Journal of Radiation Industry 14(2) : 107~115(2020)

화학적 확인시험법을 이용한 대두의 조사처리 여부 평가

이기창[1,2] · 박종흠[1] · 은종방[2] · 송범석[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소, [2]전남대학교 식품공학과

Evaluation of Irradiation Treatment for Soybeans Using Chemical Identification Methods

Ki-Chang Lee[1,2], Jong-Heum Park[1], Jong-Bang Eun[2] and Beom-Seok Song[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup-si 56212, Republic of Korea*

[2]*Department of Food Science and Technology, Graduate School of Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea*

Abstract - This study was performed to evaluate the applicability of chemical identification methods, including gas chromatograph/mass spectrometry (GC/MS) and solid-phase microextraction (SPME) technique coupled with GC/MS, for soybeans gamma-irradiated at various doses ranging from 0.25 to 5 kGy. The thermoluminescence (TL) analysis, which is a formal physical identification method of irradiation treatment for soybeans, revealed that judgement on irradiation treatment was correctly made for soybean samples irradiated at higher than 0.25 kGy. However, judgement through this method could fail when the food was washed, heated, or exposed to light energy including visible and ultraviolet radiation. As alternative methods, chemical identification methods were applied by analyzing unique radiolytic compounds in irradiated food. Similar to the TL analysis results, all of the samples irradiated at ≥0.25 kGy were clearly identified as irradiated by the GC/MS analysis. Moreover, SPME-GC/MS analysis could be applied to identify gamma-irradiated soybeans at higher than 0.25 kGy, implying that the new method will attract more attention. This is because it is a easy and rapid identification method that does not use organic solvents to extract detection markers from irradiated food.

Key words : Soybean, 2-Alkylcyclobutanones, Thermoluminescence, Solid-phase microextraction, Gas chromatography/mass spectrometry

서 론

대두는 전 세계적으로 가장 많이 소비되는 유지작물 중 하나이며, 우리나라의 경우 2018년도 기준으로 한 해 동안 1,179,402톤을 소비하였고 이 중 94.6%를 수입에 의존하고 있는 실정이다(한국농수산식품유통공사 2019). 국제적으로 교역되는 대두는 운송과 저장 과정 중 해충에 의한 피해 및 검역을 위해 메틸브로마이드와 같은 화학적 훈증제 처리 또는 조사처리 등을 사용하고 있다(Farkas 2006). 또한 우리나라의 식품공전에는 두류의 살충과 살균을 목적으로 최대 5 kGy의 선량으로 감마선과 전자선 조사처리가 가능하다고 명시하고 있다(식품의약품안전처 2019). 식품의 조사처리 기술은 세계보건기구, 국제원자력기구, 국제식량농업기구 등이 50여 년간의 독성학적 안전성 평가 연구들을 검토한 결

* Corresponding author: Beom-Seok Song, Tel. +82-63-570-3211, Fax. +82-63-570-3207, E-mail. sbs0110@kaeri.re.kr

과 위해성이 입증되지 않아 안전한 것으로 발표한 후 전 세계 50여 개 국가에서 사용하고 있으며, 품질 변화를 최소화하면서 해충 사멸, 살균 효과가 우수한 기술로 알려져 있다(권 등 1984; WHO 1981; IAEA 1996).

조사처리된 식품은 소비자의 알권리와 선택권을 보장하기 위해 포장지에 조사처리 여부를 표시하도록 규정되어 있으며, 조사처리 여부 확인을 위해 식품공전 일반시험법에서는 유전자코메트 분석법(Comet assay), 광자극발광법(Photostimulated luminescence, PSL), 열발광법(Thermoluminescence, TL), 전자스핀공명법(Electron spin resonance), 기체크로마토그래프/질량분석법(Gas chromatography/mass spectrometry, GC-MS) 등 5 종류의 조사처리식품 확인시험법을 제시하고 있다. 이 중 열발광법은 두류의 조사처리 여부를 확인하는 분석법으로 명시되어 있다. 열발광법은 이온화 방사선이 조사될 때 그 에너지 일부가 식품에 존재하는 규산염과 같은 광물질에 포집되는 특성을 이용하며, 이들 광물질을 식품으로부터 추출한 후 열을 가할 때 포집된 에너지가 가시광선으로 발광되는 광자의 수를 측정하는 분석법으로 조사처리 여부 판별에 대한 신뢰성이 높은 확인시험법으로 보고되고 있다(식품의약품안전평가원 2012). 그러나 열발광법은 세척, 가열, 살균 등의 가공처리, 원료의 혼입 여부, 마찰열 등의 물리적 인자에 매우 큰 영향을 받게 되어 조사처리를 했음에도 불구하고 조사처리하지 않은 것으로 판정될 수 있다(정 등 2012).

화학적 확인시험법인 기체크로마토그래프/질량분석법은 이온화 방사선에 의해 생성되는 고유한 식품 내 성분을 분석하는 방법으로 현재까지 식품공전에는 1,7-hexadecadiene과 같은 지방유래 탄화수소류(hydrocarbons)를 분석 대상 물질로 정하고 있다. 그러나 이들 탄화수소류 이외에도 이온화 방사선에 의해서만 생성되는 고유한 지방 분해산물로 알려져 있는 2-alkylcyclobutanones (2-ACBs)의 분석을 통해 조사처리 여부 판별이 가능하나 아직까지 이에 대한 국내 규정은 설정되어 있지 못한 실정이다(권 2010). 최근 조사식품 확인시험법 연구에서 휘발성 물질들 연구에 사용되는 고체상 미량추출(solid-phase microextraction, SPME) 방법을 이용한 후 각각의 성분을 GC-MS로 분석하는 확인시험법(SPME-GC/MS)이 대두되었다(Caja *et al*. 2008; Blanch *et al*. 2009; Barba *et al*. 2012). 이 분석법은 용매를 사용하지 않으면서 쉽게 자동화할 수 있어 조작이 간편하고 열발광법과 기체크로마토그래프/질량분석법에 비해 매우 신속하게 분석을 할 수 있다. 그러나 고체상미량추출법을 이용한 조사처리식품 확인시험법 연구들은 육류 및 육가공품과 관련된 연구만이 소수 진행되었으며, 농산물에 대한 적용 연구는 부족한 실정이다. 또한 이들 연구들에서는 육류의 살균 목적으로 사용된 0.5 kGy 이상의 흡수선량이 적용되었으나, 곡류나 두류의 해충 방제를 목적으로 적용되는 일반적인 조사선량은 0.4 kGy 수준이기 때문에 0.5 kGy 이하의 낮은 선량으로 조사처리된 식품 또한 판별할 수 있어야 한다(Hallman 2012).

따라서 본 연구에서는 비조사 대두와 감마선 조사처리된 (0.25~5 kGy) 대두를 이용하여 물리적 확인시험법 중 민감도 가장 높은 열발광법을 통해 다양한 흡수선량으로 조사처리된 시료의 조사처리 여부 확인시험법의 특성을 재평가하였으며, 이후 2-ACBs를 타겟물질로 선정하여 기체크로마토그래프/질량분석법과 고체상미량추출 분석법 등 화학적 확인시험법의 사용 가능 여부를 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용된 대두(*Glycine max* L. Merrill)는 정읍시내 시장에서 국내산임을 확인하고 구입하였으며, 나일론 포장지로 진공 포장하여 방사선 조사하기 전까지 −80°C에서 보관하였다.

실험에 사용된 표준시약 2-cyclohexylcyclobutanone (2-CHCH, ≥97%), diethyl ether (≥99.9%), 2-dodecylcyclobutanone (2-dDCB, ≥95%), ethanol (≥99.8%), florisil (60~100 mesh), *n*-hexane (≥97%), sodium polytungstate solution (≥85%), sodium sulfate (≥99%) 및 2-tetradecylcyclobutanone (2-tDCB, ≥97%)은 Sigma-Aldrich사(St. Louis MO, USA)의 제품을 사용하였으며, acetone (≥99.5%), ammonium hydroxide solution (≥25%) 및 hydrochloric acid (≥37%)는 대정화금 주식회사(Siheung, Korea)의 제품을 사용하였다.

2. 감마선 조사

포장된 시료는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 내 ^{60}Co 감마선 조사장치(선원 11.1 PBq capacity, point source AECL, IR-79; MDS Nordion International Co. Ltd., Ottawa, Canada)를 이용하여 각각 0.25, 0.5, 0.75, 1, 3, 5 kGy의 흡수선량을 목표선량으로 설정하여 조사처리하였다. 이들 시료에 대한 흡수선량은 조사처리 전 감마선 투과 방향으로 앞면과 뒷면에 붙인 알라닌 선량계(직경 5 mm; Bruker Instrument, Rheinstetten, Germany)를 ESR spectrometer (EMS 104 EPR analyzer, Bruker, Rheinstetten, Germany)로 측정하였으며 시료별 측정된 흡수선량은 목표선량의 5% 이내였다.

3. 열발광 분석(TL)

TL 분석은 시료에서 분리된 광물질을 이용하여 측정하는 EN 1788 방법(CEN 2001)에 준하여 실험하였다. 구체적으로 대두 200 g에 1차 증류수 200 mL를 가하여 초음파세척기(8210R-DTH, Branson Ultrasonics co., Danbur, CT, USA)

에서 10분간 처리하고 나일론 천으로 여과한 후 원심분리(2,000×*g*)하였다. 잔사에 존재해 있는 유기물 제거를 위해 2 g·mL^{-1}의 농도로 준비된 sodium polytungstate 5 mL를 가하고 증류수로 세척하였다. 다시 침전물 중의 carbonate 제거를 위해 1 N HCl을 기포가 발생되지 않을 때까지 가한 후 1 N NH_4OH를 가하여 중화시키고, acetone으로 세척하여 건조하였다. TL spectra 측정은 TLD 시스템(RISØ, DA-20, Copenhagen, Denmark)을 이용하여 초기온도는 50°C에서 5초간 예열하고 5°C·s^{-1}의 온도 상승률로 최고 온도를 400°C로 설정하여 분석하였다. 시료에서 분리된 광물질로부터 1차 glow (TL_1)를 측정한 뒤 1 kGy로 광물질을 재조사하여 2차 glow (TL_2)를 측정한 다음 방사선 조사 특유의 신호가 나타나는 150~250°C 범위의 면적 비율인 TL ratio (TL_1/TL_2)를 구하였다. 이후 시료의 TL ratio가 0.1 미만이면 비조사처리로 0.1 이상이면 조사처리된 것으로 판정하였다.

4. 기체크로마토그래프/질량분석(GC/MS)

2-ACBs에 대한 GC/MS 분석은 EN 1785 방법(CEN 2003)에 준하여 실시하였다. 시료로부터 조지방 추출은 soxhlet 추출법에 따라 행하였으며, 20 g의 시료와 동량의 무수 Na_2SO_4를 혼합하여 데시케이터에서 20분 방치하였다. 시료를 thimble filter에 옮겨 *n*-hexane 150 mL를 용매로 사용하고 soxhlet 장치를 이용하여 시간당 약 4~6 cycle의 속도로 6시간 동안 추출하였다. 추출용액은 rotary vacuum evaporator (N-1200B, Eyela, Japan)를 이용하여 약 100 mL로 농축하여 조지방량 측정 후 조지방 200 mg에 해당하는 추출액을 분리 정제에 사용하였다. 분리 정제는 불활성화시킨 florisil 40 g을 300×20 mm chromatography column에 충진한 후, 조지방 200 mg에 해당하는 추출액을 internal standard로서 1 mL 2-CHCH (0.5 μg·mL^{-1} in *n*-hexane)과 함께 column에 흡착시켰다. 3 mL·min^{-1}의 유속으로 150 mL *n*-hexane을 용리하여 제거한 후, 2% diethylether/*n*-hexane 혼합용매 (v/v) 300 mL을 용리용매로 분리하였다. 용리용매는 rotary vacuum evaporator로 10 mL 이하로 농축하여 N_2 gas를 이용하여 용리용매를 전부 휘발시킨 뒤 *n*-hexane 1 mL을 첨가하고 GC용 vial에 회수하였다. GC/MS 분석에 사용되는 분석기기는 Shimadzu QP 2010 Ultra (Kyoto, Japan)을 사용하였으며 시료의 이온화는 electron impact ionization (EI) 방법으로 실시하였다. GC/MS 분석조건은 ionization voltage 70 eV로 하였고 ion source와 injector 온도는 각각 230와 250°C로, carrier gas는 helium을 사용하였으며, 유속은 1.0 mL·min^{-1}으로 하였다. 온도 program은 55°C에서 1분간 유지하고 15°C·min^{-1} 속도로 300°C까지 승온시키고 1분간 유지하였다. 시료는 1 μL를 주입하고 splitless로 분석하였다. Capillary column은 DB-5MS Ultra Inert (길이 30 m×내경 0.25 mm×필름 두께 0.25 μm, J&W Scientific, USA)를 이용하였다. 정량분석을 위해 selected ion monitoring 방법을 이용하여 m·z^{-1} 98과 112 ion을 모니터링하였다. 또한 2-CHCH, 2-dDCB 및 2-tDCB를 0.25~2.5 μg·mL^{-1}으로 조제하여 작성한 표준검량선으로 2-ACBs를 정량하였다.

5. 고체상 미량추출-기체그로마토그래프/질량분석 (SPME-GC/MS)

조사처리된 시료의 SPME-GC/MS 분석에 앞서 분석조건의 최적화 및 2-dDCB 표준물질을 이용하여 분석법의 밸리데이션을 실시하였다. 분석조건 최적화 확립을 위해 조사처리를 하지 않은 대두 시료는 분쇄기(MIS-30S, Dongyang Magic, Seoul, Korea)를 이용하여 분말화시킨 후 18 mesh 체를 통과한 분말 시료 5 g에 2-dDCB 표준용액(10 μg·mL^{-1} in ethanol) 100 μL를 spiking하였으며, 10분간 질소를 이용하여 에탄올을 제거하였다. 이후 20 mL headspace vial (Gerstel, Muhlheim, Germany)에 담아 silicon/polytetrafluoroethylene septum으로 밀봉하였다. 첫 번째 분석조건으로 타겟물질인 2-dDCB의 흡착 효율이 가장 높은 추출 fiber 선정을 위해 4종의 SPME fiber들을 실험에 사용하였다. SPME fiber는 각각 polydimethylsiloxane (PDMS; film thickness, 100 μm), PDMS/divinylbenzene (PDMS/DVB; 65 μm), carboxen/PDMS (CAR/PDMS; 85 μm) 및 CAR/PDMS/DVB (CAR/PDMS/DVB; 50/30 μm)의 재질 및 특성이 다르게 코팅되어 있으며, Supelco사(Bellefonte, PA, USA)에서 구매하였다. SPME fiber는 실험 전 제조사의 사용 메뉴얼에서 제시한 온도 250°C에서 30분간 컨디셔닝을 실시하였으며, 임의 추출 온도 120°C에서 추출 시간 60분에서 상대적 피크 면적을 분석하여 비교하였다. 최적 추출 온도에 대한 실험으로 앞선 실험을 통해 선택된 fiber에 임의 추출 시간 60분으로 고정하여 추출 온도 80, 100, 120, 140, 160°C에 대한 평가를 실시하였다. 마지막으로 추출 시간 30~90분까지 10분 간격으로 이미 선택된 fiber와 추출 온도로 고정하여 추출 시간에 따른 비교 분석하였다. 분석기기는 자동 전처리 장치(MPS 2, Gerstel, Muhlheim, Germany)가 부착된 GC/MS (Agilent 6890/5975, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 HP-5MS Ultra Inert (diameter, 0.25 mm; length, 30 m; film thickness, 0.25 μm)를 사용하였다. SPME-GC/MS 분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

최적화된 분석법의 검증을 위해 선형성, 검출 한계(Limit of detection, LOD), 정량 한계(Limit of quantification, LOQ), 정밀도(반복성 및 재현성) 및 회수율을 5 g의 비조사처리 대두에 다양한 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μg)로 spiking된 시료를 사용하여 평가하였다. 선형성은 일원 분산 분석을 이용하여 직선성 범위와 상관계수(R^2)를 나타내었다. 검출 한계와 정

Table 1. Analytical conditions of the SPME-GC/MS analysis

Method		Analytical conditions
Solid-phase microextraction	Extraction temperature	80~160°C
	Extraction time	10~90 min
	Agitator speed	250 rpm
	Injection penetration	44 mm
	Desorption time	900 s
Gas chromatography	Column	DB-5MS Ultra inert capillary column (0.25 mm i.d × 30 m and 0.25 μm film thickness)
	Column flow	1.0 mL · min^{-1}
	Carrier gas	Helium (99.999%)
	Injection mode	Splitless mode
	Injection temperature	250°C
	Oven	120°C and held it for 5 min, 10°C · min^{-1} up to 160°C, 2°C · min^{-1} up to 220°C and held it for 10 min
Mass spectrometry	Interface temperature	280°C
	Ion source	EI + 70 eV
	Ion source temperature	230°C
	Scan range	40~350 m · z^{-1}
	Detection mode	Selected ion monitoring (SIM) for 98 and 112 m · z^{-1} ions

Table 2. Thermoluminescence analysis of gamma-irradiated soybeans at different doses

	Absorbed dose (kGy)						
	0	0.25	0.5	0.75	1	3	5
TL ratio (Decision[a])	0.008 ± 0.002 (−)	0.102 ± 0.076 (+)	0.245 ± 0.071 (+)	0.573 ± 0.09 (+)	0.522 ± 0.067 (+)	1.087 ± 0.165 (+)	1.114 ± 0.217 (+)

Mean ± standard deviation (n = 3)
[a]Decision was determined to be positive when the TL ratio of sample was greater than 0.1 or as negative when the ratio was less than 0.1.

량 한계는 다음 계산식에 의해 계산되었다. LOD = 3 × (sa/b), LOQ = 10 × (sa/b), 여기서 sa는 회귀선 y절편의 표준편차이고 b는 검량선 기울기이다. 정밀도는 반복성(같은 날 측정, n = 3)과 재현성(다른 날 측정, n = 9)을 측정하여 상대 표준편차의 백분율로 표시하였다. 회수율은 조사처리되지 않은 대두 5 g의 접종된 농도에 대한 보정 곡선으로 계산하였으며, 2-dDCB 농도를 백분율로 표시하였다. 이후 다양한 흡수선량으로 감마선 조사처리된 대두 시료는 최적화된 분석조건을 적용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. TL 분석

대두는 식품공전에 의거하여 조사처리식품 확인시험법 중 열발광법으로 조사처리 여부를 확인하고 있다. 열발광법은 높은 온도조건의 열을 광물질에 가하여 발광 에너지를 측정하는 분석법으로 향신료, 채소류 등 다양한 종류의 식품에 적용이 가능하고 조사처리 여부의 판별에 신뢰성이 높은 것으로 보고되어 있다(Sanderson *et al*. 1989).

다양한 흡수선량으로 감마선 조사처리된 대두의 열발광 분석 결과는 Table 2에 나타내었다. 모든 감마선 조사처리 시료에서 전형적인 방사선 조사 glow curve가 150~250°C 범위에서 확인되었으며, 조사처리되지 않은 시료는 특징적 glow curve를 나타내지 않고 자연방사능에 의한 낮은 곡선을 보였다. 또한 분리된 미네랄의 재조사 시험결과 비조사 시료는 TL ratio가 0.008로 양성 판정의 기준인 0.1 이하로 나타나 음성으로 판정되었으며, 감마선 조사된 대두시료의 경우 TL ratio가 0.102~1.114로 나타나 최저선량인 0.25 kGy 이상의 시료 모두 양성으로 판정됨에 따라 비조사 시료와 조사처리 시료 간의 판별이 명확하게 가능하였다.

열발광 측정 시 가하게 되는 50~400°C의 열에너지는 시

료 내에 존재하는 여기(excited state)된 전자들을 모두 방출시키게 된다. 이 원리를 이용하여 이미 TL을 측정(TL_1)한 검체에 1 kGy의 선량으로 재조사한 후 다시 TL 방법으로 측정(TL_2)하여 조사발광곡선이 나타나는 구역(150~250°C)의 면적 값을 비교(TL_1/TL_2)하면, 신뢰도가 높은 판별결과를 얻을 수 있다. TL ratio는 0.1 이하일 경우 비조사시료로 판정하며, 0.1 이상이면 조사처리된 시료로 판정토록 규정하고 있다(KFDA 2012). 한 등(2012)의 보고에 따르면 대두의 방사선 조사의 여부를 판별하는 데 있어 확인시험법으로서 열발광법은 매우 적합한 방법이라 보고하였다. 그러나 열발광법은 가열, 살균 등의 가공처리, 조사 원료의 혼입 여부, 마찰열 등의 물리적 인자에 매우 큰 영향을 받게 된다. 만약 소비자의 부정적인 인식을 피하기 위해서 조사처리 이후 의도적으로 세척 등의 가공처리를 한다면 더 이상 열발광법을 이용한 방사선 조사 판별은 불가능하다. 따라서 이를 해결하기 위한 화학적 확인시험을 통해 대두의 조사처리 판별이 필요할 것으로 생각된다.

2. GC/MS 분석

감마선 흡수선량에 따른 대두 내 2-ACBs 생성량 분석 결과를 Table 3에 나타내었다. 비조사구에서 2-ACBs는 검출되지 않았으며, 0.25~5 kGy로 조사된 대두에서 2-dDCB는 0.399~1.110 $\mu g \cdot g^{-1}$ lipid, 2-tDCB는 0.056~0.210 $\mu g \cdot g^{-1}$ lipid가 생성되었다. 2-dDCB ($R^2 = 0.988$)와 2-tDCB ($R^2 = 0.998$) 모두 조사선량이 증가함에 따라 생성량도 비례적으로 증가하여 선형의 관계를 나타냈다. 이는 식품 내 지방산에 방사선 에너지가 직접적으로 작용하여 전자의 재배열 및 라디칼 형성 등 화학적 반응에 의해 2-ACBs가 유도된 결과로 사료된다(Letellier and Nawar 1972).

지질의 방사선 분해산물인 2-ACBs는 UV, 마이크로웨이브 및 초음파 등 물리적, 화학적 처리에도 생성되지 않아 고유한 방사선 분해산물로 조사처리식품을 판별하는 마커로서 잘 알려져 있다(CEN 2003). 많은 연구자들에 의해 돈육, 우육, 계육 등 육제품을 비롯하여 망고, 캐슈넛 및 치즈 등 다양한 식품에서 2-dDCB와 2-tDCB의 생성 여부로 조사처리 여부 확인이 가능하다는 것을 보고한 바 있다(Rahman *et al*. 1996; Stewart *et al*. 2000; Obana *et al*. 2006). 본 실험 결과에서도 조사처리된 대두의 2-dDCB를 분석함으로써 최저 흡수선량인 0.25 kGy까지 조사 여부 판별이 가능하였다. 그러나 2-tDCB의 경우 판별 한계가 0.75 kGy로 나타남에 따라 대두의 확인시험 마커로서 사용되기에는 2-dDCB에 비해 감도가 낮다는 한계점을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로 화학적 확인시험법인 2-dDCB에 대한 GC/MS 분석법이 열발광법을 대체할 수 있는 대안이 될 것으로 판단된다. 그러나 GC/MS 분석법은 지방 추출 및 정제과정을 거쳐야 하므로 전처리 작업이 복잡하고 숙련된 인원이 필요하며 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 따라서 대두의 방사선 조사 여부를 판별하는 데 있어 전처리의 단순화 및 분석시간 단축 등을 통해 간단하고 신속분석이 가능한 분석법 개발이 필요하다.

3. SPME-GC/MS 분석법 최적화

SPME 추출기법은 시료와 fiber 사이에서 분석물의 분배과정과 fiber에 농축된 분석물질을 GC/MS에서 탈착하는 과정으로 되어 있다. SPME의 경우 분석 시 시료의 전처리가 매우 중요하며 이 과정이 경제성과 효율성 및 선택성 시료에 대한 적응성을 가질 수 있는 방법을 선정해야 한다(Schmidt 2015). 2-ACBs 실험 결과에 따라 2-dDCB를 조사처리된 대두의 확인시험 마커로서 선정하여 머무름시간, 피크면적 및 mass spectrum을 비교하여 fiber 선정, 추출 온도 및 추출 시간을 비교하여 조건에 따른 2-dDCB의 분석 효율성을 평가하였다(Fig. 1).

상용화된 4종의 SPME fiber (PDMS, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB)에 대한 2-dDCB의 상대적 피크면적 평균값은 PDMS/DVB fiber에서 다른 fiber에 비해 높게 나타났다(Fig. 1a). 피크면적에 따른 흡착비율을 평가해 볼 때 2-dDCB에 대한 PDMS, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS의 흡착비율은 PDMS/DVB에 비해 각각 66, 0.7, 8.4%로 수준으로 나타났다. SPME 추출 조건 중 최적의 fiber 선정은 분석물의 감도와 특이성을 향상시키기 위해 중요한 부분이다. 일반적으로 PDMS fiber는 주로 비극성 물질들의 전처리에 사용되는 것으로 알려져 있다. 저분자량의 시료에는 미세기공이 있는 CAR/PDMS fiber가 권장되며, 분자량 범위가 넓은 화합물에

Table 3. GC/MS analysis of 2-alkylcyclobutanones detected in gamma-irradiated soybeans (Unit: $\mu g \cdot g^{-1}$ lipid)

	Absorbed dose (kGy)						
	0	0.25	0.5	0.75	1	3	5
2-dDCB	ND[a)]	0.399±0.007	0.419±0.002	0.440±0.002	0.501±0.027	0.728±0.011	1.110±0.014
2-tDCB	ND	ND	ND	0.056±0.005	0.068±0.001	0.135±0.002	0.210±0.008

Means±standard deviation ($n = 3$)
[a)]Not detected

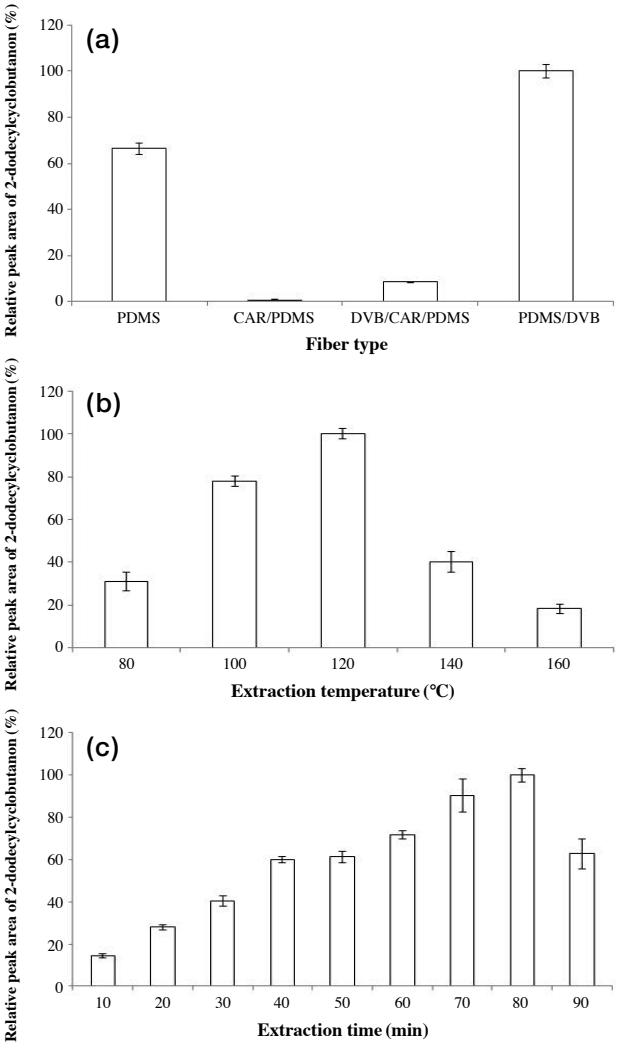

Fig. 1. Optimization of extraction conditions for fiber types (a), extraction temperatures (b), and extraction times (c).

는 DVB/CAR/PDMS fiber가 쓰인다. PDMS/DVB fiber는 다른 fiber에 비해 공극크기가 크고 50~300 정도 분자량대 물질들의 분석에 사용된다(Luo *et al*. 2014). 또한 휘발성과 반 휘발성 화합물의 특성을 분석하기 위해서는 극성과 비극성의 화합물을 잘 흡착할 수 있는 적합한 조합으로 코팅된 fiber를 선택하여야 한다. 본 실험 결과 확인시험 마커인 2-dDCB의 분자량은 238.41 g·mol^{-1}로서 다른 fiber에 비해 PDMS/DVB fiber와 친화력이 크게 작용함에 따라 추출 효율이 높은 것으로 사료된다. 따라서 분석의 재현성과 정확성을 고려하여 이후의 모든 실험에서는 PDMS/DVB fiber를 사용하였다.

추출 온도는 추출하는 동안 SPME fiber와 시료 사이에 평형을 이루는 데 중요한 영향을 미치는 인자이다(Louch *et al*. 1992). SPME fiber가 headspace 부분에 머무르며 휘발되어지는 목표물질을 흡착하는 데 있어 추출 온도가 추출 효율에 큰 영향을 준다. 따라서 추출 효율을 높이기 위해 SPME 전처리 장치의 온도를 80, 100, 120, 140, 160°C까지 변화시켜 추출 온도에 따른 2-dDCB에 대한 추출 효율을 평가하였다(Fig. 1b). 앞선 실험을 통해 선정된 PDMS/DVB fiber를 사용하였으며, 임의 추출 시간 60분으로 정하여 실험하였다. 추출 효율에 대한 온도의 영향을 2-dDCB의 피크면적으로 계산한 결과 추출 온도가 증가함에 따라 점차적으로 많은 2-dDCB가 fiber에 흡착되었다. 그러나 추출 온도가 140°C에 도달했을 때부터 감소하는 경향을 보였다. 주된 이유는 고온으로 인한 대두의 많은 향기성분이 휘발되어짐에 따라 2-dDCB의 흡착에 영향을 미쳤기 때문으로 판단된다. 일반적으로 저분자 물질들은 비교적 낮은 온도에서 쉽게 기화되지만 높은 분자량일수록 추출 온도가 증가하면 추출 효율이 점진적으로 증가한다고 보고된 바 있다(안 등 2014). 따라서 이후의 실험에서는 추출 온도를 120°C로 고정하여 실험하였다.

추출 온도를 비롯하여 추출 시간 역시 타겟 물질을 흡착하는데 있어 fiber와 시료가 평형을 이루어지도록 하는 SPME 분석법 개발에서 중요한 단계 중 하나이다. 2-dDCB의 추출 효율을 높이기 위해 앞선 실험 결과인 PDMS/DVB fiber와 추출 온도 120°C 조건 하에서 수행되었으며, 추출 시간 만을 30, 40, 50, 60, 70, 80 및 90분으로 변화를 주어 실험하였다. 실험 결과에서 볼 수 있듯이 추출 시간이 증가할수록 피크면적은 증가하다가 추출 시간 80분을 기점으로 90분에서 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1c). 고분자 물질들의 경우 동일한 전처리 조건들에서 흡착평형에 도달하는 시간은 30분 이상이 필요하고 평형상태에 도달한 이후에는 추출 효율이 대체적으로 일정하거나 감소되어지며, 특히 고분자 물질들의 경우 저분자 물질들에 비하여 추출 시간이 길어질수록 추출효율이 상승하는 것으로 보고하였다(Allard *et al*. 2012; Luo *et al*. 2014). 본 실험 결과 또한 2-dDCB의 추출 시간이 길어질수록 추출 효율이 상승하는 것을 확인할 수 있다. 또한 평형상태에 도달한 이후 추출 효율이 감소함에 따라 최적 추출 시간은 80분으로 결정하였다.

이상의 결과들을 통해서 SPME-GC/MS를 이용한 조사처리식품 확인시험법 개발을 위해 최적의 SPME 추출 조건인 PDMS/DVB fiber, 추출 온도 120°C 및 추출 시간 80분으로 설정하여 감마선 조사된 대두의 조사처리 여부 판별 실험을 진행하였다.

4. SPME-GC/MS 분석법 검증

최적화된 SPME-GC/MS 분석법의 정확성을 평가하기 위해 2-dDCB 표준물질을 5 g의 비조사처리된 대두에 다양한 농도(0.01~1 μg)로 spiking하여 직선성 범위(linearity range), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 시료의 반복측정에 따른 정확도(precision) 및 회수율(recovery rate)에 대하여 조사하였다(Table 4). 결정 계수에 기초하여 보정 곡선은 시험 된 농도 범

Table 4. Validation parameters for the optimized SPME-GC/MS method

Sample	Test range	Linearity		Limit of detection	Limit of quantification	Precision (%)		Recovery rate (%, $n = 3$)
		Calibration curve	Determination coefficient (R^2)			Repeatability (same day, $n = 3$)	Reproducibility (3 different days, $n = 9$)	
Non-irradiated soybeans spiked with 2-dodecylcyclobutanone	0.01~1 μg spiked in 5 g of sample	$y = 2{,}134{,}485x + 22{,}687$	$R^2 = 0.9972$	0.053 μg	0.161 μg	7.98	9.57	93.42

위에서 $R^2 = 0.9972$로 신뢰할 수 있는 선형이었다. 검출한계 및 정량한계는 각각 0.053 및 0.161 μg으로 나타났다. 본 분석법의 정확도를 평가하기 위해 사용된 시료의 반복 측정에 따른 재현성 및 반복성을 측정한 결과 상대표준편차가 각각 7.98 및 9.57%로 양호하게 나타났다. 회수율 역시 93.42%로 FDA 지침에 따라 허용되는 80~120% 회수 범위는 크로마토그래피 방법의 검증을 위해 많은 사람들이 수용할 수 있는 것으로 간주된다(US FDA-CDER 1994). 분석법의 검증은 분석법 개발의 품질을 보증하는 단계로, 분석법의 정확성과 설정된 목적에 대한 적합성을 확인하는 데 사용된다. 이러한 분석법의 검증을 통해 최적화 된 SPME-GC/MS 분석법을 이용하여 방사선 조사된 대두의 검지 여부를 판별하는 데 있어 우수한 데이터 품질을 보장할 수 있게 설계된 것으로 생각된다.

최적화된 추출 조건 하에서 SPME-GC/MS 방법을 사용하여 비조사 대두와 조사처리된 대두에 대한 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 조사처리되지 않은 대두에서 2-dDCB는 검출되지 않았으나, 0.25~5 kGy의 선량으로 감마선 조사처리된 모든 샘플은 조사처리된 것으로 명확하게 판단할 수 있었다. 조사처리 식품의 검지를 위한 SPME-GC/MS 분석은 Caja *et al*. (2008)의 연구에서 처음 제안되었다. 연구 결과 감마선 조사처리된 쇠고기를 분석한 결과 2 kGy의 흡수선량으로 조사처리된 시료에는 명확하게 구분할 수 없었으며, 더 높은 선량인 4, 8 kGy 조사처리구들은 비조사구와의 차이를 확인할 수 있었다고 보고하였다. 후속 연구로 SPME 조건의 최적화에 의해 0.5 kGy의 흡수선량으로 조사처리된 쇠고기에서도 검지가 가능하였으며, 0.5~8 kGy로 조사선량이 증가할수록 2-dDCB 함량이 비례적으로 증가한다는 것을 입증하였다(Blanch *et al*. 2009; Soncin *et al*. 2012). 본 연구의 결과 역시 흡수선량에 대한 선형반응을 나타내었으며 ($R^2 = 0.9989$), 이는 미지의 샘플의 흡수선량을 추정하는 자료로 사용될 수도 있다. 본 실험의 결과에서는 이전 실험의 최저 흡수선량(0.5 kGy)보다 낮은 0.25 kGy에서 조사처리된 대두에서도 명확하게 조사 여부를 판별할 수 있음을 확인하였으며, 이는 열발광법 및 GC/MS 분석법의 단점인 장시간의 분석시간을 보완하여 대두의 조사처리 여부 확인을 신속하게 수행할 수 있는 새로운 확인시험 방법으로 적용이 가능할 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 다양한 흡수선량(0.25~5 kGy)으로 감마선 조사처리된 대두의 조사처리 여부를 확인하기 위해 화학적 확인시험법인 가스크로마토그래프/질량분석법(gas chromatograph/mass spectrometry, GC/MS) 및 고체상 미량

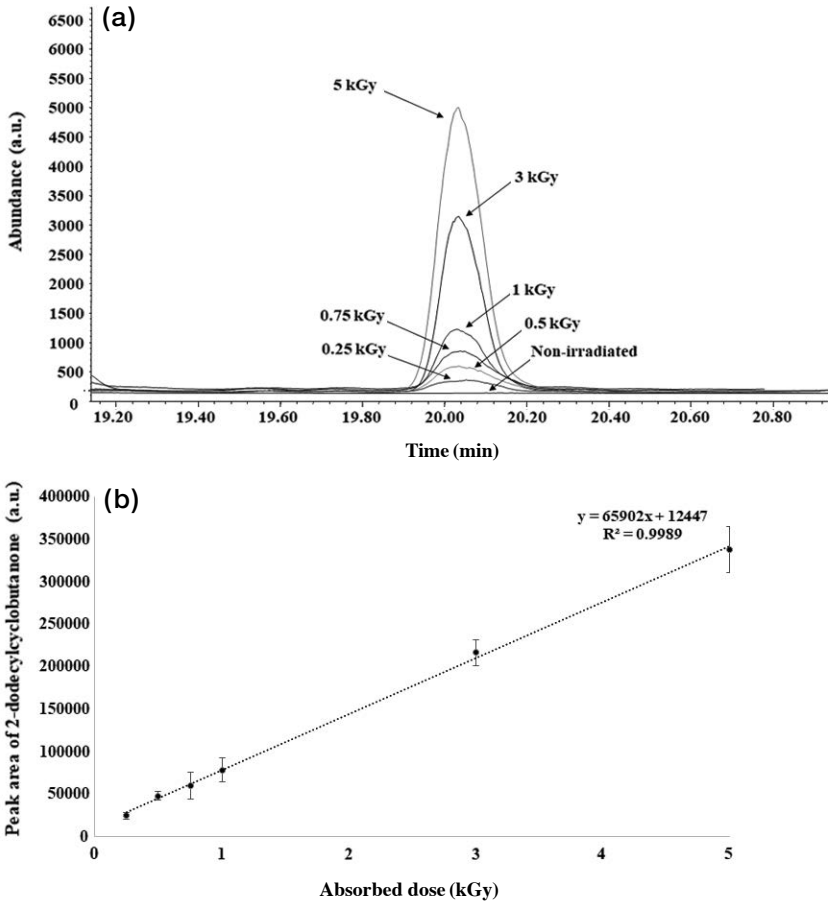

Fig. 2. Chromatograph (a) and regression line (b) for 2-dodecylcyclobutanone in soybeans gamma-irradiated at various doses analyzed by SPME-GC/MS method.

추출법(solid-phase microextration, SPME)과 GC/MS가 결합된 분석법(SPME-GC/MS)의 적용 가능성을 살펴보았다. 현재 식품공전에 공인된 시험법인 열발광법으로 0.25 kGy 이상의 흡수선량으로 조사처리된 대두를 명확하게 식별할 수 있었으나, 세척, 가열, 빛 에너지 등에 노출되는 경우 판별이 불가능할 수 있다. 이에 대한 대안으로 화학적 확인시험법의 적용이 필요하며 GC/MS를 이용한 2-alkylcyclobutanone 분석 결과 열발광법과 유사하게 0.25 kGy 조사처리 시료까지 판별이 가능하였다. 또한 신규 화학적 확인시험법인 SPME-GC/MS 분석법 역시 2-dodecylcyclobutanone 분석을 통해 0.25 kGy 이상으로 조사처리된 시료의 판별이 가능하였으며, 특히 이 방법은 유기용매를 이용한 별도의 전처리 과정이 필요하지 않아 간편하고 신속한 조사식품 확인시험법으로서 활용도가 높을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 과학기술정통부의 재원으로 한국원자력연구원의 주요사업(523240-20)에 의해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

권중호. 2010. 조사식품의 안전성과 이해. 한국식품안전연구원. 서울, 한국.

권중호, 변명우, 조한옥. 1984. 고춧가루의 살균을 위한 감마선 조사효과. 한국식품영양과학회지. **26**:188-192.

식품의약품안전평가원. 2012. 조사식품의 분석 지침서.

안준건, 심원준, 하성용, 임운혁. 2014. HS-SPME-GC/MS를 이용한 해수 내 유류계 방향족탄화수소 분석법. 한국해양환경에너지학회지. **17**:27-35.

정미선, 안재준, 카시프 아크람, 김귀란, 김현구, 권중호. 2012. 물리적 확인시험법을 이용한 시판 유통 중인 고춧가루의 방사선 조사 여부 판별 모니터링. 한국식품과학회지. **44**(6):673-679.

한국농수산식품유통공사. 2019. 식품산업 원료소비 실태조사. 나주, 한국

한인준, 윤영민, 최수정, 송범석, 김재경, 박종흠, 이주운, 김재훈, 김규헌, 조태용, 윤혜성, 한상배, 이정은. 2012. PSL, TL 및 ESR 분석을 통한 수입산 들깨, 아몬드 및 대두의 방사선 조사 여부 판별 특성. 방사선산업학회지. **6**(4): 305-310.

Allard S, Charrois JWA, Joll CA and Heitz A. 2012. Imultaneous analysis of 10 trihalomethanes at nanogram per liter levels in water using solid-phase microextraction and gas chromatography mass-spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1238**:15-21.

Barba C, Santa-Maria G, Herrauz M and Calvo MM. 2012. Rapid detection of radiation-induced hydrocarbons in cooked ham. *Meat Sci*. **90**:697-700.

Blanch GP, Caja MM, Flores G and Ruiz del Castillo ML. 2009. Identification of 2-dodecylcyclobutanone and linear-alkanes as irradiation markers in sliced dry-cured ham. *Food Chem*. **113**:616-620.

Caja MM, Ruiz del Castillo ML and Blanch GP. 2008. Solid phase microextraction as a methodology in the detection of irradiation markers in ground beef. *Food Chem*. **110**:531-537.

CEN. 2001. EN 1788: Foodstuffs - Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated. European Committee of Standardization (CEN), Brussels, Belgium.

CEN. 2003. EN 1785: Foodstuffs - Detection of irradiated food containing fat - Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. European Committee of Standardization (CEN), Brussels, Belgium.

Farkas J. 2006. Irradiation for better foods. *Trends Food Sci. Technol*. **17**:148-152.

Hallman GJ. 2012. Generic phytosanitary irradiation treatments. *Radiat. Phys. Chem*. **81**:861-866.

IAEA. 1996. Clearance of item by name. Food Irradiation Newsletter, 20, Supplement-2. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

Korea Food and Drug Administration (KFDA). 2004. Korean Food Code. Osong, Korea.

Letellier PR and Nawar WW. 1972. 2-Alkylcyclobutanones from the radiolysis of triglycerides. *Lipids*. **7**:75-76.

Louch D, Motlagh S and Pawliszyn J. 1992. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem*. **64**:1187-1199.

Luo Q, Chen X, Wei Z, Xu X, Wang D and Wang Z. 2014. Simultaneous and high-throughput analysis iodo-trihalomethanes, haloacetonitriles, and halonitromethanes in drinking water using solid-phase microextraction/gas chromatographymass spectrometry: an optimization of sample preparation. *J. Chromatogr. A*. **1365**:45-53.

Obana H, Furuta M and Tanaka Y. 2006. Detection of 2-alkylcyclobutanones in irradiated meat, poultry and egg after cooking. *J. Health Sci*. **52**:375-382.

Rahman R, Haque AKMM and Sumar S. 1996. Cyclobutanones as markers for irradiated samples of Brie and Camenbert. *Nahrung* **40**:55-59.

Sanderson DCW, Slater C and Cairns KJ. 1989. Detection of irradiated food. *Nature* **340**:23-24.

Schmidt K and Podmore I. 2015. Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. *J. Mol. Biomark. Diagn*. **6**(6):1-11.

Soncin S, Panseri S, Rusconi M, Mariani M, Chiesa LM and Biondi PA. 2012. Improved determination of 2-dodecylcyclobutanone in irradiated ground beef patties by gas-chromatography-mass-spectrometry (GC/MS) coupled with solid-phase microextraction (SPME) technique. *Food Chem*. **134**:440-444.

Stewart EM, Moore S, Graham WD, McRoberts WC and Hamilton JTG. 2000. 2-Alkylcyclobutanones as markers for the detection of irradiated mango, papaya, Camembert cheese and salmon meat. *J. Sci. Food Agric*. **80**:121-130.

United States Food and Drug Administration-Center for Drug Evaluation and Research (US FDA-CDER). 1994. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. United States Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation Research. Washington, DC.

WHO. 1981. Wholesomeness of irradiated food. Report of joint FAO/IAEA/WHO expert committee. Technical Report Series-659. Geneva, Switzerland.

Received: 27 March 2020
Revised: 10 April 2020
Revision accepted: 26 April 2020