pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 2, pp. 114~122 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.2.114

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

즉석 식품에서 니트로사민이 검출되는 요인 분석

서보경[1] · 권훈정[1,2]*
[1]서울대학교 식품영양학과, [2]서울대학교 생활과학연구소

Factors Attributing to the Formation of N-Nitrosamines in Instant Food

Bokyung Suh[1] and Hoonjeong Kwon[1,2]*
[1]*Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul, Korea*
[2]*Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, Korea*
(Received June 27, 2016/Revised August 11, 2016/Accepted January 24, 2017)

ABSTRACT - N-nitrosamines can be produced in the process of heating, processing, storage and packaging. Migration specifications for N-nitrosamines exist only for rubber baby bottle nipples, which are regulated by the Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). There is no regulation for other food contact substances (FCS) and studies on N-nitrosamines migration from FCS are rather limited. A pilot study showed an increase in N-nitrosamines contents when cooking instant noodles. Thus, the migration from the packaging was suspected and it was necessary to monitor the migration of N-nitrosamines from food packaging materials and to examine the change in N-nitrosamines contents when cooking instant foods. Three N-nitrosamines, NDMA (N-nitrosodimethtlamine), NDEA (N-nitrosodiethylamine), NDBA (N-nitrosodibutylamine), were analyzed in migration test solutions from plastics such as polyethylene, polypropylene and polystyrene, papers and aluminium containers. In all test solutions, N-nitrosamines were detected less than method quantitation limits (MQLs). Food samples were also investigated to ensure that there is no effect from food contact substances when cooking instant foods. In retort sauces such as curry, black soybean sauce and tomato sauce, NDMA concentration was ranged from 0.54 to 3.81 μg/kg, but there were no significant differences between unheated and heated samples. However, the NDMA contents were significantly increased in most of the instant noodle samples tested when cooked ($p < 0.05$). No effects from the food contact substances or cooking water was observed. Only when the seasoning powder and noodles were cooked together was NDMA detected. Individual components (noodle, seasoning powder or dried vegetable) or other combinations such as noodles and dried vegetables did not generate N-nitrosamines. Therefore, it is speculated that NDMA may be formed from the precursors in noodles and seasoning powders when they are solubilized in a medium of water.

Key words : N-nitrosamine, Migration, Food contact substances, Instant food

니트로사민은 아민의 질소 원자에 니트로소기가 결합한 화합물로 니트로사민과 이들의 전구체는 물, 토양, 공기 등의 환경, 식품, 화장품, 고무제, 담배연기 등에 다양하게 존재한다고 보고되었다[1)]. 니트로사민은 발암가능물질로, NDMA (N-nitrosodimethylamine)의 간 독성을 계기로 독성에 대한 연구가 확대되었다. 이후 니트로사민이 다양한 종에 간 독성을 보이며, 종류에 따라 간 외의 장기인 폐, 식도, 방광 등에도 발암성을 가진다고 알려져 있다[2)]. 이러한 니트로사민은 식품 섭취를 통해 높은 비율로 노출된다[3)]. 식품 중 주로 발견되는 니트로사민은 NDMA, NDEA (N-nitrosodiethylamine), NDBA (N-nitrosodibutylamine), NPYR (N-nitrosopyrrolidine), NPIP (N-nitrosopiperidine), NMOR (N-nitrosomorpholine), NPRO (N-nitrosoproline)으로 IARC (International Agency for Research on Cancer)에서 NDMA, NDEA을 인체발암추정물질(Group 2A)로 분류하고 NDBA, NPYR, NPIP, NMOR 은 인체발암가능물질(Group 2B)로 분류하고 있다. 니트로사민은 아민과 무수아질산과 같은 질소산화물이 결합하여 니트로소 암모늄 이온을 형성하고 이후 탈수소화를 거치면서 생성된다[4,5)]. 니트로사민 생성을 촉진하는 질소산화물은 아질산염으로부터 생성이 되며, 아질산염은 식품 가공시 첨가되기도 하고 식물체 내에 축적된 질산염의 환원으로부터 생성되기도 한다[6,7)]. 아민 전구체의 경우 아미노산의 탈탄산 반응

*Correspondence to: Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition and Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Korea
Tel: 82-2-880-6835, Fax: 82-2-884-7555
E-mail: hjkwon@snu.ac.kr

또는 알데히드, 케톤의 아미노화 반응으로 생기는 바이오제닉 아민, 프롤린, 사르코신과 같은 아미노산, 콜린, 레시틴과 같은 인지질로부터 생성될 수 있다[8-11]. 식품 내 니트로사민은 축산물 및 식육가공품, 수산물 및 어육가공품, 절임 식품, 발효과정을 거치는 맥주, 치즈 등에서 검출된 연구가 보고되어 있으며[12-19], 식품을 조리하는 과정에서 함량이 변화하는 연구도 보고되었다[17,20].

식품의 종류가 다양해지고 식품 섭취의 간편성이 부각됨에 따라 간편가정식의 소비가 증가하고 있는 추세이다[21]. 식품 내 니트로사민은 식품 원재료와 가공식품 및 이들을 조리하는 과정에서의 변화에 대한 연구가 대부분이며 용기·포장식품에서의 니트로사민 분석연구는 제한적이다. 식품에 사용하는 용기·포장물질에서 니트로사민이 발견된 사례를 살펴보면 식육가공품을 포장하는 그물모양의 고무제에서 햄으로 NDBA가 이행되기도 하였으며[22], 유아용 젖병 젖꼭지에서 NDMA와 NDBA를 비롯한 총 니트로사민이 30 ppb이상 검출되었다[23]. 이에 따라 고무제 젖꼭지에 한하여 니트로사민에 대한 규제가 설정되었다. 종이제 포장물질에서 NMOR이 이행되었다는 결과도 보고되었지만[24] 후속연구가 진행된 바는 없다. 또한 최근 연구에서 즉석밥을 데우기 전과 비교하여 전자레인지에 데웠을 때 NDMA, NDEA, NDBA 함량이 모두 증가하였으며, 라면의 경우도 일반라면을 끓였을 시 NDEA가 증가하였지만 용기라면을 끓였을 때 NDEA의 증가폭이 더 큰 것이 보고되었다[25]. 따라서 즉석식품에서 니트로사민 함량 변화의 원인이 용기·포장에 의한 것인지 식품 자체의 변화에서 기인한 것인지에 대한 필요성이 제기되었다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 가열조리과정을 거치는 용기·포장물질에 대해 니트로사민 3종(NDMA, NDEA, NDBA)의 용출 여부를 모니터링하고 즉석식품을 직접 조리 시 니트로사민 함량이 증가하는 요인을 규명하고자 하였다.

Materials and Methods

용기·포장으로부터 침출용매로 이행되는 니트로사민 분석

표준물질, 시약 및 기기

니트로사민의 표준물질은 EPA 8270 nitrosamine mix를 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구매하여 사용하였다. 내부표준물질은 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18를 Chiron (Trondheim, Norway)사 제품을 사용하였고 내부표준물질을 디클로로메탄에 희석하여 제조한 10 ng/mL 혹은 25 ng/mL의 내부표준첨가용액을 사용하였다. 침출용매로 사용한 물과 n-헵탄은 Fisher (Westborough, MA, USA)사의 HPLC용 시약을 사용하였고 초산은 Samchun Chemical (Gyeonggi, Korea)사의 제품을 사용하였다. 시험액과 저지방시료의 정제과정에서 사용한 디클로로메탄, n-헥산은 Fisher사, 메탄올은 Acros (Boston, MA, USA)의 농약분석용 시약을 사용하였다. Extrelut NT는 Merck (Darmstadt, Germany)사, Florisil (1 g, 6 mL)는 Waters (Milford, MA, USA)사 제품을 사용하였다. 고지방시료의 액체 추출 시에는 아세토니트릴과 아세톤을 Fisher사의 농약분석용 시약으로 사용하였으며, C-18 (500 mg, 6 mL) 카트리지는 Waters사에서 구매하였다. 니트로사민 분석은 Thermo Scientific (Frankin, MA, USA)의 Trace 1310 GC (Gas Chromatography)와 질량분석기 TSQ8000 Evo Triple Quadrupole GC-MS/MS를 사용하였고, 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. GC-PCI-MS/MS condition for three N-nitrosamines analysis

Column	Guard: DB-5ms (5 m × 0.53 mm I.D., 0.25 μm df) Main: DB-wax (60 m × 0.25 mm I.D., 0.5 μm df)
Flow rate	He (Helium), 2.0 mL/min
Inlet temp.	250°C
Inject volume	2 μL
Oven	50°C (1 min) → 20°C/min → 120°C (0 min) → 5°C/min → 170°C (10 min) → 25°C/min → 240°C (5 min)
Transfer line temperature	240°C
Source temperature	150°C
Reagent gas	NH_3 (Ammonia) (Flow rate: 2.0 mL/min)
Collision gas	Ar (Argon) (cell pressure: 60 Pa)

용기·포장의 수집

국내 대형마트에서 유통 중인 식품 중 용기·포장채로 조리하는 식품 31건을 구매하였다. 수집한 시료는 폴리에틸렌 코팅 종이제 용기 6건, 폴리에틸렌제 레토르트 파우치 1건, 폴리스티렌제 용기 3건, 폴리프로필렌 코팅 종이제 용기 3건, 폴리프로필렌제 용기 9건, 폴리프로필렌제 레토르트 파우치 8건, 금속제 용기 1건이었다.

용출시험 조건

수집한 용기·포장 시료는 반지름 약 4.4 cm의 원형으로 잘라 시편으로 제조하였고 각 시료 당 3반복으로 용출시험을 진행하였다. 레토르트 파우치의 경우 두께가 얇기 때문에 시편 3~4장을 덧대어서 용출시험을 진행하였다. 용출시험과 관련된 사항은 기구 및 용기포장의 기준 및 규격 고시(고시 제2014-27호)을 따랐다[26]. 용출시험은 단면 용출로만 진행하였으며, 침출용매는 고시[26]와 기구 및 용기포장 용출시험에 대한 식품유형별 침출용매 적용 가이드[27]에 따라 적용하였다. 종이제의 경우 식품과 접촉하는

면에 대하여 표면적 1 cm^2당 2 mL의 비율로 침출용매에 접촉시킨 후 25°C에서 10분 동안 방치한 액을 시험액으로 사용하였다. 폴리에틸렌, 폴리프로필렌제와 금속제는 식품과 접촉하는 면에 대하여 표면적 1 cm^2당 2 mL의 비율로 침출용매에 접촉시킨 후 95°C에서 30분 동안 방치한 액을 시험액으로 사용하였다. 침출용매가 n-헵탄인 경우는 25°C에서 1시간 동안 방치한 액을 시험액으로 사용하였다.

용기·포장 식품의 조리 시 니트로사민 함량 분석

대상식품

용출시험 시 수집한 시료의 각 재질별 대표식품을 선정하였다. 폴리에틸렌 코팅 종이제 용기와 폴리스티렌제 용기는 라면 생산 4사의 대표제품을 시료로 선정하였고, 레토르트 포장제품은 폴리에틸렌 재질의 자장 소스 1종과 폴리프로필렌 재질의 자장과 카레 소스, 스파게티소스 각각 1종씩을 시료로 선정하였다. 폴리프로필렌제 용기는 즉석밥 시료 1종, 폴리프로필렌 코팅 종이제 용기는 우동 시료 1종, 금속제 용기 역시 우동 시료 1종을 분석시료로 선정하였다.

식품시료의 조리

식품 시료는 조리 전과 조리 후 시료를 준비하였다. 조리 후 시료의 조리법은 각 제품에 명시된 방법을 따랐다. 컵라면 시료는 끓는 물을 제품의 표시선까지 부은 후 명시된 시간동안 방치하였고, 레토르트 시료의 경우 다량의 물이 끓기 시작하면 레토르트 식품을 넣고 명시된 시간동안 방치한 후 꺼내었다. 즉석밥 시료는 끓는 물에서의 중탕과 전자레인지(700W) 조리 두 가지 방법을 사용하였고 폴리프로필렌 코팅 종이제 우동 시료의 경우 끓는 물을 표시선까지 붓고 전자레인지에서 조리를 진행하였다. 각 시료는 용기·포장채로 조리하는 것과 용기·포장을 이용하지 않고 조리하는 것으로 구분하여 시료를 제작하였다. 용기·포장을 이용하지 않은 방법은 컵라면의 경우 사기그릇에 조리법과 같은 양의 조리수를 부어 일정 시간 방치하여 제작하였다. 레토르트와 즉석밥의 열탕의 경우 스테인리스 작은 냄비에 포장물질을 제거한 내용물을 넣고 크기가 큰 냄비에 내용물이 담긴 작은 냄비를 중탕하여 제작하였다. 전자레인지에 조리하는 경우에도 사기그릇에 포장물질을 제거한 내용물을 담고 700W에서 조리법에 명시된 시간동안 데워서 제작하였다. 조리 시 필요한 조리수로는 Fisher사의 HPLC용 물을 사용하였고 실제로 섭취하는 형태로 조리하기 위해 수돗물을 이용하여 용기·포장에 직접 조리한 시료도 분석에 사용하였다. 모든 시료는 균질화하여 −80°C에서 보관하였다가 분석하였다.

식품시료와 시험액의 전처리

저지방시료 전처리

저지방시료 전처리는 Seo 등[28]의 실험 방법을 따랐다. 균질화된 검체 5 g을 튜브에 넣고 0.1 N 수산화나트륨 용액 5 mL를 넣어 염기성 환경을 조성한 후, 1 mL의 내부표준첨가용액(25 ng/mL)을 첨가하고 2분간 진탕하였다. Extrelut NT 약 6 g을 튜브에 넣고 시료와 골고루 섞이게 한 후 유리컬럼(3.7 cm × 15 cm)에 넣었다. 용출액 (디클로로메탄:n-헥산 = 9:1 v/v) 50 mL로 용출한 후 30°C이하의 온도에서 4 mL까지 감압 농축하였다. 농축된 시료는 n-헥산 6 mL로 활성화를 시켜둔 Florisil 카트리지에 넣고 SPE (Solid phase extraction)를 진행하였다. 디클로로메탄:메탄올 = 95:5(v/v)용액 6 mL로 용출하고 용출액을 25°C 수욕상에서 질소로 농축하여 1 mL이하가 되도록 하였다. 이 농축액을 디클로로메탄으로 채워 1 mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

고지방시료 전처리

고지방시료 전처리는 Park 등[29]의 실험 방법을 따랐다. 균질화된 검체 5 g에 1 mL의 내부표준첨가용액(25 ng/mL)을 첨가하고 2분간 진탕하였다. 아세톤:아세토니트릴 = 1:1 (v/v)용매 20 mL를 넣고 2분간 진탕하고 다시 20 mL를 첨가하여 2분간 진탕하여 액체 추출을 진행하였다. 3000 rpm, 4°C조건에서 4분 동안 원심분리를 진행한 후, −80°C에서 20분간 방치하였다. 다시 3000 rpm, −4°C에서 4분간 원심분리를 진행하였다. 상층액을 모아서 25°C 수욕 상에서 질소로 농축하여 15 mL 이하가 되도록 하였다. C-18 카트리지에 약 2 g의 basic aluminium oxide를 채워 SPE (Solid phase extraction)를 진행하였다. 이 카트리지를 아세토니트릴 20 mL 씻어내고 농축액을 주입하였다. 아세토니트릴 25 mL로 추가로 씻어낸 후에 이 용출액을 30°C 수욕 상에서 질소로 농축하여 1 mL 이하가 되도록 하였다. 농축액을 아세토니트릴로 채워 1 mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

시험액의 전처리

시험액의 전처리는 저지방시료 전처리 방법에서 일부만 수행하였다. 침출용매가 물 또는 4%(v/v)초산인 경우 시험액 5 g에 각각 0.1 N 또는 1 N 수산화나트륨 용액 5 mL를 넣어 염기성 환경을 조성한 후, 1 mL의 내부표준첨가용액(10 ng/mL)을 첨가하고 2분간 진탕하였다. 저지방시료와 동일하게 고체상지지 액체추출을 진행하고 4 mL까지 감압 농축하고 나머지는 25°C 수욕 상에서 질소로 농축하여 1 mL 이하가 되도록 하였다. 침출용매가 n-헵탄인 경우 시험액 5 g에 내부표준첨가용액(10 ng/mL) 1 mL를 첨

가하였다. 저지방시료와 동일하게 Florisil 카트리지를 이용한 SPE 과정만 진행하였고 용출액은 25°C 수욕 상에서 질소농축기를 이용하여 1 mL 이하로 농축하였다. 이 농축액들은 디클로로메탄을 채워 1 mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

Results and Discussion

침출용매별, 식품매질별 검량선과 방법검출한계, 방법정량한계

침출용매별 검량선은 내부표준물질을 시료 내 농도 2 μg/kg가 되도록 첨가하였고, 각 표준물질의 농도 범위가 고르게 분포하도록 시료 내 농도 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 μg/kg의 8개 포인트에 대하여 검량선을 작성하였다. 식품매질별 검량선은 내부표준물질을 시료 내 농도 5 μg/kg가 되도록 첨가하였고, 각 표준물질의 농도 범위가 고르게 분포하도록 시료 내 농도 0, 0.1, 0.2, 1, 2, 5, 10, 20 μg/kg의 8개 포인트에 대하여 검량선을 작성하였다. 모든 검량선은 공시험에 표준물질과 내부표준물질을 첨가하여 전처리를 거친 후 3회 반복 측정하여 작성하였다. 표준물질과 내부표준물질의 농도비를 x축으로, peak 면적비를 y축으로 하여 검량선을 그린 결과, 모든 침출용매와 저지방·고지방시료에 대해 3종 니트로사민의 검량선 상관계수(R^2, correlation coefficient)가 0.99 이상임을 확인하였다. 니트로사민의 방법검출한계는 각 침출용매와 식품매질별로 5회 반복하여 전처리과정을 거친 공시험의 표준편차를 구한 후, 표준편차의 3.3배를 기울기로 나눈 값으로 설정하였고 방법정량한계는 각 침출용매와 식품매질별로 5회 반복하여 전처리과정을 거친 공시험의 표준편차의 10배를 검정곡선의 기울기로 나눈 값으로 결정하였다. 방법검출한계와 방법정량한계는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) of three N-nitrosamines in each food simulants and food matrices (Unit: μg/kg sample)

Simulant		NDMA	NDEA	NDBA
Water	MDL	0.03	0.04	0.05
	MQL	0.11	0.14	0.17
4% Acetic acid	MDL	0.05	0.03	0.03
	MQL	0.15	0.09	0.11
n-Heptane	MDL	0.06	0.02	0.07
	MQL	0.20	0.08	0.22
Food Matrix		NDMA	NDEA	NDBA
Fatless liquid (Apple juice)	MDL	0.10	0.10	0.10
	MQL	0.30	0.30	0.30
Fatless solid (Rice soup)	MDL	0.12	0.10	0.15
	MQL	0.35	0.30	0.46
Fatrich solid (Beef)	MDL	0.12	0.10	0.19
	MQL	0.38	0.30	0.60

용기·포장으로부터 침출용매로 이행되는 니트로사민 분석

31종의 시료의 침출용매로의 니트로사민 이행량을 살펴본 결과, 침출용매가 물인 경우 19건 중 12건에서 NDMA가 정량한계 미만으로 검출되었으며, NDEA는 3건이 정량한계 미만으로, NDBA는 불검출되었다. 4%(v/v) 초산의 경우 9건 중 5건에서 NDMA가 정량한계 미만으로 검출되었고 NDEA는 3건에서 정량한계 미만으로 검출되었으며, NDBA는 검출되지 않았다. n-헵탄의 경우는 NDMA가 검출되지 않았고 NDEA는 19건 중 1건에서 정량한계 미만으로 검출되었고, NDBA는 2건만이 정량한계 미만으로 검출되었다. 침출용매가 물인 경우, 다른 침출용매에 비해 NDMA 검출율이 63.1%의 빈도로 검출되었으나 모두 정량한계 미만으로 얻어졌다. 침출용매가 n-헵탄인 경우는 19건 중 NDMA가 검출된 시료가 없었으며, 다른 용매에서는 검출되지 않았던 NDBA가 2건의 시료에서 검출되었다. 이러한 차이는 분석물질의 수용성에 따른 차이와 용출 조건의 차이에서 기인하였을 것이라고 사료된다. 시험액의 니트로사민 함량 분석 결과, 정량한계 이상으로 검출된 시료가 없었기 때문에 용기·포장재에서의 용출이 조리 시 식품 내 니트로사민의 함량 증가를 초래한 것이라고 볼 수 없었다. 이에 용기와 식품 사이의 상호작용에 의해 차이가 발생했을 것이라 판단하여 후속 실험으로 식품시료 분석을 진행하였다.

용기·포장 식품의 조리 시 니트로사민 함량 분석

기구 및 용기포장물질 채로 조리하는 식품의 조리 전과 조리 후의 니트로사민 함량 변화를 조사한 결과, 폴리프로필렌 재질 토마토소스 레토르트에서 NDBA가 정량한계 미만으로 검출된 것을 제외하고 모든 시료에서 NDEA, NDBA는 검출되지 않았다.

폴리프로필렌 코팅 종이제의 우동 시료에서는 조리와 용기의 유무의 영향 없이 모두 니트로사민이 검출되지 않았다. 금속제인 알루미늄 용기의 우동 시료는 조리 전, 후 모두에서 NDMA가 정량한계 미만으로 검출되었다. 폴리프로필렌 용기를 사용한 즉석밥 시료에서도 조리 및 용기의 유무와 관계없이 모두 니트로사민이 검출되지 않았다(Table 3).

폴리에틸렌 레토르트의 자장 소스에서 조리 전 NDMA는 0.54 ± 0.33 μg/kg, 포장된 채로 끓인 시료는 0.84 ± 0.20 μg/kg, 냄비에 중탕하여 끓인 시료는 1.27 ± 0.45 μg/kg로 검출되었으며 조리 전, 후의 유의적인 차이는 보이지 않았다(Table 4). 폴리프로필렌 포장을 사용한 토마토소스 레토르트 제품에서도 모든 형태에서 NDMA가 검출되었으

Table 3. Occurrences of three N-nitrosamines in udon and steamed rice which can be cooked with their packaging materials (Unit: μg/kg sample)

Material of FCS[1)]	Contained food	Company	Cooking water	Sample type	NDMA	NDEA	NDBA
PP[2)] coated papers	Udon	A	-	Uncooked	ND[3)]	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	ND	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	ND	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	ND	ND	ND
Aluminium	Udon	A	-	Uncooked	Trace[4)]	ND	ND
			-	Cooked with FCS	Trace	ND	ND
			-	Cooked without FCS	Trace	ND	ND
PP packaging material	Cooked rice	B	-	Uncooked	ND	ND	ND
			-	Cooked with FCS-boil	ND	ND	ND
			-	Cooked without FCS-boil	ND	ND	ND
			-	Cooked with FCS-microwave	ND	ND	ND
			-	Cooked without FCS-microwave	ND	ND	ND

[1)] FCS: Food contact substance
[2)] PP: polypropylene
[3)] ND: Not detected
[4)] Trace: < MQL

Table 4. Occurrences of three N-nitrosamines in sauces which can be cooked with their retort pouches (Unit: μg/kg sample)

Material of FCS[1)]	Contained food	Company	Sample type	NDMA	NDEA	NDBA
PE[2)] packaging material	Black soy bean sauce	C	Uncooked	0.54 ± 0.33^{a}	ND[3)]	ND
			Cooked with FCS	0.84 ± 0.20^{a}	ND	ND
			Cooked without FCS	1.27 ± 0.45^{a}	ND	ND
PP[4)] packaging material	Curry	D	Uncooked	3.81 ± 0.97^{a}	ND	ND
			Cooked with FCS	2.98 ± 0.19^{a}	ND	ND
			Cooked without FCS	2.92 ± 0.17^{a}	ND	ND
	Black soy bean sauce	D	Uncooked	1.65 ± 0.13^{a}	ND	ND
			Cooked with FCS	1.46 ± 0.02^{a}	ND	ND
			Cooked without FCS	1.41 ± 0.13^{a}	ND	ND
	Tomato sauce	E	Uncooked	0.71 ± 0.16^{a}	ND	Trace[5)]
			Cooked with FCS	0.84 ± 0.11^{a}	ND	Trace
			Cooked without FCS	1.31 ± 0.11^{b}	ND	Trace

Values are shown as means ± standard deviations of 3 replicates.
Means in the same food sample with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
[1)] FCS: Food contact substance
[2)] PE: polyethylene
[3)] ND: Not detected
[4)] PP: polypropylene
[5)] Trace: < MQL

나, 조리 전 시료와 포장 채로 조리한 시료 간에는 유의미한 차이가 없었다. 카레와 자장은 조리 전 시료에서도 각각 3.81 ± 0.97 μg/kg, 1.65 ± 0.13 μg/kg의 함량을 보였으며 조리 전과 후에서 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 4). 소스는 분말 외에도 물, 양파, 당근, 감자, 고기 등의 재료를 넣고 끓인 제품이기 때문에 니트로사민 함량이 다른 식품보다 높게 검출된 것으로 추정된다. 선행연구에서 춘장과 자장의 바이오제닉 아민을 살펴본 결과 자장소스를 만드는 과정에서 바이오제닉 아민이 열분해됨을 확인하였다[30]. 춘장은 히스타민과 티라민이 많은 양 존재하며,

Table 5. Occurrences of three N-nitrosamines in instant noodles (*Ramyun*) which can be cooked with their packaging materials (Unit: μg/kg sample)

Material of FCS[1)]	Contained food	Company	Cooking water	Sample type	NDMA	NDEA	NDBA
PE[2)] coated papers	Instant noodles (*Ramyun*)	C	-	Uncooked	ND[3)]	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	Trace[4)]	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	Trace	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	Trace	ND	ND
		D	-	Uncooked	ND	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	0.39 ± 0.17^{a}	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	0.39 ± 0.19^{a}	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	0.55 ± 0.09^{a}	ND	ND
		F	-	Uncooked	ND	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	Trace	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	Trace	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	Trace	ND	ND
PS[5)]	Instant noodles (*Ramyun*)	C	-	Uncooked	ND	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	0.62 ± 0.16^{a}	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	0.78 ± 0.14^{a}	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	Trace	ND	ND
		F	-	Uncooked	ND	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	0.85 ± 0.18^{a}	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	0.93 ± 0.04^{a}	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	0.68 ± 0.14^{a}	ND	ND
		G	-	Uncooked	ND	ND	ND
			HPLC water	Cooked with FCS	0.87 ± 0.22^{a}	ND	ND
			HPLC water	Cooked without FCS	0.82 ± 0.26^{a}	ND	ND
			Tap water	Cooked with FCS	0.57 ± 0.21^{a}	ND	ND

Values are shown as means ± standard deviations of 3 replicates.
Means in the same food sample with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
[1)] FCS: Food contact substance
[2)] PE: polyethylene
[3)] ND: Not detected
[4)] Trace: < MQL
[5)] PS: polystyrene

니트로사민 생성과 관련이 깊은 푸트레신, 카다베린, 스퍼미딘, 스퍼민이 존재하였다. 자장에서는 히스타민과 푸트레신이 춘장에 비해 유의적으로 감소하였고 스퍼미딘과 스퍼민이 유의적으로 증가하였다. 또한 총 바이오제닉 아민이 춘장에서 자장으로 200도에서 조리하는 과정에서 70%이상 감소하는 것을 확인하였다[30)]. 따라서 자장으로의 조리과정에서 바이오제닉 아민이 분해되면서 니트로사민이 생성되었을 것이다. 레토르트 시료에서 포장 채로 조리한 것과 포장을 제거하고 조리한 것의 유의한 차이가 없었으므로 용기·포장에 의한 영향은 미미한 것으로 보인다.

컵라면 시료는 조리 전 모든 시료에서 NDMA가 검출되지 않았지만 조리 후 시료에서는 모두 trace~0.93 μg/kg로 검출됨을 확인할 수 있었다(Table 5). 그러나 모든 컵라면 그룹에서 용기 채로 HPLC용 물로 조리한 시료와 용기를 제외하고 HPLC용 물로 조리한 시료, 용기 채로 수돗물로 조리한 시료 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. ‘Noodle soup’에서 질산염이 조리 전, 후 모두 40~260 mg/kg dry, ‘Vegetable- noodle soup’에서 조리 전 150~680 mg/kg dry, 조리 후 160~610 mg/kg dry만큼의 질산염이 검출된 보고가 있다[31)]. 질산염이 환원된 아질산염은 니트로사민 생성의 전구체로서 컵라면에서의 니트로사민 생성을 설명할 수 있다. 라면 스프의 성분에는 여러 가지 맛 분

Table 6. Contents of NDMA in various combinations of noodles, seasonings, dehydrated vegetable, water (HPLC grade water) (Unit: μg/kg sample)

Noodle cup size	Small			Large		
Company	C	D	F	C	F	G
Uncooked	ND[2)]	ND	ND	ND	ND	ND
Cooked without FCS[1)]	trace[3)]	0.39 ± 0.19	trace	0.78 ± 0.14	0.93 ± 0.04	0.82 ± 0.26
Water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boiled Water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Noodle+boiled Water	ND	trace	trace	ND	ND	trace
Seasoning+boiled Water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Noodle+dehydrated vegetable+boiled water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Seasoning+dehydrated vegetable+boiled water	ND	ND	Trace	ND	ND	ND
Noodle+seasoning +boiled water	0.46 ± 0.19	0.42 ± 0.11	0.46 ± 0.14	Trace	Trace	Trace

Values are shown as means ± standard deviations of 3 replicates.
Water used for cooking was HPLC water.
[1)] FCS: Food contact substance
[2)] ND: Not detected
[3)] Trace: < MQL

말과 후춧가루, 고춧가루, 추출물분말 등이 함유되어있다. 건고추와 고춧가루에서 NDMA가 각각 1.37 μg/kg, 2.74 μg/kg이 검출되었다는 보고가 있다[32]. 조미료에서의 니트로사민 함량을 확인한 연구에서는 19개 시료 중 3개의 시료에서 각각 5, 5, 20 μg/kg의 NDMA가 검출되었다[33]. 이러한 연구는 컵라면에서의 니트로사민 생성요인이 분말스프일 가능성을 시사한다. Table 5를 살펴보면 C사와 F사의 폴리에틸렌 컵라면과 폴리스티렌 컵라면 동일사의 제품 간 NDMA 함량이 유의적인 차이를 보이는 것을 볼 수 있다. 그러나 폴리에틸렌과 폴리스티렌 그룹 각각 용기 채로 조리한 것과 그렇지 않은 시료 간의 유의적인 차이는 없었으므로 용기에서 이행된 니트로사민 차이 때문이라고 보기 어렵다. 이는 포장재에 표시된 원료명에서 설명될 수 있는데 폴리에틸렌 그룹과 폴리스티렌 그룹의 분말스프에 들어가는 성분이 차이가 있었음을 알 수 있었다. 따라서 폴리에틸렌과 폴리스티렌 그룹 간 차이는 각 컵라면별 제조과정의 차이에서 기인하였다고 추정된다. 컵라면 조리 시 NDMA 함량 증가의 원인을 분석하기 위해 조리된 컵라면을 구성하는 요소를 면, 분말스프, 건더기스프, 물로 나누고 가능한 조합들을 분석하였다.

컵라면 구성요소의 조합별 니트로사민 함량

가장 먼저 물에서 니트로사민이 오염되었을 가능성이 있기 때문에 조리수로 사용한 물을 분석하였다. 물에서의 니트로사민을 분석하기 위한 전처리는 일부 실험과정이 불필요하며 실험과정에서의 오염가능성을 방지하기 위해 저지방 시료의 전처리 방법에서 고체상지지액체추출 이후 SPE를 진행하지 않고 바로 농축하여 진행하였다. 조리수로 사용한 수돗물과 HPLC용 물을 '그대로'와 '끓인 물'로 나누어서 분석을 진행하였다. 분석한 결과 모든 물 시료에서 니트로사민 3종 모두 검출되지 않아 이후 HPLC용 물로만 실험을 진행하였다(Table 6). 따라서 물에서의 니트로사민 오염 가능성을 배제하고 '면', '분말스프', '면+건더기스프', '분말스프+건더기스프', '면+분말스프'의 가능한 조합을 조리하여 니트로사민 생성을 분석 비교해보았다.

시료는 용기에서 오는 요인을 배제하기 위해 용기를 제거하고 일반 조리 기구를 사용하여 진행하였다. 전처리는 면만 조리한 경우 저지방시료 전처리 방법을 따랐으며 그 결과 일부 제품에서 NDMA가 정량한계 미만으로 검출되었지만 조리된 컵라면에서의 함량 증가를 설명하기엔 부족하였다(Table 6). 분말스프만 조리한 시료도 물의 제거를 위해 저지방시료 전처리법을 따랐고, 분석 결과 모두 니트로사민이 검출 되지 않았다(Table 6). 건더기스프는 돼지고기와 파, 표고버섯, 당근, 청경채, 파프리카, 미역 등을 말린 것으로 이루어져있기 때문에 야채와 식육가공품에서의 니트로사민 오염이 되었을 가능성도 있다. 따라서 건더기스프를 조리한 시료의 분석이 불가피하였지만 건더기스프는 조리된 총 중량에서 차지하는 비율이 0.31~0.64%로 낮으며 시료에서 면과의 분리 및 균질화가 어려워 '면+건더기스프' 또는 '분말스프+건더기스프'를 각각 면 또는 분말스프만 조리한 시료와 비교하였다. 하지만 '면+건더

기스프', '분말스프+건더기스프' 모두 니트로사민이 검출되지 않았다. '면+분말스프'의 경우에는 컵라면 시료 6종에서 NDMA가 trace~0.46 μg/kg으로 검출되었다(Table 6). 6종 중 크기 및 중량이 큰 컵라면 3종은 구성요소 전체를 함께 조리하였을 때 '면+분말스프'의 경우보다 NDMA의 함량이 높았다. 따라서 컵라면 시료는 면과 분말스프를 함께 조리하였을 때 NDMA 함량이 증가하며 건더기스프도 NDMA 함량 증가에 일부 기여하는 것으로 보였다. 분말스프는 다양한 조미료가 혼합되어있는 형태로 선행연구에서 5건의 조미료에서 NDMA가 최대 13.48 μg/kg, NPIP가 최대 6.53 μg/kg, NPYR이 최대 6.48 μg/kg로 검출된 사례가 있다[29]. 이처럼 면과 조미료 단독의 경우에서 니트로사민의 오염가능성이 의심되었으나 본 연구에서 면과 조미료의 조리 전과 각각 물에 용해되었을 경우에 니트로사민이 검출되지 않았다. 하지만 면과 분말스프를 함께 조리하였을 때만 니트로사민 함량이 증가한 것으로 볼 때 니트로사민 생성의 전구체가 각각의 식품구성요소 내에 함유되어 있다가 조리 중 물에 용해되어서 반응물이 만나 반응이 진행되었을 것으로 추정된다. 따라서 각 구성요소 내의 질산염, 아질산염, 아민 등 니트로사민 전구체에 대한 검토가 필요하며 조리 중 가열에 의한 촉진여부를 확인하는 후속연구가 필요할 것으로 추정된다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처의 연구개발비(13162KFDA049)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 식품을 용기·포장 채로 조리하는 경우 니트로사민의 함량이 증가하는 사례에서 용기·포장에서의 니트로사민이 용출되는지 확인하였다. 조리를 할 수 있는 용기·포장 31종에 대해 각 식품 유형별로 침출용매를 선택하여 단면용출시험을 진행하였다. 용출 시험을 진행한 결과, 용기·포장에서는 NDMA, NDEA, NDBA가 모두 정량한계 미만으로만 검출되었다. 따라서 용기·포장물질에서 침출용매로의 용출은 미미하였고 침출용매가 아닌 특정 식품에 의한 차이가 있는지 확인하고자 하였다. 토마토소스를 제외한 레토르트 시료는 조리 전과 후의 유의적인 함량 차이가 없었으며 컵라면 시료의 경우는 모든 시료에서 조리 전 NDMA가 불검출되었지만 조리 후 NDMA 함량이 trace~0.93 μg/kg로 검출되었다. 컵라면의 NDMA 함량 증가 원인을 파악하기 위해 구성요소인 면, 분말스프, 건더기스프, 물을 면밀히 검토하였다. 그 결과, 면과 분말스프를 조합하여 조리한 경우에만 NDMA가 생성되었으며 폴리스티렌 제품의 경우 모든 구성요소를 함께 조리할 때보다는 NDMA 함량이 적게 검출되었다. 따라서 컵라면 시료는 면과 분말스프 내의 니트로사민 전구체가 NDMA 생성에 기여하는 것으로 추정되며 건더기스프도 NDMA 함량 증가에 기여하는 것으로 보였다. 따라서 각 구성요소 내의 전구체에 대한 검토가 필요하며 조리 중 가열에 따른 반응을 검토하는 후속연구가 필요할 것으로 추정된다.

References

1. Scanlan, R.A., Issenberg, P.: N-nitrosamines in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol*., **5**, 357-402 (1975).
2. Tricker A.R., Preussmann R.: Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat. Res*., **259**, 277-289 (1991).
3. Tricker A.R.: N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev*., **6**, 226-268 (1997).
4. Gray J.I., Dugan L.R.: Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci*., **40**, 981-984 (1975).
5. Rostkowska K., Zwierz K., Rózański A., Moniuszko-Jakoniuk J., Roszczenko A.: Formation and metabolism of N-nitrosamines, *Pol. J. Environ. Stud*., **7**, 321-325 (1998).
6. Wolff I.A., Wasserman A.E.: Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines. *Science*, **177**, 15-19 (1972).
7. Gangolli S.D., Brandt P.A. V. J. Feron, Janzowsky C., Koeman J.H., Speijers G.J.A., Spiegelhalder B., Walker R., Wishnok J.S.: Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur. J. Pharmacol*., **292**, 1-38 (1994).
8. Wainright T.: The chemistry of nitrosamine formation: Relevance to malting and brewing. *J. Inst. Brew*., **92**, 49-64 (1986).
9. Santos M.H.S.: Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiology*, **29**, 213-231 (1996).
10. Cappillas C.R., Colmenero F.J.: Biogenic amines in meat and meat products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., **44**, 489-499 (2004).
11. Bulushi I.M.A., Poole S., Deeth H.C., Dykes G.A.: Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., **49**, 369-377 (2009).
12. Gough T.A., Webb K.S., Coleman R.F.: Estimate of the volatile nitrosamine content of UK food. Nature, **272**, 161-163 (1978).
13. Scanlan, R.A., Barbour, J.F., Hotchkiss, J.H., Libbey, L.M.: N-nitrosodimethylamine in beer. *Food Cosmet. Toxicol*., **18**, 27-29 (1980).
14. Yamamoto M., Iwata R., Ishiwata H., Yamada T., Tanimura A.: Determination of volatile nitrosamine levels in foods and estimation of their daily intake in Japan. *Food Chem. Toxicol*., **22**, 61-64 (1984).
15. Mavelle, T., Bouchikhi, B., Debry, G.: The occurrence of volatile N-nitrosamines in French foodstuffs. *Food Chem*., **42**, 321-338 (1991).
16. Mitacek E.J., Brunnemann K.D., Suttajit M., Martin N., Limsila T., Ohshima H., Caplan L.S.: Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in

Thailand: Volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem. Toxicol*., **37**, 297-305 (1998).
17. Yurchenko S., Mölder U.: The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chem*., **100**, 1713-1721 (2007).
18. Jo, C.H., Park, H.R., Kim, D.S., Lee, K.H., Kim, M.H.: Exposure assessment of N-nitrosamines in foods. *Food Sci. Biotechnol*., **5**, 541-548 (2010).
19. Park J.E., Seo J.E., Lee J.Y., Kwon H.J.: Distribution of Seven N-nitrosamines in food. *Toxicol. Res*., **31**, 279-288 (2015).
20. Li L, Wang P., Xu X., Zhou G.: Influence of various cooking methods on the concentrations of volatile N-nitrosamines and biogenic amines in dry-cured sausages. *J. Food Sci*., **77**, 560-565 (2012).
21. Korea Agro-Fisheries and Food Trade Corporation: Food industry and issues outlook part 4. (2016).
22. Pensabene J.W., Fiddler W., Gates R.A.: Nitrosamine formation and penetration in hams processed in elastic rubber nettings: N-nitrosodibutylamine and N-Nitrosodibenzylamine. *J. Agric. Food Chem*., **43**, 1919-1922 (1995).
23. Sen N.P., Kushwaha S.C., Seaman S.W., Clarkson S.G.: Nitrosamines in baby bottle nipples and pacifiers: Occurence, migration, and effect of infant formulas and fruit juices on in vitro formation of nitrosamines under simulated gastric conditions. *J. Agric. Food Chem*., **33**, 428-433 (1985).
24. Hotchkiss J.H., Vecchio A.J.: Analysis of direct contact paper and paperboard food packaging for N-nitrosomorpholine and Morpholine. *J. Food Sci*., **48**, 240-242 (1983).
25. Seo J.E.: Method development for determining seven N-nitrosamines and its application to agricultural food products. Master's Dissertation, Seoul National University Graduate (2016).
26. Korea Food and Drug Administration: Standards and specifications for food utensils, containers and packages. 2014-27 (2014).
27. Korea Food and Drug Administration: Guidelines on migration test from containers and packages (2013).
28. Seo J.E., Park J.E., Lee J.Y., Kwon H.J.: Determination of seven N-nitrosamines in agricultural food matrices using GC-PCI-MS/MS. *Food Anal. Methods*, **9**, 1595-1605 (2016).
29. Park J.E., Seo J.E. Lee J.Y., Kwon H.J.: Distribution of seven N-nitrosamines in food. *Toxicol. Res*., **31**, 279-288 (2015).
30. Bai X., Byun B.Y., Mah J.H.: Formation and destruction of biogenic amines in *Chunjang* (a black soybean paste) and *Jajang* (a black soybean sauce). *Food Chem*., **141**, 1026-1031 (2013).
31. Garcia-mata M., Bosch-bosch N., Perez-rodriguez M.L.: Effect of cooking on nitrate in dehydrated soups. *Int. J. Food Sci. Technol*., **30**, 45-48 (1995).
32. Tricker A.R., Siddiqi M., Preussmann R.: Occurrence of volatile N-nitrosamines in dried chillies. *Cancer Lett*., **38**, 271-273 (1988).
33. Gough T.A., Goodhead K.: Occurrence of volatile nitrosamines in spice premixes. *J. Sci. Food Agri*., **26**, 1473-1478 (1975).