

## 담배 중 pH와 Nicotine 함량에 의한 Free nicotine 측정

이정민<sup>\*</sup> · 장기철 · 황건중 · 김용하 · 이문수

KT&G 중앙연구원  
(2005년 11월 11일 접수)

### Calculation of Free Nicotine by Determination of pH and Nicotine in Tobacco

Jeong-Min Lee<sup>\*</sup>, Gi-Chul Jang, Keon-Joong Hwang, Yong-Ha Kim and Moon-Soo Rhee

KT&G Central Research Institute

(Received November 11, 2005)

**ABSTRACT** : Characterizing nicotine delivery from tobacco products is important in the understanding of their addictive potential. Most previous studies report total nicotine and have not differentiated between nicotine in its protonated or free-base form. The amount of free nicotine calculated by determining pH and nicotine contents. The pH and nicotine contents in smokeless tobacco product, tobacco products and tobacco leaves were analyzed by Health Canada-Official Method T-310 and CORESTA Recommended Method N°62. The content of free nicotine was calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation and the value of  $\alpha_0$ (the fraction of nicotine that is in the free base form) by using a pKa value of 8.02 for nicotine. The percentage of free nicotine then was calculated by dividing the free nicotine content by total nicotine content. The pH value and percentage of free nicotine ranged from 5.01 to 5.45 and 0.10% to 0.27% in cut tobacco and 5.10 to 7.10 and 0.12% to 10.73% in tobacco leaves, respectively.

**Key words** : free nicotine, nicotine, pH, Henderson-Hasselbalch equation

최근 우리나라도 FCTC 협약을 비준함에 따라 담배성분 규제가 강화될 것이라 예상되고 있다. 향후 규제 성분으로 담배 및 연기 중의 free nicotine 함량도 포함될 것으로 예상된다(WHO, 2003; WHO 2004). 담배 및 연기 중의 nicotine은 protonated form과 free base form(unprotonated)으로 존재하는데 현재 분석법으로 정립되어져 있는 gas chromatography(GC)법은 이 두 가지 형태의

nicotine을 구분하지 않고 total nicotine으로써 정량하는 방법(CORESTA, 2005)이기 때문에 free nicotine을 기존의 GC법만으로 정성 및 정량 분석하기에는 용이하지 않은 단점이 있다.

따라서 현재 이와 같은 담배 및 연기 중 free nicotine에 관한 연구는 이의 단점을 극복하기 위하여 재현성이 보장되는 새로운 분석법의 확립에 관한 연구가 주를 이루고 있다.

\*연락처 : 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

Free nicotine 정량에 관한 연구를 살펴보면, Whidby 등(1976)은 연기 중 응축물 내의 free nicotine 함량의 동위 원소 측정을 위하여 화학적 이동을 이용한 NMR 분석을 수행한 바 있다. Chromatography에 의한 free nicotine의 분석은 Pankow 등의 연구 등에 의해 가능하게 되었다. Pankow 등(1997)은 암모니아 가스에 의해 연중 nicotine이 free base화 되어지는 것을 확인하였는데, nicotine-d3를 추적자로 사용하였고, naphthalene-d8을 내부표준물질로 사용하여 환경담배연기(ETS) 중 free nicotine의 양을 GC/MS를 이용하여 분석을 수행한 바 있다. 또한, 일반적으로 free base form이 pH에 의존하는 원리를 이용하여 주류연의 pH와 nicotine의 함량을 측정 후 이를 이용하여 free nicotine의 양을 계산하고 이를 실제 분석값과 비교하는 연구도 수행된 바 있다(Cochran 등, 2003). Watson 등(2004)은 Pankow 등(1997)의 연구결과를 바탕으로 암모니아 가스를 이용하여 내부 표준물질을 제조한 후 SPME (Solid-Phase Microextraction)를 이용하여 주류연 중 free nicotine의 분석을 수행하기도 하였다. 이와 같이 연기 중 free nicotine의 분석에 관한 연구는 가스상 성분과 입자상 성분의 분리가 용이하기 때문에 활발하게 진행되어진 반면, 담배 중 free nicotine에 관한 연구는 담배 중 free nicotine의 추출이 용이하지 않아 기기를 이용한 분석은 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 담배 성분 중 free nicotine의 정량을 위해 nicotine 함량과 pH를 측정하고 Henderson-Hasselbalch식에 의해 free nicotine의 양을 추정하는 방법(Pankow, 2001, 2003; Morie, 1972)을 이용하여 smokeless 제품담배, Ky2R4F, 국내·외산 제품담배 및 원료엽별 free nicotine 함량을 비교분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

pH와 nicotine 함량을 측정하기 위하여 본 연구에서 사용한 잎담배 시료는 smokeless 제품담배 2종, 국내·외산 제품담배 각 8종(2005년 9월 시판 담배) 및 원료엽 (버어리중; 한국 2004년산 AB3T,

BIT, C2W, CD4TR, 미국 2004년산 B3F, 말라위 2004년산 XB, LA, CA, LB, 모잠비크 2004년산 MZ-BXB, MZ-BLA, MZ-BLB, MZ-BCA, 황색중; 한국 2004년산 AB3O, B1O, C2L, CD4L, 미국 2004년산 Leaf 1, Leaf 2, Cutter 1, LUG 1, 중국 2004년산 CKB4R, CKC4R, CK1L, CB3OR, 오리엔트중; 그리스 2003년산 Basma I/III, Kaba Koulak IV, Katerini IV, 터키 2003년산 Samsun AG, Izmir CU, 마케도니아 2003년산 Prilep AP)을 각각 일정량 취하여 분석하였다.

### pH 측정

pH 측정은 Health Canada-Official Method T-310(1999)에 준하여 3 반복 실험하였다. 시료 3 g에 증류수 30 mL를 가하고 30분 동안 교반한 후 여과하여 pH meter로 측정하였다.

### Nicotine 측정

Nicotine 측정은 CORESTA Recommended Method N°62(2005)에 준하여 3 반복 실험하였다. 시료 1 g에 20 mL의 증류수, 40 mL의 추출용액 (내부표준물질 n-heptadecane 500 µg/mL, n-hexane), 10 mL의 6 N NaOH 용액을 가하고 1 시간 동안 교반한 후 상층액을 취하여 GC로 분석하였다.

GC는 FID가 부착된 Hewlett-Packard 580 II Plus(USA)를 사용하였고, 컬럼은 DB-50(15 m × 0.53 mm i.d., 1 µm film thickness, J&W, USA), 온도 프로그램은 170°C에서 10분간 유지하였으며, injector와 detector 온도는 각각 270°C, 시료는 1 µL를 주입하였다.

Nicotine 함량은 (-)-nicotine(순도 98%, Sigma, USA) 0.1~1 mg/mL 농도로 표준용액을 조제한 후 검량선을 작성하여 정량하였다.

### Free nicotine 계산

Free nicotine은 Henderson-Hasselbalch식(1)과  $\alpha_{fb}$  구하는 식(2)(Pankow, 2001, 2003)을 이용하여 계산하였다.

$$pH = pKa - \log\left(\frac{[HA]}{[A^-]}\right) \quad (1)$$

담배 중 pH와 Nicotine 함량에 의한 Free nicotine 측정

$$\alpha_{fb} = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-pH}} \quad \alpha_{fb} = \frac{\text{free nicotine}}{\text{free nicotine} + \text{protonated nicotine}} \quad (2)$$

여기서, pH는 잎담배의 pH, pKa는 25°C에서의 nicotine의 pKa(8.02) 그리고, α<sub>fb</sub>는 전체 nicotine에 대한 free nicotine의 분율을 나타낸다.

결과 및 고찰

담배 및 연기 중에 nicotine은 세 가지 형태로 존재한다(Fig. 1). 이중 pH에 의존하는 것으로 알려진 담배 중 free base form의 nicotine 함량을 계산하기 위하여 nicotine의 함량과 pH를 측정하였다. 각 측정된 값에 따른 free nicotine의 함량을 제품 담배 및 잎담배의 종류에 따라 나타내었다.

Smokeless 제품

Smokeless 제품담배의 free nicotine 함량 및 nicotine 중 free nicotine %를 계산하여 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 제품 간 pH는 Hawken Wintergreen의 pH 5.08과 Grizzly의 pH

8.35로써 현저한 차이를 나타내었으며, 이에 따라 free nicotine 비율 또한 차이를 보였다. 즉, Hawken Wintergreen의 nicotine 중 free nicotine %는 0.11%이었으나, Grizzly의 경우에는 nicotine 중 free nicotine 함량이 68.13%로 제품 담배 및 원료엽 보다 현저하게 높은 free nicotine %를 보였는데 이는 pH를 증가시키는 염기성 물질이 일부 첨가되었기 때문인 것으로 추정된다. 결과적으로 pH 차이에 의한 free nicotine 함량 및 %의 변화를 확인할 수 있었다.

제품담배

제품담배의 free nicotine 함량 및 nicotine 중 free nicotine %를 계산하여 Table 2에 나타내었다.

제품담배의 nicotine 함량은 15.451~22.029 mg/g, pH는 5.01~5.45 범위를 나타내었다. 국산 담배의 nicotine 평균 함량은 17.519 mg/g, free nicotine 평균 함량 및 %는 0.028 mg/g(0.159%)이었으며, 외산 담배의 nicotine 평균 함량은 18.350 mg/g, free nicotine 평균 함량 및 %는 0.039 mg/g(0.207%)이었다. 국내·외산 제품담배를 비교해 볼 때, 외산 제품담배의 free nicotine 함량 및 %가 국산 제품보다 약간 높게 나타났는데, 이

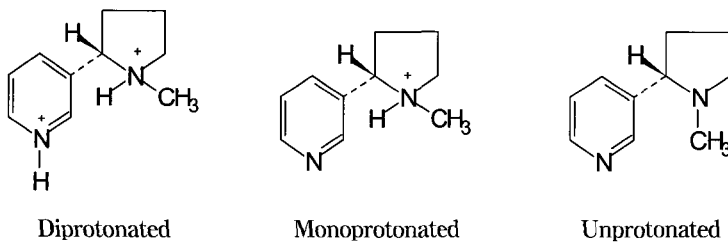


Fig. 1. Three forms of nicotine.

Table 1. Nicotine, pH and free nicotine in smokeless tobacco products

Sample	pH	Nicotine (mg/g)	Free nicotine (mg/g)	Free nicotine (%)
Hawken Wintergreen	5.08	4.601	0.005	0.11
Grizzly	8.35	10.036	6.838	68.13

Table 2. Nicotine, pH and free nicotine in tobacco products

Sample	pH	Nicotine (mg/g)	Free nicotine (mg/g)	Free nicotine (%)
One	5.44	16.501	0.043	0.26
Raison	5.30	16.288	0.031	0.19
Raison Menthol	5.20	17.172	0.026	0.15
Esse Light	5.13	15.451	0.020	0.13
Time	5.01	18.166	0.018	0.10
Time Menthol	5.15	18.344	0.025	0.13
This plus	5.18	16.199	0.023	0.14
Pine	5.23	22.029	0.036	0.16
Ky2R4F	5.51	18.646	0.057	0.31
Vogue One	5.30	18.842	0.036	0.19
Dunhill Light	5.45	18.073	0.049	0.27
Dunhill Light Menthol	5.39	16.166	0.038	0.23
L&M Mild	5.11	19.171	0.024	0.12
Marl Light	5.40	17.738	0.042	0.24
Mild Seven Light	5.38	19.651	0.045	0.23
Virginia Slim Light	5.35	18.811	0.040	0.21

는 사용된 원료엽의 특성과 배합비에 따른 결과인 것으로 판단된다.

표준담배 Ky2R4F는 pH 5.51로 다른 제품담배보다 비교적 높아 free nicotine 함량 및 % 또한 제품담배 중 가장 높은 수치를 나타내었다.

#### 원료엽

버어리종, 황색종 및 오리엔트종 원료엽의 free nicotine 함량 및 nicotine 중 free nicotine %를 계산하여 Table 3에 나타내었다.

버어리종의 경우, 국산 AB3T와 미국산 B3F는 pH가 비슷하였으며 국산의 경우 CD4T의 nicotine 함량은 다른 등급에 비해 낮은 수치를 나타내었으나 pH는 6.12로 높은 수치를 보여 AB3T 등급과 비교하여 free nicotine 함량은 2배 정도의 차이를 보였으며, free nicotine %를 비교해 보면 CD4TR 1.24%, AB3T 0.2%로써 등급간 차이를 보였다. 특

히, 말라위산 버어리종 XB에서 free nicotine이 10.73%로 가장 높은 수준을 보였고, 말라위 및 모잠비크 버어리종은 등급에 따라 현저한 free nicotine % 차이를 나타내었으며, 국산 및 미국산 버어리종에 비해 높은 free nicotine 비율을 차지하였다.

황색종의 경우, 국산 황색종의 nicotine 함량은 등급별 차이를 보였으나, pH는 거의 동일한 값을 나타내어 free nicotine %는 등급별 차이를 보이지 않았다. 또한 미국산 및 중국산 황색종의 경우에도 nicotine 및 free nicotine 함량 차이를 보였으나 nicotine 중 free nicotine의 %는 비슷한 수준이었다. 국가별로 비교해 보면, free nicotine은 국산 0.3%, 미국산 0.24%, 중국산 0.21%로 미미한 차이를 보였다.

국산 버어리종 및 황색종은 착엽 위치(상·본·중·하)에 따라 nicotine 함량은 감소하였으나, pH

담배 중 pH와 Nicotine 함량에 의한 Free nicotine 측정

Table 3. Nicotine, pH and free nicotine in tobacco leaves

Sample		pH	Nicotine (mg/g)	Free nicotine (mg/g)	Free nicotine (%)	
Burley	Korea	AB3T	5.32	21.385	0.043	0.20
		B1T	5.42	24.707	0.062	0.25
		C2W	5.79	15.085	0.088	0.59
		CD4TR	6.12	6.594	0.082	1.24
	USA	B3F	5.31	35.747	0.070	0.19
	Malawi	XB	7.10	10.382	1.114	10.73
		LA	5.97	30.224	0.267	0.88
		CA	6.69	12.485	0.558	4.47
		LB	6.04	23.961	0.248	1.04
	Mozambique	MZ-BXB	6.64	10.613	0.425	4.00
		MZ-BLA	5.95	30.058	0.254	0.84
		MZ-BLB	5.98	26.126	0.236	0.90
		MZ-BCA	6.47	12.326	0.338	2.74
Flue-Cured	Korea	AB3O	5.47	27.380	0.077	0.28
		B1O	5.50	20.971	0.063	0.30
		C2L	5.50	13.556	0.041	0.30
		CD4L	5.50	13.425	0.040	0.30
	USA	Leaf 1	5.36	23.278	0.051	0.22
		Leaf 2	5.27	27.330	0.049	0.18
		Cutter 1	5.31	19.528	0.038	0.19
		LUG 1	5.38	20.247	0.046	0.23
	China	CKB4R	5.32	40.144	0.080	0.20
		CKC4R	5.40	15.119	0.036	0.24
		CK1L	5.25	17.972	0.030	0.17
		CB3OR	5.31	29.802	0.058	0.19
	Oriental	Greece	Basma I/III	5.12	18.131	0.023
Kaba Koulak IV			5.45	6.049	0.016	0.27
Katerini IV			5.22	14.028	0.022	0.16
Turkey		Samsun AG	5.23	11.531	0.019	0.16
		Izmir CU	5.34	6.742	0.014	0.21
Macedonia		Prilep AP	5.10	14.395	0.017	0.12

는 증가하여 free nicotine % 또한 증가하였다. 착엽위치가 상엽에서 하엽으로 갈수록 pH가 증가하는 것은 Rogers 등(1976)과 Williamson 등(1981)의 결과와도 비슷한 경향인 것으로 나타났다.

오리엔트종의 경우, 그리스산 바스마, 카바쿨락,

카테리니, 터키산 삼순, 이즈미르, 마케도니아산 프리렘플 비교해 본 결과 카바쿨락에서 pH 5.45, free nicotine 0.27%로 다른 종에 비해 높게 나타났다. 그 다음 이즈미르가 pH 5.34, free nicotine 0.21%로 높은 비율을 차지하였으나, 다른

종에서는 pH 차이를 보이지 않아 free nicotine %는 거의 비슷하였다.

이상의 결과로부터 원료엽별 free nicotine % 차이는 원료엽의 pH에 따라 달라지며, 이는 pH에 영향을 주는 내용성분의 구성비와 함량 차이 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 원료엽의 pH를 증가시키는 성분들은 질소화합물, 알칼로이드 및 전휘발성염기 등이 있고, pH를 감소시키는 성분들은 유기산류, 페놀류 및 염소 등인 것으로 알려져 있다(Akehurst, 1981).

## 결 론

FCTC TobReg에 의해 규제가 예상되는 담배 내용성분 중 free nicotine의 정량을 위해 nicotine 함량과 pH를 측정하고, Henderson-Hasselbalch식에 의해 free nicotine의 양을 추정하는 방법을 이용하여 smokeless 제품담배, 국내·외산 제품담배 및 원료엽별 free nicotine 함량을 비교분석한 결과는 다음과 같았다.

Smokeless 제품담배의 경우, pH는 Hawken Wintergreen의 pH 5.08과 Grizzly의 pH 8.35로써 현저한 차이를 나타내었으며, free nicotine % 또한 각각 0.11%, 68.13%로 pH가 증가함에 따라 free nicotine %는 증가하였다.

제품담배의 경우, nicotine 함량은 15.45~22.03 mg/g, pH는 5.01~5.45 범위를 나타내었으며, 국산 담배의 nicotine 평균 함량은 17.52 mg/g, free nicotine 평균 함량 및 %는 0.028 mg/g(0.159%)이었으며, 외산 담배의 nicotine 평균 함량은 18.35 mg/g, free nicotine 평균 함량 및 %는 0.039 mg/g(0.207%)를 차지하여 외산 제품담배의 free nicotine 함량 및 %가 국산 제품보다 약간 높게 나타났다.

버어리종, 황색종 및 오리엔트종 원료엽을 분석한 결과, 국산 버어리종 및 황색종은 착엽 위치(상·본·중·하)에 따라 nicotine 함량은 감소하였으나, pH는 증가하여 free nicotine% 또한 증가하였다. 버어리종의 경우, free nicotine은 국가별, 등급별 함량 차이를 보였고, 특히 말라위 및 모잠

비크산 버어리종은 등급에 따라 현저한 free nicotine % 차이를 나타내었으며, 국산 및 미국산 버어리종에 비해 높은 free nicotine %를 차지하였다. 황색종의 경우, 국가별, 등급별로 nicotine 함량 차이를 보였으나 pH는 5.25~5.50 범위로 약간의 차이를 보여 nicotine 중 free nicotine %는 비슷한 수준이었다. 오리엔트종의 경우, 카바콜락(pH 5.45, free nicotine 0.27%)을 제외한 다른 종에서는 pH 차이가 크지 않아 free nicotine %는 비슷한 수준이었다.

## 참 고 문 헌

- Akehurst B. C. (1981) Tobacco. p. 589, 649. 2nd ed., Longman Groupe Limited, Harlow U.K.
- CDC (1999) Determination of nicotine, pH and moisture content of six US commercial moist snuff products. *MMWR Weekly* 48(19): 398-401.
- Cochran, E.W., Joseph, M.J., Stinson, S.L. and Summers, S.S. (2003) Application of a diffusion-denuder method for the investigation of the effects of "smoke pH" on vapor-phase nicotine yields from different types of cigarettes. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 2(6): 365-372.
- CORESTA (2005) Determination of nicotine in tobacco and tobacco products by gas chromatographic analysis. CORESTA Recommended Method N°62.
- Health Canada (1999) Determination of whole tobacco pH. Health Canada-Official Method T-310.
- Moore, K. (1993) Calculations of free-Base and protonated forms of nicotine, Tobacco Document On-line RJR-508728766-508728768.
- Morie, GP (1972) Fraction of protonated and unprotonated nicotine in tobacco smoke at various pH values. *Tobacco Science* 16: 167.

- Pankow, J.F. (2001) A consideration of the role of gas/particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract. *Chem. Res. Toxicol.* 14(11): 1465-1481.
- Pankow, J.F., Barsanti, K.C. and Peyton, D.H. (2003) Fraction of free-base nicotine in fresh smoke particulate matter from the Eclipse "cigarette" by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 23-27.
- Pankow, J.F., Mader, B.T., Isabelle, L.M., Luo, W., Pavlick, A. and Liang, C. (1997) Conversion of nicotine in tobacco smoke to its volatile and available free-base form through the action of gaseous ammonia. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2428-2433.
- Pankow, J.F., Tavakoli, A.D., Luo, W. and Isabelle, L.M. (2003) Percent free base nicotine in the tobacco smoke particulate matter selected commercial and reference cigarettes. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 1014-1018.
- Rogers, J.D. and Mitchem A.R. (1976) Physical properties of leaf as indicators of chemical and smoking properties. *Recent Advances in Tobacco Science* 2: 112-126.
- Watson, C.H., Trommel, J.S., and Ashley, D.L. (2004) Solid-phase microextraction-based approach to determine free-base nicotine in trapped mainstream cigarette smoke total particulate matter. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7240-7245.
- Whidby, J.F. and Seeman, J.I. (1976) The configuration of nicotine. A nuclear magnetic resonance study. *J. Org. Chem.* 41: 1585-1590.
- Williamson R.E. and Chaplin J.F. (1981) Levels of chemical constituents in cured leaves of four burley tobacco cultivars according to stalk position. *Tobacco Science* 25: 75-78.
- WHO (2003) WHO Framework Convention On Tobacco Control, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (2004) WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, World Health Organization, Geneva, Switzerland.