

## 주류 중 에틸카바메이트 분석

박성국\* · 윤태형 · 최동미

식품의약품안전청, 신중유해물질팀  
(2007. 9. 4. 접수, 2007. 11. 12. 승인)

### Analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages

Sung-Kug Park\*, Taehyung Yoon and Dongmi Choi

New Hazard Chemicals Team, Korea Food & Drug Administration

(Received September 4, 2007; Accepted November 12, 2007)

**요 약:** 주류 중 에틸카바메이트의 함량을 조사하기 위해 시중에 유통되는 시료를 고체상 정제컬럼(충진제: 규조토)에 흡착시켜 디클로로메탄으로 용출시킨 후 GC/MS-SIM 방법에 의해 분석하였다. 적용된 분석법의 회수율은 85.2-87.9% 이었으며 변이계수는 0.7-1.9%, 검출한계는 2 µg/kg, 정량한계는 10 µg/kg이었다. 에틸카바메이트의 함량을 조사한 결과는 대상 주류의 유형에 따라 검출수준에 차이를 나타냈으며, 평균 검출수준은 리큐르 194 µg/kg, 과실주 105 µg/kg, 일반증류주 62 µg/kg, 청주 28 µg/kg, 약주 15 µg/kg, 기타 주류 12 µg/kg, 소주 불검출 이었다.

**Abstract:** In order to survey the contents of ethyl carbamate in alcoholic beverages, GC/MS-SIM method was used after extraction with dichloromethane in solid phase extract cartridge contained alcoholic beverages. In the applied GC/MS-SIM method, the values of recoveries and relative standard deviation were ranged from 85.2% to 87.9% and from 0.7% to 1.9%, the limit of detection and quantification were 2 µg/kg and 10 µg/kg. Depending on alcoholic beverage kinds, the levels were variable and the average level was 194 µg/kg for liquor, 105 µg/kg for fruit wine, 62 µg/kg distilled spirit, 28 µg/kg for sake, 15 µg/kg for yakju, 12 µg/kg for other alcohol beverages, ND for soju, respectively.

**Key words:** ethyl carbamate, alcoholic beverages, GC/MS

### 1. 서 론

에틸카바메이트는 무취의 백색결정형으로 아미노수지 제조시의 중간체, 살충제, 훈연제 및 화장품 등의 용해제로 오래 전부터 산업계에서 널리 사용되고 있

을 뿐만 아니라, 의약품으로 사람의 만성 과립성 백혈병 및 만성 임파성 백혈병의 화학 요법제, 수면제, sulphonamide의 첨가제로 사용된 바 있으며 지금까지도 각종 실험동물의 마취제로 사용되고 있다.<sup>1</sup> 실험동물에 대한 에틸카바메이트의 독성연구결과에 의하면

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-380-1665 Fax : +82-(0)2-382-4892

E-mail : skpark7@kfda.go.kr

물과 유기용매에 잘 녹는 수용성 물질로 체내에 흡수되어 간장에 존재하는 P450 2E1에 의해 vinyl carbamate로 대사된 후 다시 P450 2E1에 의해 vinyl carbamate epoxide로 전환되어 DNA, RNA 및 단백질 등의 분자와 adduct를 형성하여 암을 유발시키는 것으로 보고되었다.<sup>2</sup> 국제암연구소 IARC<sup>3,4</sup> (International Agency for Research on Cancer)에서는 1974년에 실험동물에 잠재적 발암가능성이 있는 물질로 분류하였으며, 최근에는 인체 발암 증거가 제한적이거나 부정확하고 실험동물의 발암증거는 충분하므로 인체에 대해 발암 가능성이 있는(probably carcinogenic to human) 2A group 으로 분류하였다. 식품 중에 에틸카바메이트는 1976년에 Ough의 연구결과<sup>5</sup>에 의해 발효과정 중 자연 생성되는 부산물로 발효 식품 및 주류 등에 존재한다고 밝혀졌으며, 주류 중 에틸카바메이트는 효모의 arginine 분해 효소에 의해 생성된 요소와 cyanate, citrulline, carbamyl phosphate가 에탄올과 반응하여 생성한다고 하였다. 또한, 주류 중의 에틸카바메이트에 대한 연구결과에 의하면 자두, 살구, 체리 등의 과실을 원료로 한 과실주에서 400 µg/kg이상의 농도로 검출되었으며, 이는 diacetyl이 cyanide와 반응하여 에틸카바메이트가 생성되는 것으로 보고하였다.<sup>6</sup>

이후, 캐나다정부에서 1985년에 유통 중인 주류에서 에틸카바메이트 함량을 조사한 결과 씨가 있는 과일(자두, 복숭아, 체리 등)을 원료로 한 과실주에서 에틸카바메이트가 높게 검출됨을 언론에 발표하면서 국제적으로 이슈화가 되었다.<sup>7</sup> 주류 중 에틸카바메이트를 검출하기 위한 방법으로 Walker 등은 GC/FID, GC/AFID, GC/HECD 분석법을 조사하였으나 극미량 존재하는 에틸카바메이트를 분석하는 데는 적합하지 않은 것으로 결론 내렸다.<sup>8</sup> Joe 등은 GC 분석법을 개선하여 10 µg/kg까지 검출 한계를 높였으나 GC/MS 분석법에 정성 및 정량을 확인하는 절차를 밟아야 하는 문제점이 있었다.<sup>9</sup> 보고된 신뢰성 있는 주류 중 에틸카바메이트 분석법으로 GC/MS<sup>10</sup>에 의한 분석법 및 GC/MS/MS<sup>11</sup> 등을 사용하여 분석하기도 하였다. 주류를 포함한 발효식품 중 에틸카바메이트의 추출에 대한 연구는 시료를 균질화 하여 디클로로메탄, 클로로포름, 에테르 등의 용매로 추출하거나 규조토가 함유된 상업용 cartridge에 시료를 흡착시켜 용출시키는 연구가 보고되었다.<sup>12-15</sup> 그리고, 추출 후 시료에 색소나 비극성물질이 방해물질로 잔존하는 경우에는 alumina 또는 florosil의 정제과정을 거치기도 한다. 이중 용매를 사용한 직접 추출법은 매우 노동집약적이며 시료

에 함유된 극미량의 에틸카바메이트를 분석하기 위해 다량의 추출용매를 사용하는 단점이 있는 것으로 보고되었다.<sup>16-17</sup>

본 연구에서는 주류 중 에틸카바메이트의 함량을 조사하기 위해 고체상 정제컬럼(충진제: 규조토)의 용출조건, GC/MS-SIM 분석조건을 확립한 후 시중에 유통되는 주류 31종을 분석하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

디클로로메탄과 물은 Merck Inc. (Darmstadt, Germany)에서 HPLC급을 구매하여 사용하였고 HPLC급 아세톤과 무수 알코올은 Wako pure chemical industries Ltd. (Japan)와 J.T.Baker (Pilipsburg, NJ, USA)에서 각각 구매하였다. 액액추출용 정제 컬럼은 규조토가 충전된 Chem Elut(용량 50 mL)를 Varian Co. (Harbor City, CA, USA)에서 구매하여 사용하였다. 에틸카바메이트와 내부표준물질로 사용한 부틸카바메이트는 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 그리고, 사용된 용매는 에틸카바메이트의 특징이온 m/z 62, 74 및 89 피크가 없는 것을 확인하였으며, 특히 디클로로메탄은 200배 농축 후 확인하여 사용하였다.

### 2.2. 기기

에틸카바메이트의 정성 및 정량을 위해 질량분석기(Quadrupole MS/MS, Model: 1200L, Varian, Harbor City, CA, USA)가 장착된 기체크로마토그래피(Gas Chromatography, Model: CP-3800, Varian, Harbor City, CA, USA)를 사용하였다. 분석컬럼은 DB-WAX (30 m×0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness)를 사용하였고 이온원에 직접 연결하고 운반가스는 헬륨(99.999%)을 사용하여 운반속도를 0.9 mL/min의 유속으로 흘려주었으며 transfer line 및 ion source 온도는 230°C로 하였다. 오븐온도는 40°C에서 시료를 주입하고 0.75분간 유지하고 10°C/분으로 60°C까지 승온하고 3°C/분으로 150°C까지 승온하여 5분 이상 유지하였다(연속분석을 위하여 220°C에서 4.25분 이상 유지하였다.) 시료 주입방법은 비분할(splitless)법을 사용하였고 주입구의 온도는 180°C이고 선택이온질량(m/z: 62, 74, 89)을 사용하여 검출하는 selected ion monitoring (SIM)방법으로 정량하였다.

## 2.3. 실험방법

### 2.3.1. 표준용액의 제조

표준용액은 표준물질을 아세톤에 녹여 1000 µg/mL의 표준원액을 제조한 후 아세톤을 가해 10 µg/mL가 되도록 하여 사용하였으며, 내부표준용액은 부틸카바메이트 표준품을 아세톤에 녹여 1000 µg/mL의 표준원액을 제조한 후 아세톤을 가해 10 µg/mL가 되도록 하여 표준용액으로 사용하였다. 그리고, 내부표준용액에 물을 가하여 400 ng/mL가 되게 하여 시험용액 조제시 첨가하여 내부표준첨가용액으로 사용하였다.

### 2.3.2. 시료

시중에 유통되는 과일주(11종), 소주(6종), 일반증류주(5종), 청주(3종), 약주(3종), 리큐르(2종), 기타 주류(1종)으로 총 31종을 수거하여 사용하였다.

### 2.3.3. 검정곡선의 작성

표준용액과 내부표준용액에 디클로로메탄을 가해 내부표준물질 농도는 400 ng/mL로 하고 표준물질은 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/mL의 6개 농도로 검량곡선 표준용액을 제조하여 정량을 위해 사용하였다. 검정곡선은 검량곡선 표준용액에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 m/z 62의 피크에 대한 면적비[A<sub>S</sub>/A<sub>IS</sub>]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량곡선을 작성하고 시험용액의 면적비[A<sub>SAMS</sub>/A<sub>SAMIS</sub>]를 Y축에 대입하여 에틸카바메이트의 농도를 계산하였다.

### 2.3.4. 시료의 추출

검체 5 g를 비이커에 정밀히 달아 내부표준첨가용액 1 mL을 첨가하고 물을 가해 40 g이 되게 한 후 정제컬럼에 넣은 후 물 10 mL로 비이커의 잔류물을 씻어 정제컬럼으로 옮겼다. 이후, 4분간 정치하여 흡착시킨 후 디클로로메탄 80 mL로 2회 용출하였다. 용출액을 플라스크에 모아 30 °C의 수욕조에서 2-3 mL까지 감압농축 하였다. 농축액을 파스퇴르 피펫을 이용하여 눈금이 있는 KD 수기로 옮기고 플라스크에 남아있는 농축액을 1 mL 디클로로메탄으로 2회 되풀이하여 씻어 옮긴 후, 질소 하에서 1 mL로 정확히 농축하여 기체크로마토그래프의 시험용액으로 하였다.

### 2.3.5. 회수율 측정

회수율을 측정하기 위하여 40% 에탄올에 표준물질을 15, 150, 300 ng/g 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 분석하였다. 위의 과정을 3회 반복하여 회수율과

변이계수(CV)를 계산하여 정확도와 정밀도를 측정하였다. 그리고, 검출한계는 S/N비가 3일 때로 계산하였으며 정량한계는 S/N비가 10일 때로 계산하였다.

## 3. 결과 및 고찰

시중에 유통되는 시료에 적용하여 잔류실태를 조사하기 위해 시료를 정제컬럼에 넣어 흡착시킨 후 디클로로메탄으로 용출하여 감압농축시켜 GC/MS로 분석한 표준물질 및 시료에 대한 에틸카바메이트의 크로마토그램 및 질량스펙트럼은 Fig. 1~Fig. 3와 같다. 에틸카바메이트는 분자량이 89인 비교적 작고 극성이 높은 물질로 액상 시료인 주류에서는 별도의 균질화 과정이 없이 직접 시료를 정제컬럼에 흡착시킨 후 방해물질을 제거하여 디클로로메탄으로 정제컬럼을 통해 시료 중의 에틸카바메이트를 용출하여 분석하였다. 이렇게 하여 얻어진 시료의 이온크로마토그램은 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 에틸카바메이트와 다른 방해물질의 피크가 있음에도 불구하고 잘 분리되어 있음을 알 수 있으며 분석시간도 전처리 과정이 복잡하지 않아 시간이 절약되는 경제적인 장점이 있었다. 검출은 SIM (single ion monitoring) 방식으로 선택이온

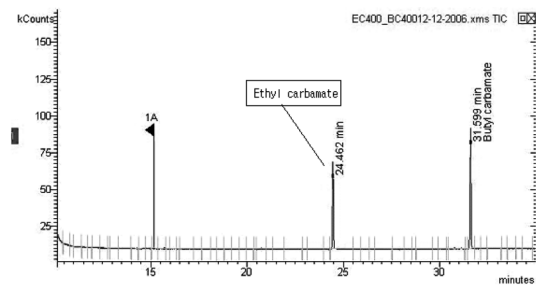


Fig. 1. GC/MS chromatogram of standard and internal standard.

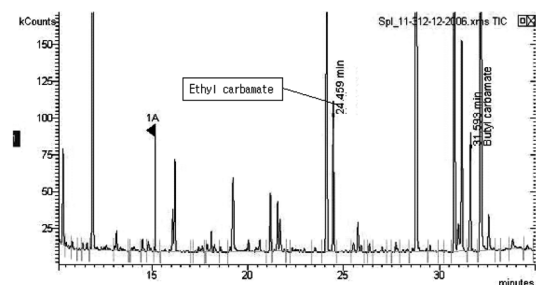


Fig. 2. GC/MS chromatogram of ethyl carbamate in a alcoholic beverage.

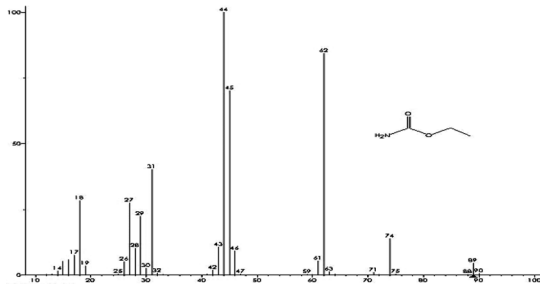


Fig. 3. Typical mass spectrum of ethyl carbamate.

질량( $m/z$ : 62, 74, 89)을 사용하였으며 시험용액의 에틸카바메이트 선택이온의 상대비를 표준물질의 선택이온과 비교하여 그 비율이  $\pm 20\%$  범위일 때 에틸카바메이트가 존재하는 것으로 정성확인하고 정량은 선택이온 중  $m/z$  62를 이용하였다.

검량선 작성을 위하여 표준물질 6개 농도범위(50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/g)에서 측정·분석한 결과 상관계수  $R^2$ 는 0.9981인 직선성을 나타내어 매우 만족할 만한 수준이었다. 검출한계는 신호대 잡음비 3이상에서  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이었고 정량한계는  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 로 알콜음료 중 미량의 에틸카바메이트를 분석하는 데 적합한 수준이었다. 분석방법의 회수율을 측정하기 위하여 40% 에탄올에 표준물질을 15, 150, 300 ng/g 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 분석하였다. 회수율 측정결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 전체 회수율은 85.2~87.9%이고 변이계수(CV)는 0.7~1.1%로 정확도와 정밀도가 만족할 만한 수준이었다. 그리고, 확립된 시험법을 적용하여 시중에 유통되는 주류에 대해 4회 반복하여 재현성 시험을 측정한 결과 변이계수(CV)는 2.9%로 만족할 만한 결과를 얻었다(Table 2).

본 시험에 사용한 주류의 에틸카바메이트의 잔류실태조사 결과는 Table 3와 같이 대상 주류의 유형에 따라 검출 수준에 차이가 있었으며, 이는 원료 및 발효 방식에서 기인한 것으로 판단된다. 리큐르는 157~230  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (평균수준 194  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 과일주 불검출~549

Table 1. Recoveries of ethyl carbamate in the spiked 40% ethanol samples by GC/MS (n=3)

Spiked ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Found ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)	CV (%)
15	13.2	87.8	1.9
150	131.8	87.9	0.7
300	255.5	85.2	1.1

Table 2. Result of reproducibility in the alcoholic beverage sample

Test No.	Result ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1	151.3
2	149.2
3	152.8
4	154.2
Average	153.7
CV(%)	2.9

Table 3. Levels of ethyl carbamate in the alcoholic beverages (n=3)

Sample	No.	Levels ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
		Min	Max	Mean
distilled spirit	5	- <sup>1)</sup>	196	62
fruit wine	11	- <sup>1)</sup>	549	105
yakju	3	- <sup>1)</sup>	45	15
soju	6	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>
sake	3	- <sup>1)</sup>	60	28
liquor	2	157	230	194
others	1	12	12	12

1) - : not detected

$\mu\text{g}/\text{kg}$  (평균수준 105  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 일반증류주 불검출~196  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (평균수준 62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 청주 불검출~60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (평균수준 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 약주 불검출~5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (평균수준 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )이었다. 그리고 기타 주류는 1개에서 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이 검출되었으며 소주의 경우는 모두 불검출이었다. 본 연구결과는 씨가 있는 과실을 원료로 한 과일주에서 에틸카바메이트가 높게 검출되어 1985년 캐나다에서 조사한 결과<sup>7</sup>와 유사하였으나 과일주의 검출범위(불검출~549  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )는 캐나다의 검출범위(30~4330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )보다 낮은 수준이었다. 그리고, 리큐르가 다른 주류에 비해 높게 에틸카바메이트가 높게 검출된 것은 우리나라의 리큐르인 경우는 발효한 증류주에 과일추출액 등을 첨가하여 제조되어 높게 검출된 것으로 사료된다. 다른 주류의 검출수준은 박 등이 보고<sup>18</sup>한 우리나라 전통주 등에서의 에틸카바메이트 검출범위(4.6~50.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )와 유사한 수준이거나 낮은 수준이었다. 2005년 64차 JECFA 보고서<sup>19</sup>에 의하면 식품으로부터 인체에 노출되는 에틸카바메이트의 수준은 안전한 것으로 보고되었다.

우리나라를 비롯한 국제식품규격위원회인 Codex 등 국제기구나 미국 등의 선진국에서는 식품 중 에틸카바메이트의 최소화를 위해 지속적인 잔류실태조사

및 저감화 연구를 병행하고 있어 본 연구에서 확립된 알콜음료 중 에틸카바메이트 분석법은 향후 에틸카바메이트 잔류실태조사를 수행하는 데 있어 간편하고 신뢰성이 확보된 분석방법으로 사료된다.

#### 4. 결 론

주류 중 에틸카바메이트 분석법을 확립하기 위해 시료를 고체상 정제컬럼(충진제: 규조토)에 흡착시켜 디클로로메탄으로 용출시킨 후 농축하여 GC/MS-SIM 방법에 의해 정성 및 정량을 하였으며, 확립된 분석조건을 이용하여 시중에 유통되는 주류에 대한 에틸카바메이트의 함량을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

확립된 분석법의 정확성 및 정밀성을 확인한 결과, 6개의 표준용액 농도범위에서 상관계수  $R^2$ 는 0.9981로 양호한 직선성을 보였으며 회수율 및 변이계수(CV)는 각각 85.2~87.9%, 0.7~1.9%이었다. 시료에 대한 재현성은 변이계수(CV)가 2.9%로 매우 만족할 만한 결과를 얻었다.

본 분석법의 검출한계는 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  및 정량한계는 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 였으며 조사대상 주류의 유형에 따른 에틸카바메이트의 평균 검출수준은 리큐르 194  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 과실주 105  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 일반증류주 62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 청주 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약주 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 기타 주류 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 소주 불검출로 제외국의 결과와 유사하거나 낮은 안전한 수준이었다.

#### 참고문헌

1. K. J. Field and C. M. Lang, *Lab. Anim.*, **22**, 255-262 (1988).
2. S. S. Mirvish, *Advances in Cancer Research*, **11**, 1-42(1968).
3. *IARC Monographs*, **7**, 111-140(1974).
4. *IARC Monographs*, **96**(2007).
5. C. S. Ough, *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 323-328(1976).
6. R. Battaglia, H. B. S. Conacher and B. D. Page, *Food additives and Contaminants*, **4**, 477-496(1986).
7. H. B. S. Conacher and B. D. Page, *Proceedings of Euro Food Tox. II, Interdisciplinary Conference on Natural Toxicants in Food, Zurich*, 237-242(1986).
8. G. Walker, W. Winterlin. H. Fouda and J. Seiber, *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 944-947 (1974).
9. 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**(3), 509-516(1977).
10. *AOAC Official Methods of Analysis, 17th ed.*, 14-15(2000).
11. D. W. Lachenmeier, W. Frank and T. Kuballa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 108(2005).
12. Y. Hasegawa, Y. Nakamura, Y. Tonogai, S. Terasawa, Y. Ito and M. Chiyama, *J. Food Prot.*, **53**, 1058(1990).
13. C. Fauhl and R. Catsburg, *Food. Chem.*, **48**, 313-316(1993).
14. C. Fauhl and R. Wittkowski, *J. High-Resol. Chromatogr.*, 203-205(1992).
15. B. J. Canas, D. C. Havery, L. R. Robinson, M. P. Sullivan, F. L. Joe and G. W. Diachenko, *J. AOAC*, **72**(6), 873-876(1989).
16. B. J. Canas, F. L. Joe, G. W. Diachenko and G. Burns, *J. AOAC*, **77**(6), 1530-1536(1994).
17. R. H. Dyer, *J. AOAC Int.*, **77**(1), 64-66(1994).
18. G. B. Park and S. G. Lee, *Anal. Sci. Tech.*, **15**, 26-30 (2002).
19. 64th FAO/WHO JECFA Report(2005).