

초임계유체 추출공정을 이용한 감마선 조사 대두의 hydrocarbon류 검출 특성

홍주현 · 이원영*

대구신기술사업단 전통생물소재산업화센터, *상주대학교 식품공학과

Detection Characteristics of Hydrocarbons from Irradiated Soybean by Supercritical Fluid Extraction

Joo-Heon Hong and Won-Young Lee*

DG-Traditional Bio-Materials Industry Center

*Department of Food Engineering, Sangju National University

Abstract

Radiation-induced hydrocarbons from the irradiated soybean were investigated to compare the chemical properties of irradiated and non-irradiated foodstuff. The soybean was gamma-irradiated at 2 kGy and the lipid was extracted by hexane or supercritical carbon dioxide with co-solvents. Hydrocarbons were separated by florisil column chromatography and then analyzed with GC-MS method. Hydrocarbons, such as 1,7-hexadecadiene (C16:2), 1,7,10-hexadecatriene (C16:3), 8-heptadecene (C17:1) and 6,9-heptadecadiene (C17:2), were predominantly detected in soybean. The characteristic of extracts was found that the increase of the pressure and the temperature in supercritical fluid extraction condition has made extraction of volatile hydrocarbons possible and more rapidly. It could be concluded that the supercritical fluid extraction was alternative extraction method for the detection for irradiated foodstuffs.

Key words : irradiated soybean, hydrocarbon, SFE, co-solvent

서 론

새로운 식품가공 및 저장 방법으로 알려진 감마선 조사는 이용대상 식품에 대해 성장억제, 속도조정, 저장수명 연장, 살충, 살균 및 건조식품의 물성 개선 등에 탁월한 효과가 입증되면서 수출입 식품의 위생적 품질 보증 및 검역처리로서 활용 가능성이 확인되고 있으며 우리나라를 포함한 세계 52개국에서 사용이 허가 되어 있다. 방사선 조사식품은 그 안정성이 관련 국제기구인 Food and Agriculture Organization(FAO), World Health Organization(WHO), International Atomic Energy Agency (IAEA) 등에 의해 인정되었고, 조사식품에 대한 Codex 일

반 규격이 채택되면서 식품의 방사선 조사는 증가 추세에 있다(Kwon *et al.*, 2000; FDA, 1986; Codex, 1984).

특히 방사선 조사는 근래에 들어 살충 및 살균 화학 물질의 사용이 억제되고 있는 데 따른 가장 유망한 대체 방법으로 대두되고 있기 때문에 이를 사용하면서도 소비자들의 반응을 염려하거나 방사선 조사 식품의 판별이 어렵다는 점 때문에 표시 없이 수출할 가능성이 크다. World Trade Organization(WTO) 체제하에서 농수산물 등 식품의 교역이 크게 늘어날 것을 전망한다면, 방사선 조사식품의 수출입 관리 및 유통 관리뿐만이 아닌 국내에서 생산되는 방사선 식품의 유통 관리를 위한 조사 여부 판별 기술이 필요한 실정이다(Hwang *et al.*, 1998a).

방사선 조사 식품의 검지 또는 확인에 관한 연구는 1980년대 중반 이후부터 방사선 조사식품의 교역이 예상되면서 본격 시작되었다. 특히 검지기술

Corresponding author: Won-Young Lee, Department of Food Engineering, Sangju National University, 386 Gajangdong, Sangju, Gyeongsang Buk-do, 742-711, Korea.
Phone: +82-54-530-5261. Fax: +82-54-535-7251
E-mail: wylee@sangju.ac.kr

의 연구는 세계소비자연맹(IOC)의 요구와 더불어 일부 EU 국가들에 의해서 시작되어 지금까지 개발되고 있다. 방사선 조사에 의해 야기되는 변화로는 대개 free radical의 생성, 혼입된 미네랄의 열발광 특성, 점도저하, hydrocarbon류 생성, DNA 이중쇄 염기의 변화, 미생물수의 감소, 발아력 저하 등이 알려지고 있으며(IAEA, 1991), 이를 토대로 한 thermoluminescence(TL)(Hwang *et al.*, 1998b), electron spin resonance(ESR)(Desrosiers와 Eclaughlin, 1998), GC 또는 GC-MS를 이용한 hydrocarbon 및 alkylcyclobutanone 분석(Horvatovich *et al.*, 2000) 등이 활발히 연구되어 지고 있다(Lee *et al.*, 2001).

Hydrocarbon류의 검출 방법은 대부분 동물성 식품을 대상으로 연구가 진행되어 왔으며 지방이 많이 함유된 대두, 참깨, 잣, 땅콩 등과 같은 식물성 식품의 경우 제한적으로 연구가 수행되어 지고 있다(Hwang *et al.*, 1998a). 하지만 지방 추출 과정에 있어서 흔히 사용되고 있는 용매 추출법은 적절한 용매의 선택, 용매의 제거 및 낮은 분리 효과 등의 어려움이 있다(Shin *et al.*, 2002). 무엇보다도 추출 시간이 오래 걸리고 유기 용매의 사용이 많은 점에서 비효율적이다.

따라서 본 연구에서는 수입량이 증가하고 있는 대두를 이용하여 분석의 전처리 기술로 선택적 추출이 가능하며, 용매 제거가 용이하고 추출 시간을 단축시킬 수 있는 초임계유체 추출공정(supercritical fluid extraction, SFE)을 이용하여 불포화 지방산이 다량 함유되어 있는 대두에 방사선을 조사한 후 조사에 의해 유래된 hydrocarbon류를 분석하여 초임계유체 추출공정을 방사선 조사 여부 판별을 위한 전처리 기술로서 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

대두는 2003년에 수확된 것으로 경북 상주시의 농가로부터 구입하였고 시료의 방사선 조사는 CO_60 감마선 조사시설(한국원자력연구소, KAERI)을 이용하여 실온에서 시간당 일정한 선량률로 2 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며, 흡수선량의 오차는 $\pm 5\%$ 미만이었다. 감마선 조사시료와 대조시료는 분쇄하여 표준망체를 사용하여 일정하게 분리한 후 실온에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

용매 추출

시료로부터의 지방 추출은 Choi와 Hwang(1997)

의 방법에 준하여 Na_2SO_4 와 n-hexane을 사용하여 추출 하였으며, 원심분리(3400 rpm, $4^\circ C$, 20 min)하여 상층액을 취해 rotary vacuum evaporator (EYELA N-1000, Japan)를 사용하여 $40^\circ C$ 이하에서 용매를 휘발시켜 지방질을 얻었다.

초임계유체를 이용한 추출

실험에 사용된 초임계유체 추출장치는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 cooling head가 장착된 HPLC pump(pu-980, JASCO Co., Japan)와 보조용매를 공급하는 또 다른 HPLC pump, extraction vessel이 설치되어 있는 air-driven oven(CO-965 column oven, JASCO Co., Japan), 수집용기에 effluent가 포집될 수 있는 전자식 back-pressure regulator(880-01, JASCO Co., Japan)로 나누어져 있다. 한편 각 추출 공정의 변수인 압력과 온도는 back-pressure regulator와 air-driven oven에 의해 각각 조절할 수 있도록 제조되어 있다.

시료 30 g을 추출용 vessel에 충전하여 각각의 압력(150 bar, 200 bar, 250 bar), 온도($40^\circ C$, $50^\circ C$, $60^\circ C$)에서 CO_2 유속 2 mL/min으로 60분간 추출하여 지방 수율에 따른 가장 추출 효율이 좋은 조건 하에서 보조 용매 ethanol, methanol, acetone, chloroform, pentane을 첨가하여 추출 하였다.

Hydrocarbon의 분리

Hydrocarbon 분리에 사용된 hexane은 모두 HPLC 용(Merk, Germany)이었다. Hydrocarbon 분리에 사용된 chromatography용 florisil(Fisher Scientific, U.S.A., 60~100 mesh)은 휘발성 유기오염물질을 제거하기 위하여 $550^\circ C$ 회화로에서 하루 밤 태워 상온으로 식힌 후 무게비로 3% 물을 가한 뒤 균질화하고, 이를 12시간 이상 방치 후 불활성화시켜 충전제로 사용하였다. Teflon stopcock가 부착된 유리 column(2.3×20 cm)을 n-hexane으로 씻은 후 25 g의 불활성화시킨 florisil을 충전하였다. 정량분석을 위하여 추출 지방질 1 g에 n-eicosane($4 \mu g/mL$ n-hexane)을 internal standard로 첨가하고 florisil column에 가한 뒤 1.5 mL/min 속도로 60 mL를 받아 내용물이 약 5 mL가 될 때까지 rotary evaporator ($40^\circ C$, 355 mbar)로 농축한 후 0.5 mL까지 고순도 질소(99.99%)로 농축하여 GC-MS 분석용 시료로 사용하였다(Lawrence *et al.*, 1997; Lesgards *et al.*, 1993).

GC-MS 분석

분리한 hydrocarbon류의 GC-MS 분석기기는

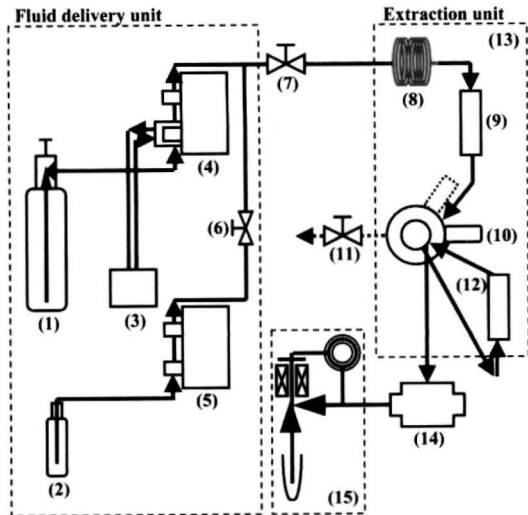


Fig. 1. Flow diagram of supercritical extraction system.

- (1) Liquid carbon dioxide cylinder
- (2) Modifier
- (3) Cooling circulator
- (4) CO₂ pump with cooling jacket
- (5) Modifier pump
- (6) Stop valve
- (7) Stop valve
- (8) Pre-heating coil
- (9) Mixer
- (10) Line switching valve
- (11) Stop valve
- (12) Extraction vessel
- (13) Oven
- (14) UV-Detector
- (15) Back pressure regulator

소량 검출되기 때문에 marker로 활용하는 데에는 문제가 있다고 보고하였다.

Table 2는 용매 추출 및 초임계유체 추출공정의 marker로 활용 가능한 hydrocarbon류의 검출량을 비교하였다. Choi와 Hwang(1997)은 용매 추출공정에 비해 초임계 추출공정에 의해 추출된 hydrocarbon류의 검출량이 더 많았다고 보고하였다. 대두에는 linoleic acid유래의 17:2와 16:3, oleic acid 유래의 17:1과 16:2가 각각 예상대로 검출되었다. 따라서 간단히 온도와 압력을 변화시켜 용해력을 조절할 수 있으며 용매추출법보다 사용 용매의 범위가 넓을 뿐만 아니라 사용되는 용매는 미량이므로 분석시 환경오염을 줄일 수 있는 초임계추출 방법이 감마

Table 2. Quantity of hydrocarbons detected from a irradiated soybean by solvent and supercritical fluid extraction(SFE). (SFE conditions : pressure 200 bar, temperature 50°C, CO₂ flow rate 2 mL/min, extraction time 60min)

Method	Hydrocarbon (µg/g)			
	16:3	16:2	17:2	17:1
Solvent extraction	2.13	1.10	1.85	0.58
SFE	4.80	4.40	6.08	4.01

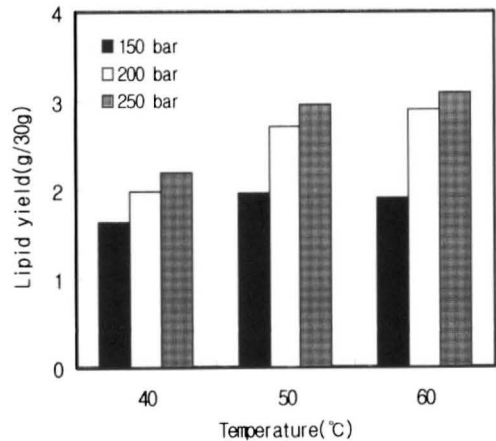


Fig. 2. Quantity of lipid from soybean as a function of extraction temperature at various pressures in SFE(CO₂ flow rate 2.0 mL/min, extraction time 60min).

선조사 시료의 hydrocarbon류의 추출방법으로 적용 가능하다 생각된다.

초임계 이산화탄소를 이용한 지방 추출

Hydrocarbon 분리에 필요한 지방을 추출하고자 초임계유체 추출공정을 적용하여 최적 조건을 선정하고자 하였다. 분쇄한 대두를 초임계유체로 각각의 다른 온도, 압력에 따라 추출하여 초임계유체 추출공정에 대한 지방 추출량을 측정하였다. 추출 압력 및 온도에 따라 추출된 대두 지방의 추출량을 Fig. 2에 나타내었다. 압력이 증가할수록 지방 추출량은 증가하는 경향을 보였으나 200 bar이상의 압력에서는 압력 증가에 따른 증가폭이 다소 완화되었다. 온도 변화에 따른 지방의 추출량은 온도가 높아짐에 따라 지방추출량은 증가하였으나 50°C 이상에서는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 온도를 상승시키면 열역학적으로 matrix 내부 용질로의 열전달이 보다 강렬해지고, 용질은 증기압이 높아져 초임계 이산화탄소에서 보다 쉽게 용해된다. 그러나, 온도가 증가할 때 초임계 이산화탄소의 밀도는 감소하므로 용해도는 감소하게 된다(Juncheng et al., 2001). 따라서 추출의 효율성을 고려할 때 최적 조건은 압력 200 bar, 온도 50°C로 생각된다.

Fig. 3은 초임계유체 추출공정을 이용한 감마선 조사여부에 따른 대두의 hydrocarbon류 분석 chromatogram이다. 대두의 지방산 조성은 linoleic acid, palmitic acid, oleic acid 등의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 이들 결과에서 보면 linoleic acid로부터

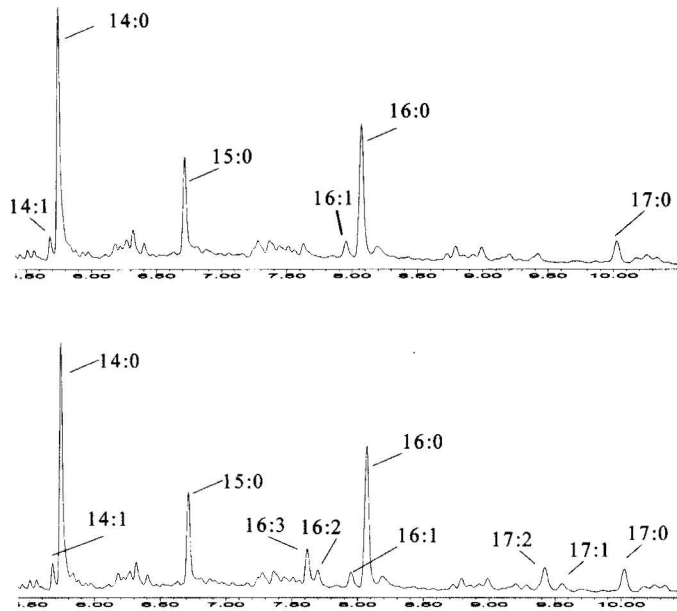


Fig. 3. GC-MS chromatograms of hydrocarbons detected in irradiated soybean by SFE(up; non-irradiated soybean, down; 2 kGy-irradiated soybean).

생성되는 16:3과 palmitic acid로부터 생성되는 15:0의 피크가 가장 크게 나타나 Lee et al.,(2001)의 결과와 유사하였다.

보조 용매별 hydrocarbon류의 검출 특성

실험결과 가장 효율적인 추출조건인 200 bar, 50°C에서 초임계 이산화탄소 유속 2 mL/min에 보조용매에 따른 hydrocarbon류 검출특성을 확인하고자 극성이 다른 ethanol, methanol, acetone, chloroform, pentane을 보조용매로 하여 유속 0.2 mL/min로 하여 60분간 추출한 결과를 Fig. 4와 5에 나타내었다. Fig. 4는 초임계유체인 CO₂와 보조용매를 첨가하였을 경우의 추출되는 지방량을 비교한 것으로 CO₂만을 사용한 것과 pentane을 보조용매로 사용한 것을 제외한 나머지 보조용매 모두에서 지방 추출량이 증가하였으며, acetone을 보조용매로 사용한 경우가 가장 많이 추출되었다. Fig. 5는 marker로 사용될 수 있는 hydrocarbon류를 GC-MS로 분석한 결과를 나타낸 것이다. Acetone을 보조용매로 사용하였을 경우 다른 보조용매에 비해 대략 2-3배 정도 hydrocarbon류가 높게 검출되었으며 지방 추출량이 낮게 나타난 pentane의 경우도 비교적 hydrocarbon류가 높게 검출되었다. 이에 비해 ethanol과 chloroform의 경우 지방 추출량은 높게 나타났지만 hydro-

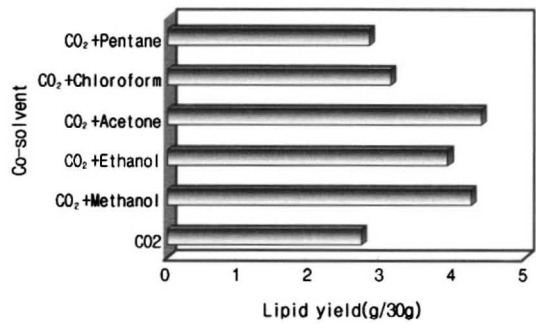


Fig. 4. Quantity of lipid extracted from irradiated soybean at various co-solvent in SFE(Extraction conditions : 200 bar, 50°C, 60min, CO₂ flow rate 2.0 mL/min, Co-solvent flow rate 0.2 mL/min).

carbon류는 낮게 검출되어 보조용매의 종류에 따라 상이 하였다. 보조용매에 따른 hydrocarbon류 검출량의 차이는 hydrocarbon, 보조용매, 그리고 CO₂ 간의 복잡한 상호작용 때문이라고 보고되고 있다 (Tewfik et al, 1998; Lee et al., 1999).

이러한 결과로 볼 때 200 bar, 50°C조건에서 acetone을 보조용매로 사용하였을 때 초임계 유체 추출 공정은 감마선 조사 여부 검지 기술에 있어서 hydrocarbon류 추출의 전처리 방법으로 활용 가능 하리라 사료된다.

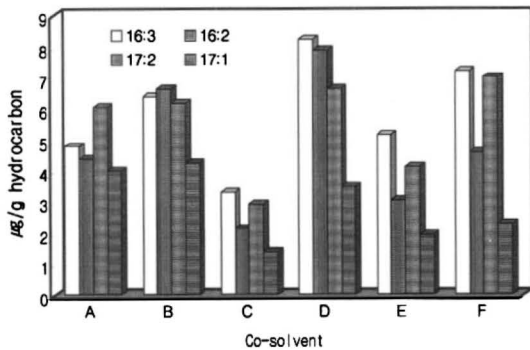


Fig. 5. Quantity of hydrocarbons detected from irradiated soybean at various co-solvent in SFE(A; CO₂ B; CO₂+Methanol, C; CO₂+Ethanol, D; CO₂+Acetone, E; CO₂+Chloroform, F; CO₂+Pentane).

Extraction conditions : 200bar, 50°C, 60min, CO₂ flow rate 2.0 mL/min, Co-solvent flow rate 0.2 mL/min.

요 약

감마선조사 대두에서 hydrocarbon류 검출을 위한 검지 전처리 기술로 초임계유체 추출공정을 활용하고자 하였다. 용매 추출에서와 같이 초임계유체 추출공정을 이용하여 검출된 hydrocarbon류는 동일하게 검지되었으며 그 marker로써 활용 가능한 hydrocarbon류인 16:3, 17:2, 16:2, 17:1은 비조사 대두에서는 검출되지 않았다. 초임계유체 추출조건에 따른 지방함량은 추출압력과 온도가 증가함에 따라 증가하였으며, 가장 효율적인 조건은 압력 200 bar, 온도 50°C구간이었다. 보조 용매를 사용한 초임계유체 추출 공정에서 추출된 지방함량은 용매 추출 구간보다 많았으며 보조용매별 hydrocarbon류의 검출량은 methanol을 제외하고 전반적으로 우수하였다. 특히 acetone의 경우 추출된 hydrocarbon류는 CO₂만을 사용한 초임계유체 추출공정에서 보다 2배 이상 많이 검출되어 초임계유체 추출공정을 이용한 hydrocarbon 추출에 유용한 보조용매임을 확인하였다.

참고문헌

Kwon, J.H., H.W. Chung and Y.J. Kwon. 2000. Infrastructure of quarantine procedures for promoting the trade of irradiated foods. Paper presented at symposium of the Korean Society of Postharvest Science and Technology for the safety of Food and Public Health Industries and Quality. Assurance, Daejeon, 13 October: 209-254
Codex Alimentarius Commission. 1984. Codex General

Standard for Irradiated Foods and Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatment of Foods. CAC/VOL.XV. FAO. Rome
Hwang, K.T., J.Y. Park and Y.J. Kwon. 1998a. Hydrocarbons Detected in Irradiated soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 517-522
IAEA. 1991. Analytical detection methods for irradiated foods. A review of current literature. *IAEA-tecdoc.* **587**: 172
Hwang, K.T., T.B. Uhm, U. Wagner and G.A. Schreiber. 1998b. Application of thermoluminescence to detecting post-irradiated of onion and garlic (in Korea). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 63-68
Desrosiers, M.F and W.L. Eclaughlin. 1989. Examination of gamma-irradiated fruits and vegetable by electron spin resonance spectroscopy. *Radiat. Phys. Chem.* **34**: 895-898
Horvatovich, P.M., Hasselmann, C. M. and E. Marchioni. 2000. Supercritical fluid extraction of hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones for the detection of irradiated foodstuffs. *J. Chromatography A.* **897**: 259-268
Shin, M.K., J.H. Hong, S.S. Hur and Y.H. Choi. 2002. Extraction of β -carotene in co-solvent induced SFE process. *Food. Engineering progress.* **6**: 301-307
Choi, C.R. and K.T. Hwang. 1997. Detection of hydrocarbons in irradiated and roasted sesame seeds. *JAOCS.* **74**: 469-472
Lee, E.Y., M.O. Kim., H.J. Lee., K.S. Kim. and J.H., Kwon. 2001. Detection characteristics of hydrocarbons from irradiated legumes of Korean and Chinese origins. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 770-776
Lawrence, D.H., C. Guoman, G.J. Edward, F. Luke, and A.L. Jhon, 1997. Identification of irradiated foodstuffs: A review of the recent literature. *Food Research International.* **30**: 249-264
Lesgards, G., J. Raffi, I. Pouliquen, A. Chaouch, P. Giamar-chi, and M. Prost, 1993. Use of radiation-induced alkanes and alkenes to detect irradiated food containing lipids. *JAOCS.* **70**: 170-185
Horvatovich, P., M. Hasselmann, C. Miesch and E. Marchioni. 2002. Supercritical fluid extraction for the detection of 2-dodecylcyclobutanone in low dose irradiated plants foods. *J. Chromatography A.* **968**: 251-255
Tewfik, I.H., H.M. Ismail and S. Sumar. 1998. A rapid Supercritical Fluid Extraction Method for the Detection of 2-alkylcyclobutanones in Gamma-irradiated Beef and Chicken. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* **31**: 366-370
Liu, J., W. Wei, and G. Li. 2001. A new strategy for supercritical fluid extraction of copper ions. *Talanta.* **53**: 1149-1154
Lee, S.B., K.A. Park and I.K. Hong. 1999. Isolation of function Fatty acid in cosolvent induced SFE process. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **10**: 438-444