

발효식품에서 N-Nitrosamine
생성에 영향을 미치는 요인

指導教授 : 김 정 목

이 論文을 學士學位 論文으로 提出함.

목포대학교 공과대학 식품공학과

2011년 12월

박 경 회

木浦大學校 工科大學 食品工學科
박 경 회

지도교수 김정목

上記者의 學士學位 論文을 認准함.

2011년 12월

2011년 12월

審 查 委 員 主 審 김 정 목 인

목 차

참고문헌28

I. 서론1

II. 이론적 고찰3

1. Nitrosamine의 종류 및 특성3

2. Nitrosamine의 생성메커니즘6

3. Nitrosamine의 독성7

4. Nitrosamine의 노출경로 및 발생원8

5. Nitrosamine의 분석방법11

III. 재료 및 방법16

1. 분석대상 시료의 선정과 보관16

2. 시료 전처리 방법16

3. 위해성 평가17

IV. 결과 및 고찰20

1. 발효식품 중 질산염 및 아질산염 질소의 함량20

2. 발효식품 중 DMA 및 TMA 질소의 함량20

3. 발효식품 중 NA 의 함량21

1) 김치 중의 NA21

2) 젓갈류 중의 NA21

3) 장류 중의 NA22

4. 인공소화시 NA의 생성에 영향을 미치는 인자22

V. 적요26

I. 서론

식품의 제조·가공 중 비의도적으로 생성되는 유해물질로는 다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons:PAHs), 헤테로고리아민(heterocyclic aromatic amines:HCAs),에틸카바메이트(ethyl carbamate:EC), 아크릴아마이드 (acrylamide:AA),퓨란(tetrahydrofuran), 니트로사민(N-nitrosamines, NAs) 등이 있고 이들 물질은 국제암기구인 IARC(international agency for research on cancer)에서 발암성 물질로 분류하고 있다.

특히, 니트로사민은 식품 중에 존재하는 아민과 아질산염이 일정조건하에서 생성되는 물질로 국제암기구(IARC)에서 발암 추정 또는 발암 가능물질로 분류된 발암성 물질로 위암 발생에 기여하고 있다.¹⁾

1957년 노르웨이에서 방부제로서 아질산나트륨을 첨가하여 만든 어분을 먹은 후 가축들이 급성간장장애를 일으켜 집단적으로 폐사한 사건이 일어났으며, 이 사건이 동기가 되어 N-nitrosamine(NA)이 식품위생상 관심의 대상이 되었다. 그 후 이들 가축의 사인이 어분에 존재하는 dimethylamine(DMA)과 방부제로 첨가한 아질산나트륨과의 상호반응에 의해 생성된N-nitrosodimethylamine (NDMA)임이 밝혀지고²⁾ NDMA가 강력한 발암물질로 보고된 이래,^{3, 4)} 병리학적 및 생화학적인 측면에서 니트로소 화합물에 관한 연구가 활발하게 이루어졌다.

40여종의 동물 실험에서 약 300종의 니트로소 화합물중 90%이상이 암을 일으켰으며^{5, 6)} 사람의 경우에도 토끼, 쥐 및 돼지 등을 이용한 동물 실험과 유사한 결과를 보였다⁷⁾. 이러한 NA의 발암기전에 대하여 Lijinsky⁸⁾는 대부분의 NA가 체내에서 diazoalkane (CnH2 n-N2)으로 변하여 핵산이나 단백질 또는 세포내 성분을 알킬화 함으로써 발암작용을 나타내고 NA 중 어떤 것 (N-nitrosodibutylamine)은 알킬화에 의하지 않고 lactone과 같은 산화형 변형체에 의해 직접 발암작용을 일으킨다고 하였다.

NA의 전구물질의 하나인 아민류는 어패류에 그 함량이 높고^{9, 10)} 곡류를

발아시킬 때에도 dimethylamine(DMA) 과 같은 제 2급 아민 혹은 제 3급 아민류(TMA, hordenine, gramine) 등이 생성된다.^{11, 12)}

NA는 주로 제 2급 아민이 생성모체가 된다고 생각하였으나 제 3급 아민 및 제 4급 암모늄 화합물에서도 NA가 생성된다는 것이 밝혀지게 되었다.¹³⁾

아민류 외에 또 다른 전구물질인 질산염 및 아질산염은 양배추, 상추, 무 및 시금치 등의 채소류에 특히 함량이 높고¹⁴⁾ 질산염은 식물 중에도 함유되어 있고 어떤 지방에서는 10µg/l를 초과한다는 보고도 있다.¹⁵⁾

아질산염은 식품의 가공·저장 중에 제품의 풍미향산, Clostridium botulinum 포자의 생육억제 및 지방의 산패방지 등의 목적으로 널리 이용되고 있으며 음료수나 타액 등에도 미량으로 존재한다.¹⁶⁾ 한편 질산염은 섭취 후 타액으로 분비되며 이것은 구강 내에 존재하는 세균에 의해 아질산염으로 환원되어 위내로 재공급된다.¹⁷⁾ NA의 생성에 적당한 pH는 3~4이며 사람의 위내 pH가 1~4범위이므로 위내에 이들 전구물질이 공존할 경우 인체 내에서 NA의 생성가능성이 높다.

발효식품 중 NA에 관한 연구로는 최¹⁸⁾, 신¹⁹⁾ 과 김과 이²⁰⁾가 김치숙성 중 질산염 및 아질산염의 함량변화와 NA의 생성에 대하여, 김 등²¹⁾은 김치숙성 중 제 2급, 제 3급 아민 및 제 4급 암모늄 화합물의 함량변화와 NA의 생성에 대하여, 김²²⁾은 밀치 및 새우젓 숙성중 아질산염과 아스코르브산이 NA의 생성에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 장류에 관한 연구로는 성 등²³⁾의 한국 재래식 간장의 니트로소 화합물과 NA의 생성에 영향을 미치는 인자에 대한 보고와 성 등²⁴⁾의 청국장 발효 중 질소화합물의 변화에 대한 연구가 있다. 알코올 음료에 대하여서는 국내산 및 수입맥주, 청주, 막걸리, 위스키, 소주 및 침출주 등의 NA를 분석한 연구가 있다.

따라서, NA의 전구물질인 DMA, TMA 및 TMAO 와 같은 아민류를 분석 하였고, 질산염 및 아질산염이 어떻게 오염되어 NA를 생성하는가를 추적하였다.

II. 이론적 고찰

1. NA의 종류 및 특성

300여종이 넘는 니트로사민은 휘발성과 비휘발성으로 나뉘는데 분석항목은 발암성, 국내·외 검출빈도, 그리고 측정 목적에 따라 선정하였다. 휘발성 니트로사민은 기체 크로마토그래피(GC)로 분석되며, 비휘발성 니트로사민은 액체 크로마토그래피(HPLC)로 분석된다. 휘발성과 비휘발성 니트로사민의 뚜렷한 구분은 없지만 니트로사민의 구조적 형태에 따라 N-nitrosodialkyl amine, cyclic & heterocyclic N-nitrosamine 은 보통 휘발성 그룹에 속한다.

본 연구에서의 대상물질은 국내·외 식품 중 검출빈도가 높고 기체 크로마토 그래피를 사용하여 분석이 용이한 N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosodipropylamine (NDPA), N-nitroso dibutylamine (NDBA), N-nitrosopyrrolidine (NPYR), N-nitrosopiperidine(NPIP), N-nitrosomorpholine (NMOR) 7종의 니트로사민이다.

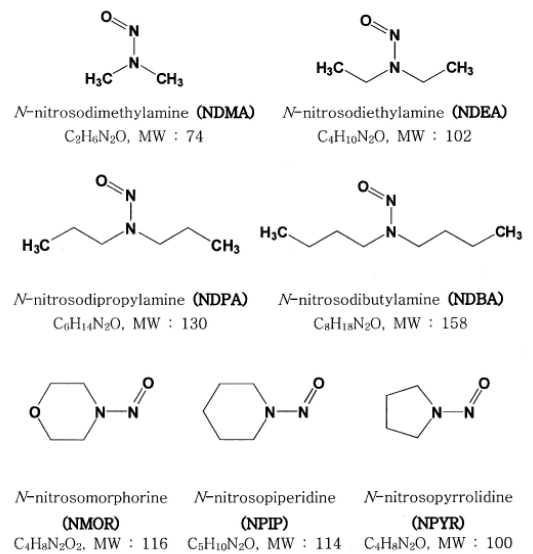


Fig. 1. Chemical structures of target N-nitrosamines.

Table 1. Physico-chemical properties of *N*-nitrosamines

Abbrev. MF MW	Physicochemical properties				IARC
	Appearance	WS	log K _{ow}	Vapour pressure (mm Hg)	
NDMA C ₂ H ₅ N ₂ O 74	Yellow liquid	1,000	-0.57	2.7×10 ⁰	2A
NDEA C ₄ H ₁₀ N ₂ O 102	Slightly yellow liquid	106	0.48	8.6×10 ⁻¹	2A
NDPA C ₆ H ₁₄ N ₂ O 130	Liquid Vaporizing press. : 997.5 mmHg at 31°C	13	1.36	3.9×10 ⁻¹	2B
NDBA C ₈ H ₁₈ N ₂ O 158	Yellow liquid	1.3	2.63	4.7×10 ⁻²	2B
NMOR C ₄ H ₈ N ₂ O ₂ 116	Yellow crystal Melting point : 29°C	862	-0.44	3.6×10 ⁻²	2B
NPIP C ₈ H ₁₀ N ₂ O 114	Light yellow oil	76	0.36	1.4×10 ⁻¹	2B
NPYR C ₄ H ₈ N ₂ O 100	Yellow liquid	1,000	-0.19	6.0×10 ⁻²	2B

2. 생성 메커니즘

니트로사민은 단백질 식품에 존재하는 아민과 단백질이 조리 중에 분해되어 생긴 아민이 육색고정, 풍미증진, 보툴리눔균(*clostridium boulinum*) 독소생성 억제, 지방의 산패 방지를 위해 첨가하는 질소화합물(아질산염)과 반응하여(nitrosation, 니트로소화) 생성되는 물질이다(Shuker, 1988, Fig. 2).

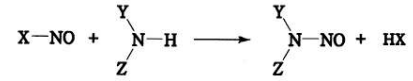


Fig. 2. The general *N*-nitrosation reaction.

니트로소화를 만드는 데 있어 출발점은 아질산(HNO₂)을 만들기 위한 양성자(H⁺ or H₃O⁺)와 아질산 이온(NO₂⁻)과의 반응이다. 이 반응은 니트로소화 작용제를 만드는 방법 중 가장 오래되었고 생체 내 특히, 산성 조건하에 있는 위장에서 니트로소화 작용제의 형성을 설명하는 제일의 모델이 된다. 결과적으로는 단순하지만 복잡한 반응이다.

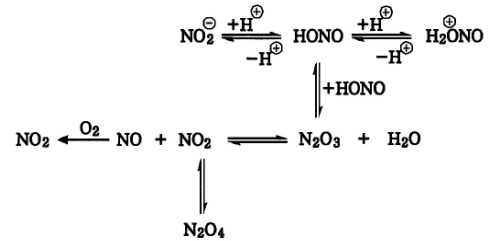


Fig. 3. Formation of nitrous acid and subsequent reactions.

식품 및 환경에서 니트로사민의 생성 메커니즘은 Fig. 3과 같이 아질산이온(NO₂⁻)과 수소이온(H⁺ 또는 H₃O⁺)이 반응하여 생성되는 H₂O+NO (nitrous acidium ion), N₂O₃ (dinitrogen trioxide), N₂O₄ (dinitrogen tetraoxide) 등이 각종 아민류와 니트로소화 반응으로 Fig. 4와 같이 생성되는 것으로 알려져 있다(Shuker, 1988).

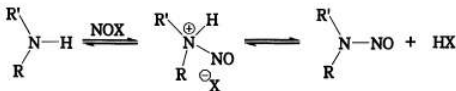


Fig. 4. Nitrosation of secondary amine.

식품 중 니트로사민의 생성량은 식품원료의 환경오염, 존재하는 미생물의 종 및 보관 상태에 따라 많은 차이가 있는 것으로 밝혀졌으며 식육 및 어육의 경우, 높은 함량의 아민류가 존재하고 제조·가공 중 아질산염이 사용되거나 혼입됨으로써 니트로사민의 생성가능성이 높은 것으로 보고되었다. 그리고 맥주는 맥아의 건조 중에 오염된 산화질소와 발아 부산물인 녹맥아 내의 hordenine 및 gramine 등과 같은 아민류에 의해 니트로사민이 생성되는 것으로 밝혀졌다(Spiegelhalder, 1979).

일반적으로 니트로사민이 생성되는 반응에 결정적인 역할을 하는 것은 식품 중에 존재하는 아민류의 농도, 아질산염의 농도 및 pH가 가장 중요한 3대 인자로 보이며 전구체들의 니트로소화는 pH에 의존적이며, 아질산염의 농도의 제곱에 비례하고 아민의 농도에 비례하며 아민의 염기도와는 역의 상관관계가 있다(Archer, 1984).

3. 니트로사민의 독성

니트로사민은 단백질 식품과 질소화합물(질산염, 아질산염)이 만날 때 생성

되는 물질로, 노르웨이에서 산양과 밍크 등의 가축이 아질산을 첨가한 어분을 먹고 집단폐사한 원인 물질이 NDMA로 밝혀짐에 따라 식품 중 니트로사민의 존재와 건강 위험성에 대한 본격적인 연구가 시작되었다(Ender, 1964). 그 후 많은 연구자들에 의해 니트로사민은 식품, 의약품, 화장품, 농약, 고무제품, 환경 등에 광범위하게 분포되어 있는 것으로 보고되었다.

니트로사민은 발암추정 또는 의심 물질로서 그 종류가 현재 300여종이 넘게 알려져 있으며, µg/kg 수준으로도 동물실험에서 90% 이상이 각종 암을 일으킨다고 보고되었다(Preussmann, 1984).

NDMA 치사량을 복용한 사람에게서 위장관 출혈이 있었고(Kimbrough, 1982), 인부 5명이 NDMA가 함유된 음료를 마시고 급성 간질환과 연관된 오심, 구토와 출혈 및 혈소판 감소를 보여 이중 2명은 사망에 이르게 되었다(Kimbrough, 1982). 또한 NDEA 파다노출로 인해 구토, 설사, 심한복부통증이 있었으며, 두통, 발열, 간 비대, 황달, 간, 신장, 폐의 기능 감소가 발생되었다(NIOSH, 1997).

동물실험에서 개에게 NDMA 2.5 mg/kg/day를 캡슐로 주 2회, 3주간 투여했을 때 중추신경 억제가 있었으나 직접적인 영향보다는 간독성에 따른 이차적인 영향일 것으로 추측하고 있다(Strombeck, 1983). 또한 마우스에 NDMA 0.02mg/kg/day를 용용수로 75일간 공급한 경우 수정까지의 시간(time to conception)을 유의성 있게 증가시키지 않았고(Anderson, 1978). 다수의 동물 중에서 기형을 발생시키는데, 광범위한 병변들을 발생시키면서 임신 초기단계에서 나타나며, 상당한 태아 사망률을 발생시켰다.

포유동물 세포 배양군에서 니트로사민은 유전자 돌연변이, 염색체 변형, 염색체 교환들을 유발한다고 보고되었고 유전적 변화들은 쥐, 생쥐 그리고 햄스터 세포에서 또한 인체 세포 배양군에서도 나타났다.

4. 니트로사민의 노출경로 및 발생원

니트로사민에 대한 관심은 발암성 니트로사민의 생성이 산화질소와 담배 속

아민의 상호작용으로 발생할 수 있을 것이라 추측한 이래(Druckrey, 1962) 1957년 노르웨이에서 산양과 밍크 등의 가축이 아질산나트륨을 첨가한 어분을 먹은 후 이들이 몰사한 대규모 증독사건이 발생한 이후부터다. 이들 가축의 사인은 어분에 존재하는 dimethylamine (DMA)과 방부제로 첨가한 아질산나트륨과의 상호반응에 의해 생성된 NDMA가 간 괴사를 일으킨 결과라고 판명되었다. 이 보고로 니트로사민의 독성 및 발암성에 관한 많은 보고가 뒤따르게 되었고, 또한 식품 중 니트로사민 존재 가능성에 관한 연구가 활기를 띠게 되었다 (Ender, 1964).

식품 중 존재하는 질산염과 아질산염이 발암성 물질인 니트로사민을 생성하는 전구물질이라는 점에서, 일반적으로 사람에게 섭취되는 주요 급원은 과채류, 질산염이나 아질산염으로부터 오염된 물, 육류 및 가공육에 육색의 고형이나 clostridium botulinum에 의한 독소생성의 방지를 위하여 인공적으로 첨가한 육가공품 등을 들 수 있다(Kimoto, 1982; Canas, 1986; Knight, 1987). 이들 3가지 공급원 중 질산염 노출의 90%이상

채소류이며(Knight, 1987), 질산염은 식용 가능한 식물 부위 중 잎과 줄기 조직에 가장 많이 축적되고 다음이 뿌리이며, 특히 함량이 높은 채소는 순무 잎으로 나타났다(성낙주, 1994).

니트로사민이 아질산염 보존 식품에서 생성될 수 있다는 인식을 넘어 환경에서도 니트로사민의 발생 연구가 활발히 진행 중에 있다. 여러 분석 방법을 통한 연구 결과들이 환경 중에서 니트로사민이 자연스럽게 발생되고 있다는 것을 제시하였다. 이들 화합물에 의해서 야기된 인체 유해성에 대한 염려는 동물 실험 결과, 니트로사민의 체내 생성이 발견되면서 더욱 관심이 증폭되었다 (Sander, 1968).

외인성 노출(exogenous exposure)은 소위 "Life-Style"과 "직업적 노출"로 세분화될 수 있는데 이는 환경 중 이미 형성된 니트로사민의 섭취 때문이다. 내인성 노출(endogenous exposure)은 니트로소화 할 수 있는 아미노전구체와 니트로소화 작용제인 아질산염이나 아질산가스(NO_x)등의 반응으로부터 이루어

성분과 기체 성분으로 구성되는데, 1회 흡연시 약 50 cc의 연기가 폐 속으로 들어가며 이때 10 mg의 미립자 성분과 32 mg의 기체 성분이 흡입된다. 이들 성분 중에서 이산화탄소 전량, 니코틴의 90% 그리고 타르의 70%가 몸속으로 흡수된다. 미립자 성분 중에는 강력한 발암물질들이 존재하며, 특히, 흡연으로 인하여 폐 속으로 들어간 산화질소와 니트로소화 가능 아민이 니트로사민을 생성시킨다(Eugene, 1999). 실제로 밀폐된 공간에서 담배연기에 노출된 쥐의 폐속에서 N-nitrosomorphine (NMOR)이 발견되었다(Postlethwait, 1983).

5. 니트로사민의 분석방법

1) 기기 분석방법

니트로사민에 대한 연구는 1950년 이후부터 본격적으로 이루어졌으나 정량적 개념 없이 각종 니트로사민의 존재를 확인하는데 불과하였다. 1970년대 들어서 TEA (thermal energy analyzer)라는 특수 분석기를 이용하여 ng/g 수준까지 정량할 수 있는 기술이 개발되었으나 우리나라에서는 분석 방법의 복잡성과 이를 미량으로 분석할 수 있는 GC-TEA

(gaschromatography-thermal energy analyzer) 장비 부족으로 보급률이 낮아 이 분야의 연구가 선진국에 비해 매우 미흡한 상태이다. 이 같은 이유는 니트로사민의 분석이 어려울 뿐만 아니라 취급에 위험성이 높고, 또 과거 수십 년 동안 국내에서는 식품의 안정성보다는 가공이나 생산에 역점을 둔 결과라고 판단된다(성낙주, 1997).

TEA 분석기는 니트로사민을 반복적으로 분석하는데 가장 적합한 장비로써 니트로사민을 높은 감도와 특이성으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라 보통은 GC에 연결하여 사용하나 LC에 UV와 같은 검출기를 함께 연결하여 데이터를 동정하는데 유용하게 사용할 수 있다. 하지만 TEA 검출장치는 니트로화합물에만 국한되어 있고, 기타 범용성 검출기보다 가격이 비싸 단일의 니트로사민을 분석하기에 경제적 측면에서 비용대비 활용도가 떨어지는 단점이 있어 식품에서 오는 다양한 유해물질을 분석하고 또한 니트로사민을 감도 있게

진다. 내인성 니트로사민은 인체 내 몇몇 기관에서 발생한다. 가장 좋은 환경을 가진 곳은 산성 상태인 위장이다(Nair, 1985). 정상인의 위액은 pH가 1~4라고 볼 때(Margardt, 1976), dimethylamine과 아질산염이 반응하여 NDMA를 생성하는 최적 pH는 3.4라고 보고 하였다(Mirvish, 1977). 인간의 위액 내에서 니트로사민의 합성이 가능하다고 알려짐에 따라 인간의 위암과 니트로사민과의 관계에 대하여 많은 관심이 집중되고 있다(Ruddell, 1977; Hawksworth, 1971; Mirvish, 1970; Boyland, 1964).

있다고 보고되었다.

생체 내 니트로사민 생성에 관한 연구는 1981년 생체 내 니트로소화를 측정할 수 있는 N-nitroproline (NPRO) TEST가 개발되면서 급진전되었는데 NPRO의 형성은 내인성 NDMA의 형성과 서로 상관관계가 있다고 보고되었다(Oshima, 1973). 체내에서 니트로사민의 생성 전구물질은 식품에서와 마찬가지로 체내로 섭취되는 아민과 아질산염이며 식품과 동일한 메커니즘에 의해 니트로사민을 생성하게 되는데 식품으로부터 섭취되는 질산염은 소장 상부에서 빠르게 흡수되고(Bartholomew, 1984) 체내의 질산염은 박테리아와 포유류의 환원 효소에 의해 아질산염으로 환원되며 질산염 환원 효소의 활성은 장점액 부분에 존재하는 많은 미생물에 의한(Hegesh, 1982).

체내 니트로사민의 생성과 질산염과의 상관관계에서 가장 중요한 점은 사람의 타액에는 200mg/L 정도의 질산염이 함유되어 있으며(Boyland, 1974), 구강 미생물에 의해 아질산염으로 환원된다는 점인데(Tannenbaum, 1976), 식이를 통한 아질산염의 섭취량은 대략 20 $\mu\text{mol/day/person}$ 정도가 된다(Hotchkiss, 1989). 체내에서 아민의 주요 기질은 2차 아민이며 1차와 3차 아민의 니트로소화에 의한 니트로사민 생성은 그 반응 속도가 아주 느리고 따라서 그 메커니즘도 더욱 복잡해지면서, 4차 암모늄에 의한 체내 니트로사민 형성에는 보다 격렬한 반응이 요구되므로 체내에서는 잘 일어나지 않는다(Challis, 1973).

또한 담배에는 니코틴과 타르 이외에 약 4,000가지 정도의 화학성분이 포함 되어 있으며, 그 중 40가지는 발암물질로 잘 알려져 있다. 담배연기는 미립자

분석해 낼 수 있는 분석 장비의 개발이 시급하다.

먼저는 식품에서 미량으로 존재하는 니트로사민을 높은 감도로 빠르게 모니터링하기 위하여 고분해능질량 분석기(HRMS)가 도입되었지만 매우 고가의 장비이기도 하고 일반 실험자가 다루기에 숙련도를 요구하기 때문에 다른 분석 방법이 필요하다.

니트로사민의 분석방법에 대한 연구는 전 세계적으로 널리 사용되고 있는 기체 크로마토그래피를 질소-인 함유 화합물을 선택적으로 검출할 수 있는 질소-인 검출기(nitrogen-phosphorus detector, NPD) 또는 모든 화합물을 검출할 수 있는 능력을 가진 열전도 검출기(thermal conductivity detector, TCD)를 사용하여 분석하였고, 액체 크로마토그래피와 함께 자외선검출기(ultraviolet detector, UV)를 사용하였다. 하지만 이러한 검출기들은 식품 중에 $\mu\text{g/kg}$ 으로 존재하는 니트로사민을 검출하기에는 다소 어려움이 있어 니트로사민의 정량 뿐만 아니라 정성을 동시에 할 수 있는 질량 분석기(MS)를 사용하였다. 질량 분석기는 위에서 언급한 검출기에 비해 높은 선택성, 특수성 그리고 감도를 가지고 니트로사민을 분석하는 방법이 되었고, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS 그리고 LC-MS/MS는 식품 중 니트로사민 연구를 위한 없어서는 안 될 도구가 되고 있다. 또한 MS는 동위원소로 치환 된 화합물(isotope-labeled compounds, ILCs)을 분석할 수 있게 되었고 시료 전처리나 분석과정에서 생길 수 있는 매트릭스 효과나 불확도를 교정할 수 있도록 설계되었다.

2) 시료 전처리방법

시료의 분석 과정은 시료 채취로부터 시료 전처리, 분석물의 분리, 정성-정량 분석, 통계적 평가 및 검도까지 포함한다고 볼 수 있다. 따라서 각 단계는 분석자가 원하는 결과를 얻기 위한 중요한 단계라 할 수 있겠다. 그 중 시료 전처리 과정은 미량분석에 있어서 시료 중 분석물에 대한 정확한 결과를 얻기 위해 많은 시간과 노력을 필요로 하는 단계이다. 1991년 Majors의 조사 보고서에 따르면 전체 분석과정 중 시료 전처리 과정이 총 분석시간의 61%를 차지한다고 보고되고 있다(Majors, 1993).

시료를 원래의 형태로 직접 기기에 주입하는 경우가 매우 드물기 때문에 전처리 과정은 매우 필수적이다. 시료 전처리의 목적은 분석하고자 하는 물질과 함께 존재하는 방해물질을 제거함으로써 분석물의 선택성(selectivity)을 향상시키고 분석물을 농축함으로써 감도(sensitivity)를 향상시키며 분리나 검출에 적합한 분석물로 전환시키는 데 있다.

식품 중 니트로사민은 대부분 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 수준으로 존재하고 식품의 복잡한 매트릭스의 영향을 받아 분석하기에 어려움을 갖고 있다.

그래서 니트로사민을 분석하기 위해서는 반드시 기기분석 전에 시료의 추출과 정제 그리고 농축과정을 거쳐야 한다.

(1) 액체상 시료

액체상 시료의 경우, i) 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE), ii) 액체상 미량 추출법(liquid phase micro extraction, LPME), iii) 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE), iv) 고체상 미량 추출법(solid phase micro extraction, SPME) 등이 주로 사용되어 왔다. 이 중 가장 보편적으로 사용되고 있는 추출 방법이 바로 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)으로 섞이지 않는 두 가지 용매 층간에 시료를 분배하여 방해물질들과 분석물질들을 분리시키는 기법이다. 그러나 이 추출법은 전처리 과정에 있어서 많은 양의 고순도 추출 용매를 필요로 하고 여러 번 반복해서 추출해야 한다. 따라서 사용되는 많은 유기 용매는 인체에 유해하고 환경에 유해한 영향을 끼치며 특히, 미량 분석에서는 사용된 용매의 농축 과정에서 농축시간이 길어지고 추출시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.

최근 분석화학의 동향은 시료 전처리 과정의 간결성과 친(親) 환경성으로 인체에 해로운 유기 용매의 사용을 최소화하는데 중점을 두고 있다. 이에 많은 분석자들이 관심을 갖고 있는 시료 전처리 기법이 바로 고체상 추출(solid-phase extraction, SPE) 기법이다. 고체상 추출법은 여러 흡착제(예)

C-18, non-polar phase, ion-exchange phase, 그리고 polymeric phase로

충진된 카트리지를 사용하여 다성분 분석물을 추출하고자 할 때 가장 많이 사용되고 있다.

고체상 추출법은 방법 면에서 크게 on-line 방법과 off-line 방법으로 나눌 수 있는데 대다수의 전처리 방법인 필터, 농축, 회석, pH 조절, 증발, 추출 등이 off-line 방법에 속한다.

On-line 방법으로는 고체상 카트리지를 LC-MS 또는 LC-MS/MS와 직접 연결한 자동화 시스템으로써 데이터의 질과 공정의 효율을 높이기 위해 사용되고 있다.

액체상 시료인 맥주, 음료 및 먹는물 중 잔류하는 니트로사민 분석을 위해서도 고체상 추출방법이 많이 이용되었다. 시료를 charcoal, Extrelut, chem-elut, florisil 카트리지 등에 적재하여 분석물질들을 흡착시키고 유기용매를 사용하여 용출하는 방법을 사용하였다. 이는 효과적으로 매트릭스를 제거하고 시료 내에 미량으로 존재하는 니트로사민의 농축이 용이한 방법이다.

또한 LC/FLD로 NMOR, NDMA, NDEA, NPYR, NPIP을 분석하기 위해서는 탈니트로소화를 거친 후 dansyl chloride로 유도체화하여 회석하여 분석하는 방법도 사용되었다.

(2) 고체상 시료

고체상 시료의 경우, 고체상 매트릭스 속에 있는 분석대상 물질을 다양한 유기 용매를 사용하여 분석물질을 추출하는 방식으로 액체-액체 역 추출(liquid-liquid back extraction), 가속 용매 추출(accelerated solvent extraction, ASE), 가압 액체 추출(pressurized liquid extraction, PLE), 초음파 용매 추출(ultrasonic solvent extraction, USE), 마이크로파 도움 추출(microwave-assisted extraction, MAE) 그리고 속슬렛 추출(soxhletextraction), 초임계 추출(supercritical fluid extraction, SFE) 등이 있다.

이중 효율 면에서 가장 좋은 전처리 방법은 가속 용매 추출(accelerated solvent extraction, ASE)인데 이 방법은 프로그램 된 최적의 온도(고온)에서 고압으로 용매를 밀어주어 적은 양의 용매로 매우 효과적이며 빠르게 추출이 이루어

진다. 또한, 기온이 다중 용매 장치를 사용하면 복잡한 매트릭스 시료로부터 분석물질을 효과적으로 추출할 수 있는 장점도 있다. 하지만 수분을 함유한 시료의 경우, 추출물의 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

고체상 시료인 식육 또는 어육 가공품 중 니트로사민을 분석하기 위해 흡착제로 규조토(diatomaceous earth 또는 celite), 실리카(silica), 후로리실(florisil), 알루미늄(alumina), 탄소(carbon) 형태의 고체상을 이용하여 열린 컬럼에 충전시킨 다음 시료 내 방해물질은 흡착제에 남겨두고 분석물만 선택적으로 추출하는 방법을 많이 사용하고 있다.

(3) 유도체화

N-nitrosodialkylamine, cyclic 및 heterocyclic N-nitrosamine을 제외하면, 대부분의 니트로사민은 극성, 비휘발성, 그리고 열적으로 불안정한 화합물 이어서 GC로 분석하기가 까다롭다. 이러한 니트로사민을 GC-MS 또는 GC-MS/MS로 분석하기 위해서는 아민기(-amine), 하이드록실기(hydroxyl-)와 카르복실기(carboxyl-)의 유도체화가 필요하다.

유도체화는 유기적 반응(methylation, silylation, acetylation 등)을 통해 이루어지며, 이어서 시료 매트릭스로부터 분석물의 추출과 정제가 이루어진다.

유도체화 회수율은 실험적인 변수(온도, 반응 시간 및 반응 시작 등)에 의해 영향을 받는다. 유도체화 시작은 보통 분석물과의 반응성 또는 가수분해와 같이 화학적 반응을 일으키지 않는 안정성에 따라 선택한다.

III. 재료 및 방법

1. 대상 시료의 선정과 보관

1) 시료 선정

새우젓과 맥주는 시판품을 슈퍼마켓에서 구입하였고, 김치, 간장, 된장 및 멸치젓은 시판품과 가정에서 제조한 것을 구하여 사용하였다.

2) 시료 보관

시료는 포장단위로 분쇄기에 넣어 마쇄한 후 시료의 손상과 반복실험을 대비하여 진공 저장기 가능한 지퍼백(시료의 보관 중에 침식되거나 녹이 나는 재질의 것을 사용금지)에 나누어 유기용매의 오염이 없는 냉암소에 보관하였으며, 구매일로부터 2주 이내에 분석하였다.

2. 시료 전처리 방법

1) 추출

액체상 시료의 경우, 균질화한 검체 5 g을 정밀히 달아 50 mL 시험관에 넣고 여기에 내부표준첨가용액 1 mL 및 0.1 M NaOH 5 mL을 넣어 교반기로 1분간 진탕하였다. 이를 Extrelut NT 6 g을 채운 칼럼관(내경 1.5 cm, 길이 35 cm)에 넣고 4분간 정치하였다. 이 칼럼에 디클로로메테인:헥세인(70:30, v/v) 혼합액 5 mL로 위의 시험관에 남은 잔류물을 2회 씻고 그 액을 칼럼에 부었다. 이어서 디클로로메테인:헥세인(70:30, v/v) 혼합액 20 mL로 용출하여 250 mL 등근바닥 플라스크에 받았다. 다시 칼럼디클로로메테인:헥세인(70:30, v/v) 혼합액 20 mL 넣어 용출한 후 앞의 용출액과 합하여 30°C의 수욕상에서 400mbar 이상의 압력으로 2-3 mL가 되도록 감압 농축하였다.

고체상 시료의 경우, 균질화한 검체 5 g을 정밀히 달아 50 mL 시험관에 넣고 이에 내부표준첨가용액 1 mL 및 0.1 M NaOH 5 mL을 넣어 교반기로 3분간 진탕하였다. 이에 Extrelut NT 6 g을 넣고 다시 1분간 교반기로 진탕한 후 깔때기를 사용하여 칼럼관(내경 3.2 cm, 길이 35 cm)에 넣고 유리막대로 잘 다졌다. 디클로로메테인:헥세인(70:30, v/v) 혼합액 5 mL로 시험관, 유리막대

및 갈때기에 남은 잔류물을 2회 씻어 합친 후 칼럼에 넣었다. 이어서 디클로로메테인 : 헥세인(70:30, v/v) 혼합액 20 mL로 용출하여 250 mL 등근바닥 플라스크에 받았다. 다시 칼럼에 디클로로메테인:헥세인(70:30, v/v) 혼합액 20 mL 넣어 용출한 후 앞의 용출액과 합하여 30℃의 수욕상에서 400m bar 이상의 압력으로 2-3 mL가 되도록 감압 농축하였다.

2) 정제

정제과정은 미리 헥세인 6 mL로 활성화시킨 후로리실 카트리지에 위 농축액을 넣고 플라스크를 헥세인 1 mL씩 3회 씻었다. 이 액을 다시 후로리실 카트리지에 넣고 헥세인 3 mL를 더 넣어 유출하여 버리고 이어서 디클로로메테인 : 메탄올(95:5, v/v) 혼합액 6 mL로 용출하여 K-D 수기에 받아, 30℃ 수욕상에서 질소를 통과시키면서 정확히 1 mL로 농축하여 시험용액으로 하였다.

3. 위해성 평가

위해평가는 식품위생법 시행령 제4조 3항(대통령령 제21847호, 2009.11.26 개정) 및 Codex의 “식품안전성 위해평가역할에 관한 원칙(Statement of Principle Relating to the Role of Food Safety Risk Assessment)”에 따라 위험성 확인, 위험성 결정, 노출평가, 위해도결정의 과정으로 구체화하여 수행하였다.

1) 위험성 확인

(1) 신진대사(metabolism)

니트로사민은 미생물들에서 변이들을 유발시키고, 생체 내에서 DNA를 알킬화시켜 섭취 자리에 주로 암을 발생한다. 섭취 후에는 체내 전체에 급속하게 퍼져 특정 장기 부위에서 종양을 유발한다.

(2) 약동역학(pharmacokinetics)

신진대사 반응 억제제를 미리 주입한 mouse에 대한 방사선 연구에서 대사되지 않은 [14C]-니트로사민이 정맥 투여 3분 후에 체내에서 균등하게 분포된다는 것이 밝혀졌고, 니트로사민이 장기 친화적인 독성 효과와 관련되어

있음이 밝혀졌다.

(3) 급성 독성(acute toxicity)

실험동물에서 니트로사민의 독성 효능은 일반적으로 간에 국한되었고 손상의 패턴(중심소엽 괴사)은 과거 사건사고에서 인체에서 보였던 것과 유사했다.

(4) 발암성(carcinogenicity)

낮은 노출 수준에서 실험동물들의 반응을 조사하여 종양 유발 역치(threshold)를 구하기 위해 232종의 니트로사민을 대상으로 조사한 결과, 199종 (86%)의 니트로사민에서 잠재적 발암성에 대한 양성반응이 나타났고, 100종의 니트로사민을 대상으로 한 실험에서는 91종에서 종양이 발생되었다.

(5) 돌연변이원성(mutagenicity)

일반적으로 aliphatic (지방족) 니트로사민은 발암 유발 효과보다 박테리아 돌연변이 유발 요인이 더 큰 것으로서 알려지면서 지방족 니트로사민의 알킬 사슬 길이와 박테리아 돌연변이원성의 상관관계가 있음을 입증했다. 이와 대조적으로, cyclic (고리형) 니트로사민의 돌연변이성은 고리의 크기와 발암성 간의 밀접한 관련을 갖고 있음을 밝혔다.

(6) 유전독성(genetic toxicity)

포유동물 세포 배양군에서 니트로사민은 유전자 돌연변이, 염색체 변형, 염색체 교환들을 유발한다고 보고되었고 유전적 변화들은 쥐, 생쥐 그리고 햄스터 세포에서 또한 인체 세포 배양군에서도 확인되었다.

(7) 기형성 및 생식독성(teratogenicity & reproductive toxicity)

다수의 동물 종에서 기형을 발생시켰는데, 광범위한 병변들을 발생시키면서 보통 임신 초기 단계에서 나타나며 상당한 태아 사망률을 보였다.

2) 위험성 결정

니트로사민은 국제암연구소(IARC: International Agency for Research on

Cancer)에서 Group 2A (인체발암추정물질) 또는 Group 2B(인체발암가능물질)로 분류하고 있다. 이는 니트로사민의 발암성에 대한 동물 자료가 충분한 반면 인간에 대한 자료가 제한적 또는 부재함을 말하고 있다.

4) 위해도 결정

현 노출수준에서 식품 섭취를 통한 니트로사민의 위해수준을 판단하기 위해 산출된 인체노출량으로부터 WHO/JECFA의 니트로사민 발암 위해평가 전략을 활용한 MOE (Margin of Exposure)를 아래와 같은 수식에 의해 산출하였다.

※ MOEa) =BMDL10(0.06 mg/kg b.w./day)b)

만성 1일 인체노출량(mg/kg b.w./day)

IV. 결과 및 고찰

1. 발효식품 중 질산염 및 아질산염 질소의 함량

아질산염 질소는 모든 시료에서 평균 0.3mg/kg 이었고, 질산염 질소는 분석한 총 6종의 시료 중 김치에서 가장 높은 함량을 보였고, 다음으로 멸치젓, 새우젓의 순이었다. 각 시료의 질산염 질소의 범위는 김치 10.7 ~ 24.75mg/kg, 멸치젓 1.5 ~ 5.6mg/kg, 새우젓 1.0 ~ 2.0mg/kg, 간장 0.3 ~ 0.9mg/kg, 된장 0.5 ~ 1.0mg/kg 이었다.

쇠¹⁸⁾는 젓갈김치의 질산염 함량이 담금 직후 300mg/kg 이었는데 숙성 1주 후 307mg/kg 으로 조금 증가하였으나 그 이후 점차 감소하여 숙성 6주 때는 139mg/kg이라고 보고 하였다. 질산염 및 아질산염 질소의 함량은 질소비료의 사용량, 일조량, 제조제의 사용여부 등에 따라 달라지고²⁵⁾ 같은 식물이라도 식물 개체에 따라 함량이 달라지는 것으로 보고되어 있다.²⁶⁾ 이 등²⁷⁾은 새우젓과 멸치젓의 질산염 및 아질산염 함량은 새우젓 3.48 ~ 9.44mg/kg, 0.06 ~ 1.50mg/kg, 멸치젓 0.74 ~ 21.13mg/kg, 0.32 ~ 4.87mg/kg으로 보고 하였는데 본 실험결과보다는 다소 높은 함량이었다.

2. 발효식품 중 DMA 및 TMA 질소의 함량

DMA 및 TMA 질소는 분석한 시료 중 새우젓에서 가장 높게 정량되어 평균 함량이 각각 95.6mg/kg, 10.2mg/kg으로 나타났으며, 김치는 4.9 ~ 15.4mg/kg, 0.6 ~ 0.8mg/kg, 멸치젓은 3.3 ~ 4.0mg/kg, 1.9 ~ 2.8mg/kg, 새우젓 30.3 ~ 177.9mg/kg, 4.4 ~ 21.3mg/kg이었고 간장, 된장에서는 DMA 및 TMA 질소 모두 0.5mg/kg 이하로 검출되었다.

권²⁸⁾은 재래식 간장 중 TMAO는 평균 0.42mg/kg, TMA는 5.51mg/kg이었고, DMA는 3.75 ~ 11.99mg/kg 의 범위라고 하였는데 이들 생성의 주원인은 메주라고 하였으며, 성 등²⁹⁾은 간장 숙성 중 DMA는 숙성과정 중에 새로이 생성 된다고 하였다. 메주로부터 용출된다는 설이 지배적이나, 이상발효 등으로 pH의 변화가

생김 경우 DMA가 생성될 수 있다고 보고하였다.

본 실험에서는 새우젓의 DMA 함량이 가장 높았는데 임 등²⁹⁾의 보고에 의하면 DMA함량이 멸치젓은 5.05mg/kg, 새우젓은 2.59mg/kg 으로 멸치젓의 함량이 더 높았고, 명란젓에서는 21.80mg/kg 이 검출되어 젓갈류 중 가장 높은 함량을 보였다.

김 은 멸치 및 새우젓 숙성중 DMA의 함량변화에 대하여 멸치젓은 담금 직후 11.8mg/kg 이었던 것이 숙성 110일 후에는 39.9mg/kg 으로 약 3.4배 증가하였으며 새우젓은 27.5mg/kg에서 451.2 mg/kg으로 15.2배 증가하였는데 본 실험 결과와 마찬가지로 멸치젓 보다 새우젓에서 DMA 함량이 높은 것으로 나타났다.

3. 발효식품 중 NA의 함량

1) 김치 중의 NA

가정에서 제조한 김치 4점, 시판 김치 3점의 NA를 분석한 결과는 평균 pH가 4.7이었고 NDMA는 0.8 ~ 6.9mg/kg 으로 NDMA 외 다른 NA는 검출되지 않았다.

김 등²¹⁾은 김치숙성 중 NDMA는 3~45mg/kg 이었고 숙성 80일에 최고값을 보이며 숙성 60,80, 및 90일째 시료에서는 NDEA도 흔적량으로 나타난다고 보고하였는데, 김치제조용 원료의 생산지와 숙성 기간 등의 차이에 따라 다소 다른 결과를 보이는 것으로 생각된다. 특히 김치는 여러 재료를 혼합하여 만들어지 때문에 이들 재료에 의한 숙성 조건에 따라 관여하는 미생물이 다양하여 여러가지의 결과가 나타나는 것으로 사료된다.

2) 젓갈류 중의 NA

멸치젓과 새우젓의 NA를 분석한 결과 멸치젓은 불검출 ~ 1.2 mg/kg, 새우젓은 불검출 ~ 0.9mg/kg 이 정량되었다.

김 은 멸치젓과 새우젓의 숙성 중 NA의 변화는 숙성 100일 후까지 흔적량에 불과하였으나 젓갈은 그 자체만으로 섭취하기 보다는 김치류에 첨가하거나 양념 등을 첨가하여 다양한 형태로 섭취하므로 젓갈 이외의 성분과 반응하여

를 분석한 결과 대조구에 비하여 모든 시료에서 아질산염 농도가 높을수록 NDMA의 생성량이 증가하였다. 장류와 맥주는 아질산염의 농도에 따라 완만한 증가 경향을 보이며, 젓갈류는 4mM을 첨가하였을 때 큰 폭으로 증가하였는데, 특히 새우젓은 아질산염을 첨가하지 않은 경우에 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 8mM 첨가 시에는 220.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 무첨가구에 비해서 무려 183.1배의 증가를 보였다.

새우젓에서 NDMA가 높게 정량된 것은 다른 시료에 비해 시료 중에 존재하고 있는 아민의 함량이 높았던 것이 주된 요인이라 생각된다.

김²⁰⁾ 은 멸치젓과 새우젓에 아질산염을 첨가하여 숙성시킨 후 NA를 분석하였는데, 새우젓이 멸치젓보다 DMA 함량이 높으나 NDMA 함량은 멸치젓에서 높게 검출되었다고 보고하였다. 이는 본 실험결과와 상반되는 것으로, 김²²⁾ 은 이러한 결과에 대하여 멸치젓이 새우젓에 비해 산성화가 빠르며, 새우젓은 N DMA 생성시 pH변화에 매우 민감한 반면, 멸치젓은 pH변화에 비교적 안정하기 때문인 것으로 추정하였다. 고³⁰⁾ 는 한국인의 식습관과 타액의 아질산염 함량에 관한 보고에서 한국인은 일본인보다 타액 중 아질산염의 함량이 높다고 보고하였다.

본 실험결과 시료 중에 미량의 NDMA가 존재하더라도 아질산염 및 질산염을 함유한 식품과 함께 섭취할 경우 생체 내에서 상당량의 NDMA가 생성될 가능성이 충분하다고 사료된다.

3) Thiocyanate가 NA의 생성에 미치는 영향

thiocyanate 첨가후에 NDMA함량은 김치, 멸치젓, 된장 등은 1.3~1.5배의 증가를 보였고 새우젓, 간장 및 맥주는 thiocyanate를 첨가하지 않은 대조구에 비해 2.0~3.3배의 다소 높은 증가율을 보였다.

Yamada³¹⁾ 등은 thiocyanate와 halideion은 니트로화를 촉진시킨다고 하였는데 본 실험에서도 같은 결과를 얻었다. Tannenbaum¹⁶⁾ 등 도 보통 사람의 타액 에는 하루에 약 30mg의 thiocyanate가 분비되고, 흡연자는 비흡연자에 비해 약 3배 이상이 분비되며, 이 물질은 제 2급 아민이나 제 3급 아민의 니트로화를 촉진시키는 것으로 보고하였다.

니트로화반응을 일으킬 가능성이 매우 높다고 하였다.

3) 장류 중의 NA

간장 및 된장의 NA를 분석한 결과 간장의 NDMA는 흔적량 ~ 2.7mg/kg이었고 다른 시료에서 검출되지 않았던 미동정 NA가 검출되었는데 retention time 이 유사한 표준물질을 기준으로 정량하였다. 된장의 NDMA 함량은 1.5 ~ 3.1 mg/kg으로 평균 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었고 회수율은 91.6%였다.

성 등²³⁾은 간장의 NDMA는 간장담금용 용수 및 시판식염으로부터 유래된 아질산염과 간장숙성 중 간장덧으로 부터 용출된 DMA와 반응하여 생성되고, 숙성 중 NDMA가 증가되는 것은 전구물질의 함량이 숙성함에 따라 증가한다는 사실과 TMAO가 TMA로 환원되면서 DMA뿐만 아니라 NA의 생성에 강력한 촉매작용을 하는 물질들이 생성되기때문이라고 보고하였다.

장류 중의 NDMA는 함량은 적으나 이 물질은 강력한 발암성을 나타내고, 우리나라의 식생활에서 가장 기본이 되는 조미료이므로 매우 중요한 의미를 갖는다고 생각된다.

4. 인공소화시 NA의 생성에 영향을 미치는 인자

1) 인공소화시 NA의 생성

시료의 인공소화 전후의 NDMA 함량을 비교해보니 모든 시료에서 인공소화 후에 NDMA 함량이 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었는데 이를 인공타액 및 위액으로 소화시킬 경우에 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 인공소화 후에 약 4.6배가 증가된 것으로 나타났으며, 그 외의 시료에서는 인공소화 후에 1.0~1.6배 정도의 증가를 보였다. 이는 인공소화 동안의 인공타액이나 위액,배양온도 및 위액의 pH조건 하에서 시료내 NA전구 물질등의 니트로소화가 촉매된 것으로 생각된다.

된장시료에서 인공소화 전보다 인공소화 후 NDMA가 높게 정량된 것은 된장 중에 질산염을 환원시키는 미생물이 존재하거나, 제 2급 아민과 아질산이외의 산화질소가 가공숙성 중에 혼입된 것으로 생각된다.

2) 아질산염의 첨가가 NA의 생성에 미치는 영향

각 시료에 아질산염을 1, 4, 8mM의 농도로 첨가하여 인공소화시킨 후 NA

Yamamoto³²⁾ 등은 NA 생성에 미치는 thiocyanate의 영향을 조사하기 위해 5mM의 sarcosine과 10mM의 NaNO₂ 의 농도가 되도록 수용액을 만든 후 sodium thiocyanate를 100mM 첨가하여 니트로화 시킬 경우 대조구에 비해 약 2.6배의 NDMA가 생성되었다고 하였다. 김²²⁾ 은 thiocyanate가NA의 전구 물질이 많은 젓갈류에서 니트로소 화합물의 생성촉진제로 작용함을 본 보고 하였는데 실험의 재료로 사용한 발효식품에서도 같은 결과를 보였다.

4) 아스코르브산이 NA의 생성에 미치는 영향

8mM의 아질산염과 6.4mM의 thiocyanate를 첨가한 것을 대조구로 하여 아스코르브산을 3.2, 6.4, 12.8mM 농도로 첨가하여 인공소화 시킨 후 NA의 생성을 검토해 본 결과 아스코르브산의 농도가 높을수록 NA의 생성은 억제 되었다. 멸치젓과 맥주에서는 12.8mM의 아스코르브산을 첨가한 경우 대조구에 비해 각각 50%,32.6%의 억제효과가 있었고 김치, 새우젓, 간장 및 된장에서는 74.3~92.4%의 억제효과가 있었다.

신¹⁹⁾ 은 새우젓 첨가 김치에 아스코르브산을 10, 100 및 1000mg/kg첨가한 후 100mg/kg의 아질산염을 가하여 니트로화시킨 결과 아질산염만을 첨가하였을 때 NDMA는 243.6mg/kg였으나 1000mg/kg의 아스코르브산 첨가시 89.1mg/kg 으로 약 63.5% 감소한다고 보고하였고, 김²²⁾ 은 멸치젓과 새우젓 숙성 중 3.200mg/kg의 아스코르브산 첨가시 무첨가구에 비해 멸치젓은 90%, 새우젓은 약93%의 억제 효과를 나타내었다고 하였다. 성 등은 시판 식염으로 제조한 간장에서 대조구에 비해 아스코르브산 처리구가 82.2~87.0%, 순식염으로 제조한 가정에서 대조구에 비해 94~95%의 억제 효과를 얻었다고 하였다. Mirvish³³⁾ 등 이 아스코르브산의 NDMA 생성저해에 관하여 최초로 보고한 이래, 그 효과에 관심을 가지고 생체계나 각 종 식품 중에서의 니트로소 화합물의 생성방지 및 저해기구에 대해 많은 연구가 진행되었으며, NDMA 생성저해기구는 대부분의 연구자들이³³⁻³⁶⁾ 아스코르브산은 아질산염과 DMA 반응계중의 NO₂ 를 감소시켜 NDMA의 생성을 억제시킨다고 설명하였다.

김과 이²⁰⁾ 는 김치숙성 중 아스코르브산, NO 및 NO₃ 의 양적변화 상기

반응식과의 관계에서 NO₃ 가 변화하여 전부 NO₂ 가 된다면 감소된 아스코르브산의 양으로서는 소비된 NO₂ 의 전량을 소모시킬 수 없으며, 따라서 아스코르브산 이외의 NO₂ 의 소비 가능한 인자로 아미노산을 지적하고 있다. 유리 아미노산과 아질산염과의 반응성에 대한 연구로는 성 등²⁴⁾의 연구가 있다.

시료에서 아질산염의 농도와 NDMA의 생성량이 비례적으로 증가하였는데, 특히 많이 증가한 시료는 새우젓으로 약 183.1배 이상 증가하였다. 즉, 아질산염을 4mM 첨가시 192.4mg/kg, 8mM 첨가시 220.9mg/kg이 검출되었다. 6. 타액에 thiocyanate를 1.6, 3.2, 6.4mM 농도로 가하여 인공소화 시킨 결과 무첨가구에 비해 NDMA 생성량은 약 1.5배 증가하였다. 7. 아스코르브산을 함유한 타액으로 인공소화시킨 경우에 NDMA 생성량은 농도가 높을수록 감소되어 아스코르브산을 12.8mM 첨가시 멸치젓과 맥주는 각각 50.0%, 32.6%, 김치, 새우젓, 간장 및 된장은 74.3~92.4%의 억제효과가 있었다.

V. 적요

N-nitrosamine(NA)은 식품의 불합리한 가공조건이나 조리방법에 따라 식품 중에 널리 생성될 수 있고 발암성이 강력하여 관심의 대상이 되고 있다. 식품에서 NA의 주된 전구물질은 질산염, 아질산염 및 아민류 등이다. 김치, 젓갈 및 장류는 우리나라의 전통적인 발효식품이며 맥주는 현대인의 대표적인 알코올 음료이다. 김치는 주재료인 배추에 질산염 및 아질산염의 함량이 높고 부재료로 사용되는 젓갈류에는 아민류가 풍부하여 NA의 생성 가능성이 높으며, 또한 간장, 된장, 맥주 등도 발효숙성에 관여하는 미생물의 환원작용에 의해 원료 중에 혼입된 질산염이 아질산염으로 환원될 경우 NA의 생성가능성이 높다.

따라서, 본 실험에서는 우리나라에서 널리 애용되고 있는 시판발효식품에 인공타액 및 위액을 혼합하여 in vitro 상에서 소화시킴에 따라 발효식품 섭취 후 체내에서 생성될 수 있는 NA의 함량을 예측하고자 하였다.

1. 질산염 질소는 김치에서 10.7~24.5mg/kg, 멸치젓에서 1.5~5.6mg/kg, 새우젓에서 1.0~2.0mg/kg, 간장에서 0.3~0.9mg/kg, 된장에서 0.5~1.0mg/kg, 아질산염은 모든 시료에서 평균 0.3 mg/kg이 검출되었다.
2. 시료 중의 DMA 및 TMA 질소는 김치에서 4.9~15.4mg/kg, 0.6~0.8mg/kg, 멸치젓에서 3.3~4.0mg/kg, 1.9~2.8mg/kg, 새우젓에서 30.3~177.9mg/kg, 4.4~21.3mg/kg 으로 검출되었고 간장, 된장 및 맥주에서는 DMA, TMA 모두 0.5mg/kg 미만이었다.
3. 시료 중의 NA를 분석한 결과 NDMA는 김치 0.8~6.9mg/kg, 멸치젓 불검출~1.2mg/kg, 새우젓 불검출~0.9mg/kg, 간장 불검출~2.7mg/kg, 된장 1.5~2.8mg/kg 의 범위였다.
4. 인공소화시킨 후 NA를 분석한 결과 된장 이외에 5종의 시료에서 NDMA가 약 1.5배 증가하였고, 된장은 4.6배 증가하였다.
5. 각 시료에 아질산염을 첨가하여 인공소화시켰을 때 대조구에 비하여 모든

참고문헌

1. 명승운 : 식품 중 니트로사민 분석법 확립을 통한 오염 실태조사 및 위해성 평가, 경기대학교 대학원 박사학위 논문(2010)
2. Ender, F, Haver G., Helgebostad, A., Koppang N., Madsen R. and Ceh, L: Naturwissen chaten, 51, 637(1964)
3. Hildrum, K. I., Williams, J. L. and Scanlan: R. A., Effect of sodium concentration on the nitration of proline at different pH levels, J.Agric. Food Chem, 23, 439~442(1975)
4. Magee, P. N. and J. M. Barnes: The production of Malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine, Br. J. Cancer, 10, 114~122(1965)
5. Bogovski, P and S. Bogovski: Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer, Inter. J. Cancer, 27,471~474(1981)
6. Preussmann R, and B.W. Stewart: N-nitroso carcinogens, In:Searle, C.E(Ed), chemical Carcinogens, 2nd. Ed. Vol. 2, 643. Acs Monograph 182, American chemical Society, Washigton, DC.(1984)
7. Cooper, S. W. and Dimbrough R. D: Acute dimethylnitrosamine poisoning outbreak, Journal of Forensic Science,25, 874~882(1980)
8. Lijinsky, W: Reaction of drugs with nitros acid as a source of carcinogenic nitrosamine, Cancer Rec, 34, 225~258 (1974)
9. Kawamura, T, Skai K, Miyajawa F, Wada H, Ito Y. and Tanimura A: Studies on nitrosamines in foods,(5) Distribution of secondary amines in foods, J. Food Hyg. Soc, Japan, 12(5), 394~398(1971)
10. Singer, G. M. and W. Lijinsky: Naturally occurring nitrosatable compounds, 1. Secondary amines in foodstuffs, J. Agric. Jood C hem, 24(3), 550~553(1976)

11. Spiegelhalter, B.G. Eisenbrand, R. Preussmann: Proc. VI Inter. Sym. N-nitroso Compds, 467 ~ 477(1979) Walker E. A, Gricuite L, Castegnaro M, Davis W: International Agency for Research on Cancer Public,31 : Lion, France.(1980)
12. Hickman, D. H.,Hardwic W. A., Ladish W.J., Meilgaard N. O: " Technical Report of the United States Brewers Association Ad Hoc Committee on Nitrosamines" Master Brewers, Association of America, Technical Quart, In press.(1981)
13. Lijisky, W. and Singer M : Fornation of N-nitrosamine from tertiary amins and nitrous acid. In : Pogovsky, P. and Walker E. A., Eds : nitros compounds in the Envirment, Lyon, International Agency for Reserach on Cancer CIARC. Scientific publications No. (14), 111 ~ 116.(1974)
14. Whete, J. W : Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite, J. Agric. Food chem., 23. 886 ~ 891.(1975)
15. WHO.: Health Hozards.(1985)
16. Tannenbaum S. R., Sinsky A. J. and Weisman M: Nitrite in hyman saliva : Irs possible relationship to nitrosamine formation, J. Nat. Cancer, Inst, 53, 79 ~ 84(1974)
17. Harada M., Ishiwata H., Nakamura M., Tanimura A. and Ishidate M: Studies on in Vivo formation of nitroso compounds(1). Changes of nitrite and nitrate concentrations in human saliva after ingestion of salted Chinese cabbage, J. Food Hyg. Soc. Japan, 16, 11 ~ 18, (1975)
18. 최선미 : 김치 발효중 Nitrate 와 nitrite 함량 변화와 N-nitrosodimethylamine 생성, 부산대학교 대학원 석사학위청구논문.(1991)
19. 신정혜 : 배추김치 숙성 중 N-nitroso의 생성요인, 경상대학교 석사학위 청구논문(1997)
20. 김수현, 이용호
21. 김수현, 현재석, 호창경, 오명철, 박제석, 강순배: 멸치젓 첨가 김치숙성 중 제 2급, 제3급 아민 및 제 4급 암모늄화합물의 함량변화와 N-Nitrosamine의 생성, 한국영양식량학회지, 23 (4), 704 ~ 710,(1994)
22. 김정균: 멸치 및 새우젓 숙성 중 아질산염과 아스코르브산이 N-Nitrosamine의 생성에 미치는 영향, 경상대학교 이학박사학위 청구논문 (1995)
23. 성낙주, 황외자, 이용호 : 한국 재래식 간장의 니트로소화합물에 관한 연구, 한국영양식량학회지, 17(2), (1988)
24. 성낙주, 지영애, 정승용: 청국장 발효 중 질소화합물의 변화, 한국영양식량 학회지, 13 (3), 275 ~ 284.(1984)
25. 김장량, 천석조, 박영호: 과실,채소류의 질산염 및 아질산염 함량, 부산수산대학 연구보고,24 ,129 (1984)
26. 신광순, 남궁석: 채소 및 과일중 질산염과 아질산염의 축적에 관한 연구, 한국영양학회지, 10, 111(1977)
27. 이용호, 김세권, 전중윤, 정숙현, 차용준, 김수현, 김경삼: 시판 젓갈류와 채소중의 질산염 및 아질산염 함량, 韓水誌., 15(2), 147 ~ 153, (1982)
28. 권태영: 전북대학교 대학원 농학박사 학위논문 (1983)
29. 임상국, 윤명호, 권숙담: 식품중의 Nitrosamine에 관한 연구, 한국영양식량 학회지, 5 (3), 169 ~ 173 (1973)
30. Ishiwata H., Boriboon P., Nakamura Y., Haroda M., Tanimura A, and Ishidatem M: Studies on in vitro formation of nitroso compounds (II), change of nitrate concentration in human saliva after ingestion of vegetable of sodium nitrite, J. Food Hyg. Soc. Japan, 16, 19 ~ 24 (1975)
31. 고영수 : 한국 식품과 인 타액중 질산염 및 아질산염의 함량관계에 관한 연구, 한국식품과학회지, 11, 147 (1979)
32. Yamada T., Yamamoto M. and Tanimura A : J. Food Hyg. Soc. Japan 15, 201 (1974)

33. Yamamoto M., Yamada T. and Tanimura A: Studies on the formation of nitrosamines. (V). The effects of citrate, tartrate and thiocyanate on the rates of the rates of nitrosation. J. Food Hyg. Soc. Japan. 17 (5), 363 ~ 368, (1976)
34. Mirvish S. S., Wallcave L., Eagen M. and Shbik P: Ascorbate-nitrite reaction ; Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. Science 177, 65 ~ 68, (1972)
35. Fiddler W.J., pensabene W., Piotrowsky E. G., Phillips J. G., Keating H., Mergens W. J. and Newmark A. L: Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by use of cure-solubilized alphatocopherol, J. Agric. Food Chem. 26, 653 ~ 656, (1976)
36. Fiddler W., Pensabene F. W., Piotrowski E. G., Doerr R. C. and Wasserman A. E: Use of sodium ascorbate or erythroate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters, J. Food Sci. 38, 1084 ~ 1086 (1973)
37. Kamm J., J. Dashiman T.,Conney A. H. and Burns J.J: Protective diffect of ascorbic acid on hepatotoxicity caysed by sodiym nitrite plus aminopyrin, proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 747 ~ 749 (1977)
38. Archer M.C, Tannenbaum S. R.,Fan R. Y. and Weisman M: Reaction of nitrite with ascorbate and its relation to nitrosamine formation, J.Nat. Cancer Inst. 54 (5), 1203 ~ 1205 (1975)