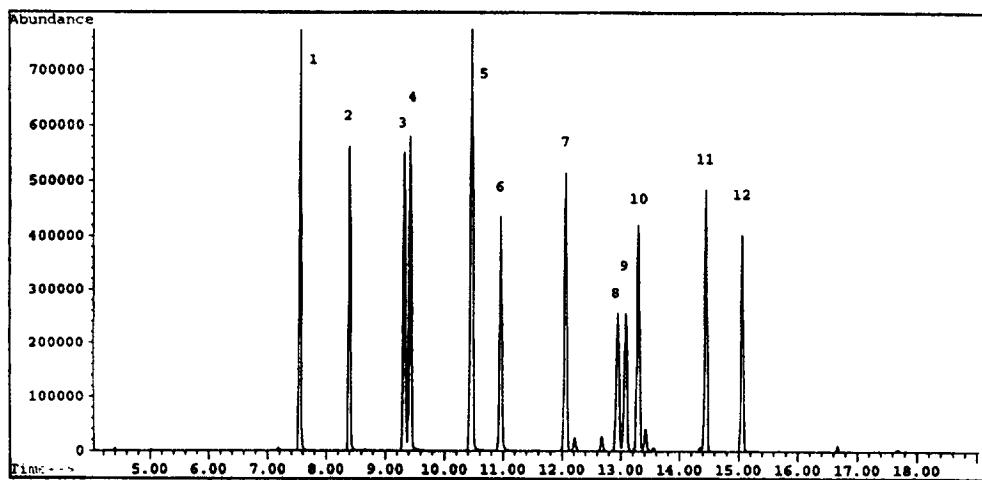


Fig. 1. GC/MS-SIM total ion chromatogram of standard samples (1. estragole, 2. pulegone, 3. anethole, 4. safrole, 5. piperonal, 6. eugenol, 7. methyleugenol, 8. MDA, 9. coumarin, 10. isoeugenol, 11. methylisoeugenol, 12. myristicin).

을 나타냄에 따라 직선성이 매우 좋아 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

3.2. SPME 추출

표준물질 및 실제 시료의 분석은 각각의 화합물에 대한 특성이온만을 선택하는 selected ion monitoring (SIM)방법에 의해 분석하였고 이때 사용된 표준물질의 이온크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다. 이온크로마토그램에서 보는 바와 같이 대부분의 표준물질들은 본 연구에서 정립한 분석조건에서 비교적 분리가 잘 되었다. piperonal (264°C), eugenol (254°C), coumarin (298°C), trans-isoeugenol (266°C) 등의 피크는 앞의 검정곡선 작성 시에서 언급하였듯이 다른 물질보다도 감도가 낮은 편인데 이는 아마도 끓는점이 다른 물질에 비하여 비교적 높기 때문에 다른 물질보다 휘발되지 못하여 headspace상에서 fiber에 흡착되는 양이 적어서 나타나는 현상으로 사료된다.

3.3. 회수율 측정

회수율 측정결과는 Table 3에 나타냈으며 표에서 보는 바와 같이 회수율은 89.1-102.9% 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD)는 estragole이 25.2%로 가장 높으며 trans-anethole과 trans-isoeugenol이 각각 19.1%와 19.5%를, safrole은 17.7%를 그리고 그 외의 대부분은 9.1% 이하로 양호함을 알 수 있었다.

Table 3. Analytical results of spiked samples by GC/MS-SIM

Compounds	Spiked amount (μg)	Mean ^c \pm S.D. (μg)	Recovery (%)	RSD (%)
Estragole	0.0613	0.0598 \pm 0.0151	97.6	25.2
Pulegone	0.1328	0.1303 \pm 0.0076	98.1	5.8
Anethole	0.0577	0.0514 \pm 0.0098	89.1	19.1
Safrole	0.0696	0.0633 \pm 0.0110	91.0	17.8
Piperonal	1.0354	1.0654 \pm 0.0325	102.9	3.1
Eugenol	0.5642	0.5749 \pm 0.0149	101.9	2.6
Methyleugenol	0.1426	0.1421 \pm 0.0074	99.7	5.2
Coumarin	2.8910	2.6136 \pm 0.3233	90.4	12.4
Isoeugenol	1.3836	1.4762 \pm 0.2878	106.7	19.5
Methylisoeugenol	0.1499	0.1444 \pm 0.0132	96.3	9.1
Myristicin	0.1274	0.1226 \pm 0.0086	96.2	7.0

^c Mean value from 5 measurements

본 연구에서 사용한 향료성분들의 끓는점이 $216\text{-}298^{\circ}\text{C}$ 사이로 대단히 높음으로 회수율이 낮을 것으로 예상되었다. 그러나 추출시에 3 M-KCl 염을 가하여 분석물의 용해도를 낮추고 시료의 온도를 높여 시료로부터 분석물의 휘발이 잘 되도록 하여 추출한 결과 headspace SPME 추출 방법이 재현성이 있었으며 정밀도와 정확도가 신뢰할 수 있을 만큼 좋다는 것을 알 수 있었다.

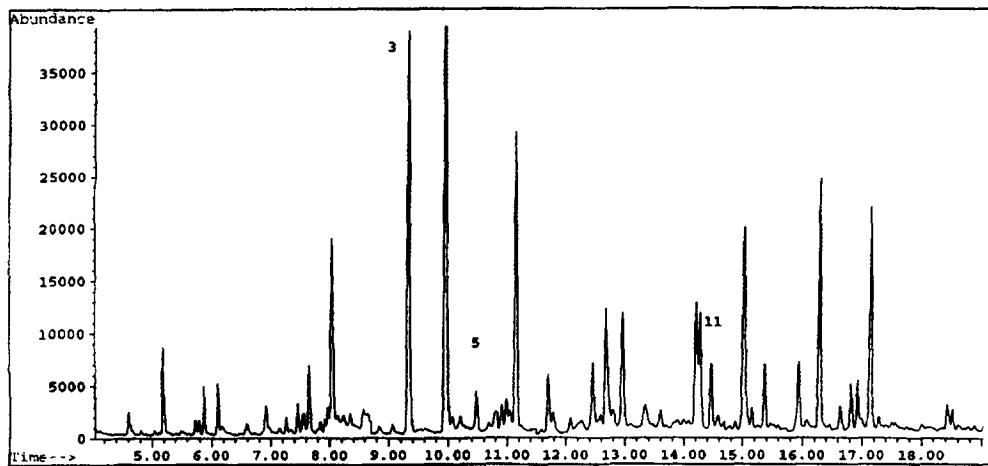


Fig. 2. GC/MS-SIM total ion chromatogram of brand D sample (3. anethole, 5. piperonal, 11. methylisoeugenol).

Table 4. Concentration (ng/g) of flavor compounds in tobacco

Compounds	A	B	C	D	E	F	G	H
Estragole			2.5					
Pulegone								
Anethole	1.2	4.9	82.0	2.4	1.1	26.0		62.3
Safrole								
Piperonal	41.9		25.3	42.5	51.8	1298.6	960.9	63.9
Eugenol								
Methyleugenol	1.5							
Coumarin								
Isoeugenol								
Methylisoeugenol				5.8		11.7		
Myristicin							15.5	

3.4. 실제시료의 분석

시중에 판매되는 국산담배 5종과 외국산 담배 3종을 구입하여 분석한 대표적인 이온크로마토그램은 Fig. 2에 보여 주었고 Table 4에 결과를 나타냈다. 모든 담배에서 한가지 또는 그 이상의 향료성분이 검출되었다. trans-anethole이나 piperonal성분은 대부분의 담배에서 검출되므로 담배의 향료로써 가장 많이 사용되고 있음을 알 수 있었다. 모든 담배의 종류에서 검출된 결과에서 보듯이 대부분 1가지 이상 3가지 까지의 담배향이 함유되어 있었다. Table 4에서 보는 바와 같이 pulegone과 safrole, eugenol, coumarin 및 trans-isoeugenol의 성분은 모든 상품의 담배에서 검

출되지 않았으며 특이한 사항은 piperonal성분의 함량이 다른 성분에 비하여 매우 높은 농도로 검출되었다. 특히 우리나라 담배와 외국 담배의 두드러진 차이는 piperonal성분이 외국 담배에 많이 함유되어 있다는 것이다.

4. 결 론

담배향 분석에 사용된 headspace SPME의 추출결과에서 평균 회수율이 97.3%로 아주 높게 나타났으며 평균 상대표준편차는 11.5%이고 검출한계는 0.003-8.3 ng/g를 얻었다. 직선성도 매우 좋아 headspace SPME

추출법이 담배의 향료성분을 분석하는데 기존방법과 달리 간편하고 쉽게 분석할 수 있어 앞으로 담배와 관련된 향료의 분석에 많이 사용되리라 생각된다.

참고문헌

1. R. N. Penn and V. Mane Files, *Perfumer Flavorist*, **22**, 21-28 (1997).
2. Staff Repot. *Tobacco Rep.*, **121**, 32-39 (1994).
3. R. Truhaut, B. LeBourhis, M. Attia and J. Caldwell, *Food Chem. Toxic.*, **27**, 11-19 (1999).
4. I. Hirono (Ed.), *Bioactiv Molecules*, Elsevier, New York, **2**(7), 139-159 (1987).
5. Leleng P. To, T. P. Hunt and M. E. Andersen, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **28**, 647-654 (1982).
6. P. T. Leleng, T. P. Hunt and M. E. Andersen, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **28**, 654-657 (1982).
7. J. W. McDonald and J. E. Heffner, *Am. Rev. Resp. Disease*, **143**, 806-809 (1991).
8. A. T. Weil, *Econ. Botany*, **19**, 194-217 (1965).
9. U. Braun and D. A. Kalbhen, *Pharmacology*, **9**, 312-316 (1973).
10. W. P. Gordon, A. J. Forte, R. J. McMurtry, J. Gal and S. D. Nelson, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **65**, 413-424 (1982).
11. E. J. Lavoie, A. Shigenatsu, P. L. Tucciarone, J. D. Adams and D. Hoffmann, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 876-879 (1985).
12. T. Fujimori, R. Kasuga, H. Kaneko and M. Noguchi, Neutral volatile components of burley tobacco, *Beitr. Tobakforsch.*, **9**, 317-325 (1978).
13. Z. Zhang and J. Pawliszyn, *J. Anal. Chem.*, **65**, 1843-1852 (1993).
14. 박교범, 이석근, *분석과학*, **13**(3), 277-281 (2000).
15. S. W. Lloyd, J. M. Lea, P. V. Zimba and C. C. grim, *Water Res.*, **32**, 2140-2146 (1998).
16. X. Yang and T. Peppard, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1925-1930 (1994).
17. K. G. Miller, C. F. Poole and T. M. Pawlowski, *Chromatographia*, **42**, 639-646 (1996).
18. K. D. Jou and W.J. Harper, *Milchwissenschaft*, **53**, 259-263 (1998).
19. S. B. Stanfill and David L. Ashley, *J. Chromatogr. A.*, **858**, 79-89 (1999).