ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol.15, No.1, 26-30, 2002
Printed in the Republic of Korea

GC/MS를 이용한 한국 주류 중의 Ethyl Carbamate정량

박교범 · 이석근★
한국화학연구원 분석실
(2001. 10. 22 접수)

Quantitative Analysis of Ethyl Carbamate in Korean Alcoholic Beverages by Chromatography with Mass Selective Detection

Gyo-Beom Park and Sueg-Geun Lee★
Chemical Analysis Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusung, Taejeon 305-600, Korea
(Received Oct. 22, 2001)

요 약 : 한국 고유의 전통주 및 일반 알코올 음료에 대한 ethyl carbamate의 함량을 알아보기 위하여 국내에서 시판되고 있는 술을 dichloromethane용매로 추출한 후 GC/MS-SIM방법에 의해 분석하였다. 분석결과 ethyl carbamate는 한국고유의 전통주에 4.6-50.2 ㎍/L, 비 증류주에 27.8-45.4 ㎍/L, 위스키에는 24.8-55.1 ㎍/L함유되어 있음을 알 수 있었다. 회수율은 83.3-104.8 %의 값을 얻었고, 상대표준편차는 1.8-14.81 %, 검출한계는 0.3 ㎍/L이었다.

Abstract : In order to determine the contents of ethyl carbamate in Korean traditional alcoholic beverages and general beverages, GC/MS-SIM method was used after extraction of beverages with dichloromethane. The contents of ethyl carbamate in Korean traditional alcoholic beverages, non-distilled alcohol, and whisky were detected in the range of 4.6-50.2 ㎍/L, 27.8-45.4 ㎍/L, and 24.8-55.1 ㎍/L, respectively. The recoveries were ranged from 83.3 to 104.8 %. The values of relative standard deviation were ranged from 1.8 to 14.8 % and the detection limit was 0.3 ㎍/L.

Key words : ethyl carbamate, alcoholic beverages, gas chromatogr., GC-MS.

1. 서 론

Ethyl carbamate(urethane)는 발암물질로 알려져 있으며 발효 과정에서 생성되는 부산물로 대부분 발효식품 및 알콜성 음료 등에 존재하며[1-2] 체내에 흡수되어 vinyl carbamate로 대사 된 후 vinyl carbamate epoxide로 전환되어 DNA, RNA 및 단백질 등의 거대분자와 adduct를 형성하여 각종 암을 유발하는 것으로 보고되었다.[3]

1943년에 ethyl carbamate의 동물에 대한 발암성이 입증되었으며[4] 1970년대 초기에 식품 및 알콜성 음료에 대한 연구에서[5] ethyl carbamate가 함유되어 있다고 보고되었다. Walker et al[6] 은 ethyl carbamate의 검출방법으로 flame ionization detector(FID), alkali flame ionization (AFID), hall electrolytic conductivity detector (HECD)등을 사용하여 100 ㎍/L의 농도까지 검출하였다. Ough[2]는 좀더 변형시킨 electrolytic conductivity detector(ECD)검출기를 사용하고 시료량을 많게 하여 훨씬 낮은 농도까지 검출하였으며 Joe et al[7]은 mass spectrometry(MS)등의 다양한 검출기를 이용하여 와인에서 1 ㎍/L까지 검출하였으며 Baily et al[8]등은 nitrogen phosphorus thermionic detector(NPTD)를 사용하여 검출

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

한계를 낮게 하기 위한 연구를 하였다. 최근에는 ethyl carbamate의 발암성 때문에 알콜성 음료에 대한 ethyl carbamate함량이 관심이 되고 있으나 1985년 이전에는 각 국에 ethyl carbamate함량에 대한 규제가 없었다. 최근 캐나다의 건강보건기구에서 알코올 음료 중에 수백 ㎍/L의 ethyl carbamate가 발견되었다고 보고[9]되면서 ethyl carbamate의 함량을 제정하여[10] 규제하기 시작했다. 이에 따라 ethyl carbamate에 대한 여러 가지 분석방법이 개발되었다. 그러나 우리나라는 아직 ethyl carbamate의 규제가 제정되어있지 않다. 본 연구에서는 이와 같은 배경에서 주류중 ethyl carbamate 함량을 조사하고 존재여부를 규명하고자 GC/MS를 이용하여 분석하였다.

2. 실 험

2.1.시약 및 기기

본 연구에서 사용한 표준물질 ethyl carbamate(98 %)와 내부표준물질로 사용한 n-butyl carbamate(98 %)는 Aldrich사(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였고 추출에 사용한 dichloromethane용매와 methanol 및 ethyl acetate는 Berdick & Jackson사(Muskegon, MI, USA), anhydrous sodium sulfate와 sodium chloride는 (E. Merck사)에서 구입하였다.

사용한 기기는 HP5890 SeriesⅡ gas chromatograph/ HP 5971 A mass selective detector(Agilent Technologies, Palo, Alto, CA, USA)를 사용하였으며 MS의 이온화 방식은 전자이온화(electron impact)법을 사용하고 이온화 에너지는 70 eV로 하였다.

분석 컬럼은 DB-WAX cross linked polyethylene glycol(PEG) fused-silica capillary column(30 m × 0.25 ㎜ I.D., 0.25 ㎛ film thickness)을 사용하였고 컬럼은 이온원에 직접 연결하고 운반가스는 헬륨(99.999 %)을 사용하여 운반속도를 1.0 ㎖/min의 유속으로 흘려주었으며 transfer line 및 ion source온도는 각각 280 ℃와 180 ℃로 하였다. 컬럼의 온도는 60 ℃에서 1분간 유지한 다음 7 ℃/min으로 승온하여 170 ℃까지 올리고 다시 12 ℃/min로 240 ℃까지 올려서 15분간 머물게 하였다. 시료 주입방법은 비분할(splitless)주입 방법을 사용하였고 주입구의 온도는 230 ℃이고 특정질량을 가지는 이온만을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring(SIM)방법으로 분석하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 표준용액의 제조

화합물의 표준용액의 제조는 ethyl carbamate와 내부표준용액으로 n-butyl carbamate등은 메탄올을 사용하여 농도를 각각 1000 ㎍/mL의 표준원액이 되도록 만들었다. 표준원액은 메탄올을 사용하여 희석하여 100 ㎍/mL의 표준용액으로 하였고 내부 표준액은 1000 ㎍/mL의 표준원액을 그대로 사용하였다.

2.2.2. 시료

시료는 전통주 5, 증류주 2, 비 증류주 2, 기타 주류 3종으로 우리나라에서 많이 유통되고 있는 주류를 시중에서 직접 구입하여 사용하였다.

2.2.3. 검정곡선의 작성

검정곡선을 작성하기 위한 표준 검정용액은 다음과 같이 만들어 사용하였다. 이미 만든100 ㎍/mL의 표준용액을 0.01, 0.05, 0.5, 2.0, 10 ㎍/mL의 농도 범위로 희석하여 만들고 각각을 2 mL vial에 위에서 만든 1000 ㎍/mL의 내부표준용액을 2 μL 씩 spike한 후 최종부피를 1 mL로 하여 뚜껑을 닫은 후 밀봉하였다.

검정곡선은 각 검정용액의 내부 표준물에 대한 피크 면적비로 농도비의 관계를 표시하는 표준검정곡선을 작성하였다. 즉, 각 화합물의 면적비(A_s/A_{is}) 와 농도비(C_s/C_{is})의 관계를 단순 선형회기 선으로 작성하였다.

2.2.4. 시료의 추출

본 연구에 사용된 시료는 알코올 함량이 14-45 %로써 다양한 종류의 알코올성 음료다. 추출에 사용한 시료의 양은 알코올 함량에 따라 다르게 하였으며 대부분 알코올 함량이 10-20 % 정도가 되도록 시료의 양을 취하였다. 알콜올 함량이 14 %이하인 비 증류주는 50 mL를 취하였고, 알코올 함량이 18-25 %인 시료는 25 mL의 시료를 취하여 포화 NaCl용액 25 mL를 넣어 희석하여 알코올함량을 낮게 하고 알코올 함량이 40-45 %인 시료는 15 mL의 시료를 취해 35 mL의 포화 NaCl용액을 넣어 전체 부피가 50 mL가 되도록 하였다. 이 50 mL의 시료용액을 250 mL의 분액여두에 넣고 6M-NaOH 용액을 가하여 pH 10으로 조절하였다. 추출용매 70 mL methylene chloride로 3회 추출하여 합한 분리액을 anhydrous sodium sulfate를 10 cm 정도 채운 컬럼(100 mm(i.d.) x 20 mm)에 통과

시킨 후 rotary evaporator를 사용하여 40 ℃ 이하에서 0.5 mL 정도 될 때까지 감압 농축하였다. 여기에 1000 ㎍/mL의 내부표준용액을 2 ㎕를 넣어 최종 부피를 1 mL가 되게 하였다. 이때 methylene chloride의 용매가 완전히 마르지 않게 하기 위하여 농축하기 전 250 mL의 round flask에 0.5 mL의 ethyl acetate을 넣었다.

2.2.5. 회수율 측정

회수율을 측정하기 위하여 위의 각각의 시료에 100 ㎍/mL 농도의 ethyl carbamate표준용액을 25 μL를 spike 한 후 앞의 시료와 같은 방법으로 추출하여 anhydrous sodium sulfate층을 통과시켜 수분을 제거하고 rotary evaporator를 사용하여 40 ℃이하에서 감압 농축하였다. 1000 ㎍/mL농도의 내부 표준액 2 ㎕를 넣어 최종부피를 1 mL가 되게 한 후 GC/MS로 분석하여 크로마토그램의 피크를 측정한 후 면적을 구하여 앞에서 작성한 표준검정곡선으로부터 농도를 구하여 회수율을 계산하였다. 위의 과정을 3번을 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

농도 별로 만든 표준물질을 GC/MS로 ethyl carbamate를 분석하여 얻어진 검정곡선 및 상관 관계식은 *Fig.* 1에 나타내었다. 표준용액의 농도범위에서 R^2값이 모두 0.9998이상을 나타냄에 따라 직선성이 매우 좋고 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

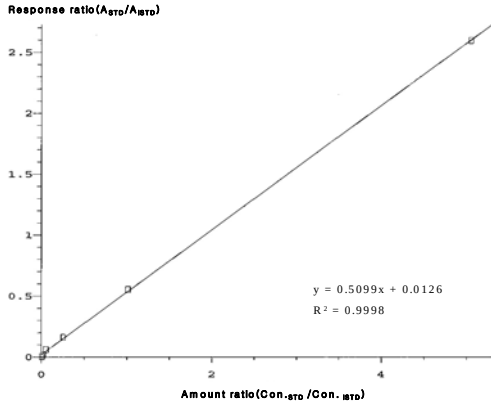

Fig 1. Calibration curve for GC/MB analysis of ethyl carbamate.

3.2. 회수율 측정

회수율 측정은 추출하기 전, 시료에 알고있는 농도의 ethyl carbamate를 spike하여 시료와 같은 방법으로 알코올 음료들의 정확한 ethyl carbamate의 함량을 측정하여 회수율을 얻었으며 회수율 측정결과는 *Table 1*에 나타냈다. 전체 회수율은 83.3-104.8 %이고, 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 1.8-14.8 %이었다.

Table 1. The analytical results of spiked samples by GC/MS-SIM

Samples	Ethyl carbamate levels(㎍/L)				
	Incurred	Spiked amount(㎍/L)	Fortified	Recovery (%)	RSD (%)
A	27.8±0.8	50	80.2±3.7	104.8	2.9
B	45.4±1.8	50	92.8±4.4	94.8	3.9
C	1.1±0.2	100	99.2±8.2	98.1	18.4
D	2.2±0.3	100	92.8±2.9	90.7	13.6
E	6.1±0.3	100	102.4±3.9	96.3	7.0
F	24.8±2.0	100	112.4±1.8	87.6	8.0
G	55.1±2.2	100	143.2±2.9	88.1	4.1
H	21.9±2.1	100	105.2±14.8	83.3	9.5
I	8.6±0.4	100	95.5±5.0	86.9	4.9
J	4.6±0.9	100	105.6±6.8	101.0	19.8
K	50.2±2.9	100	134.2±4.4	83.9	5.8
L	18.9±2.1	100	113.7±3.4	94.8	10.8

3.3. 실제시료의 분석

본 실험에서 사용한 시료는 대부분 알코올 함량을 10-20 %정도가 되게 포화 NaCl용액을 넣어 희석 한 후 추출하는 과정을 거치게된다. 이때 알코올 함량이 40-45 %인 증류주는 추출방법에 문제가 없었으나 알코올 함량이 높은 전통주의 경우에는 종류에 따라 methylene chloride층이 분리가 덜 되는 것이 있었다. 14 %이하인 비 증류주에서도 같은 종류의 알코올 음료임에도 불구하고 제조사에 따라서 분리의 정도가 약간 다른 것은 각 제조사의 원료 및 첨가제에 따라 차이가 나는 것으로 생각된다.

알코올음료에 들어있는 ethyl carbamate의 추출은 복잡한 매질과 당분 등의 방해물질로 인하여 크로마토그래피의 분석에 영향을 주었다. 표준물질 및 실제 시료의 분석은 각각의 화합물에 대한 특성이온만을 선택하

는 selected ion monitoring(SIM)방법으로 ethyl carbamate는 m/z 62, 74, 89 그리고 n-butyl carbamate는 m/z 62, 74, 88을 선택하였으며 정량분석은 m/z 62이온으로 하였다. 이때 사용된 표준물질의 이온크로마토그램은 *Fig.* 2이며 증류주와 전통주의 이온크로마토그램은 *Fig.* 3과 *Fig.* 4에 각각 보여주었다. *Fig.* 2의 표준물질 이온크로마토그램에서 보는바와 같이 표준물질은 본 연구에서 정립한 분석조건 에서 분리가 아주 잘 되었으며 *Fig.* 3과 *Fig.* 4 시료의 이온크로마토그램 에서는 다른 성분들이 무척 많이 있슴에도 불구하고 ethyl carbamate가 미량으로 들어있는 것을 알 수 있었다.

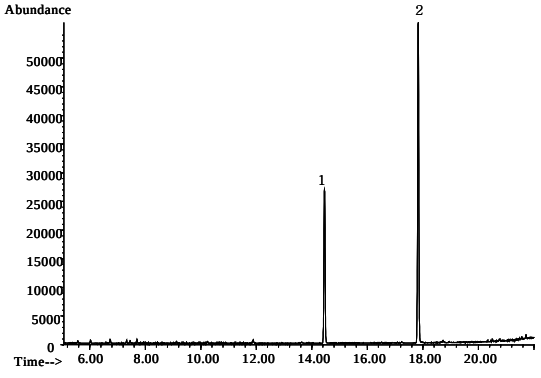

Fig 3. GC/MS total ion chromatogram(TIC) of standards.
1 : Ethyl carbamate, 2 : n-Butyl carbamate(ISTD)

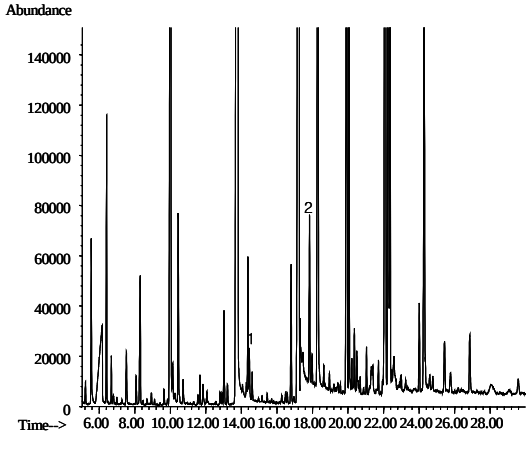

Fig 3. GC/MS total ion chromatogram(TIC) of distilled spirit.
1 : Ethyl carbamate, 2 : n-Butyl carbamate

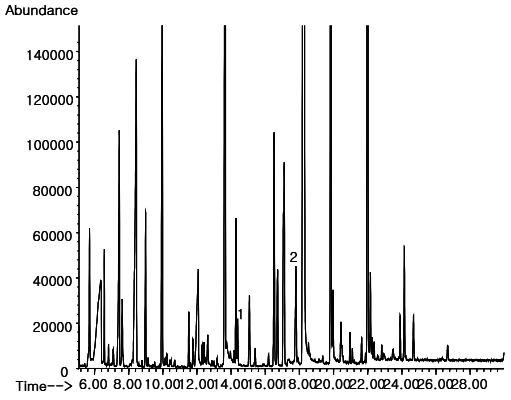

Fig 4. GC/MS total ion chromatogram(TIC) of tradition spirit.
1 : Ethyl carbamate, 2 : n-Butyl carbamate

시중에 판매되는 알코올성 음료 12종을 구입하여 분석한 결과는 *Table* 2에 보여주었다. 모든 알코올 음료에서 ethyl carbamate성분이 검출되었으며 알코올 함량이 14 %이하의 알코올성 음료는 물론 알코올 함량이 높은 40-45 %인 시료에서도 고루 검출된 것으로 보아 대부분 우리나라에 유통되고 있는 전통주 및 알코올음료에 ethyl carbamate성분이 함유되어 있다고 생각할 수 있다.

Table 2. Concentration(㎍/L) of ethyl carbamate in Korean alcoholic beverages

Samples	Alcohol contents(%)	Mean[a]±S.D.
A	14	27.8±0.8
B	15	45.4±1.8
C	22	1.1±0.2
D	22	2.2±0.3
E	23	6.1±0.3
F	40	24.8±2.0
G	40	55.1±2.2
H	45	21.9±2.1
I	40	8.6±0.4
J	25	4.6±0.9
K	45	50.2±2.9
L	18	18.9±2.1

[a] Mean value from 5 measurements

Diachenko[11]등이 1989년 미국 FDA에 발표한 보고서에 의하면 알코올함량이 14 %이하인 193개의 알코올

음료에서 ethyl carbamate함량은 1-24 ㎍/L이고 알코올 함량이 14 %이상의 알코올음료 37개는 1-862 ㎍/L의 결과를 얻어, 알코올함량이 ethyl carbamate의 생성에 영향을 미치는 것으로 보았다. Sansan[12]은 쌀과 밀을 주원료로 한 대만의 비 증류주에서 ethyl carbamate의 평균함량이 899.9 ㎍/mL부터 많게는 1200 ㎍/mL까지 검출되었다고 발표하였다. 따라서 본 연구결과 *Table* 1의 시료 A와 B에서 보는바와 같이 알코올함량이 15%이하임에도 불구하고 ethyl carbamate함량이 27.8-45.4 ㎍/mL 검출된 이유는 Sansan[12]의 결과와 같이 제조원료가 주로 쌀과 같은 곡류이며 단순 발효만 시켜서 제조한 비 증류주이기 때문인 것으로 생각 되어진다.

시료 C, D, E등에서는 1.1-6.1 ㎍/mL의 아주 소량 검출된 것은 발효시킨 주정을 희석하여 제조함으로써 ethyl carbamate함량이 가장 적게 들어있는 것으로 추정되며, 증류주인 시료 F와 G의 경우 ethyl carbamate 함량이 24.8 ㎍/L와 55.1 ㎍/L로 비교적 높게 검출되었지만 Dennis[13]등이 보고한 19-90 ㎍/L의 결과와 거의 일치하는 것을 알 수 있었다.

우리나라 전통주 등은 *Table* 2의 시료 H-L로 알코올 함량에 따라 ethyl carbamate양이 일정치 않고 4.6-50.2 ㎍/L사이로 각기 다르게 나타난 것은 위의 Diachenko[11]등이 보고한 알코올함량과 ethyl carbamate의 생성량과 다르지만, Dennis[13]등이 증류주에서 보고한 범위 안에서 일치하는 것으로 보아 우리만의 독특한 전통주를 만드는 특별한 재료 및 숙성기간 등 제조방법에 기인한다고 사료된다.

4. 결 론

알코올성 음료에서 methylene chloride의 용매추출법과 GC/MS를 이용한 분석결과는 모든 알코올 음료는 ethyl carbamate를 1.1-55.1 ㎍/L포함하고 있슴을 보여주었다. 특히 알코올 함량이 낮은 비 증류주에서 27.8-45.4 ㎍/L까지 검출되었고 위스키는 24.5-55.1 ㎍/L, 전통주는 4.6-50.2 ㎍/L의 농도가 들어 있슴를 확인하였다. 회수율은 83.3-104.8%사이로 높게 나타났으며 상대표준편차는 1.8-14.8 %이고 검출한계는 0.3 ㎍/L를 얻었다. 직선성도 매우 좋아 methylene chloride 추출방법에 의한 GC/MS분석이 알코올음료의 ethyl carbamate성분을 분석하는데 여러 가지 방법들 중 간편하고 적합한 분석방법 이라고 생각된다.

참고 문헌

1. R. Battaglia. H.G.S. Conacher and B.D. *Food Add. Conta.,* **7**, 477-496(1991).
2. C.S. Ough, *J. Agric. Food Chem.,* **24**, 323-328 (1976).
3. Schlatter, J. and Lutz, W. K. *Food Chem. Toxicol.,* **28**, 205-211(1990).
4. Nettleship, A. Henshaw , P. S. *J. Natl. Cancer Inst.* **3**, 309(1943).
5. C.S. Ough, *J. Agric. Food Chem.,* **24**, 328(1976).
6. G. Walker, W. Witerlin, H. Fouda and J. Seiber, *J. Agric. Food Chem.,* **22**, 944-947 (1974).
7. F. L. Joe, Jr. D. A. Kline, E. M. Miletta, J. A. G. Roach, E. L. Roseboro and T. Fazio, *J. Assoc. Off. Anal. Chem*., **60**, 509(1977)
8. Bailet, R., North, D., and Myatt, D., *J. Chromatogra*., **369**, 193-198(1986).
9. B. P. -Y. Lan, D. Weber and D. page., *J. Chromatogra*., **402**, 233-241(1987).
10. Conacher. H. B. S., Page. B. D., Lau, B. P. Y., Lawrence, J. F.., Bailley, R., J. Assoc. Off. Anal. Chem., **70**, 749(1987).
11. G. W. Diachenko, B. J. Canas, F. L. Joe and M. Dinovi., Ch. **34**. In "Food safety Assessment". J. W. Finley, S.F. Robinson and D. J. Amstrong(Ed.), ACS symposium Series No, **484**, 419-428(1992). American Chemical Society Press, Wasington(1992).
12. Sansan H. W. Wagn, Sheu-Fen Chang and Gow-Chin Yen., *J. Chinese. Agric. Chem*., **35**(1), 40-51 (1997).
13. M. J. Dennis, N. Howarth, P. E. Key, M. Pointer abd R. C., *Food Add. Contam*., **6**, 383-389(1989).