

Studies of separation and quantitation for selenium species in food

Hee-Young Jang¹, Hyungsik Min², Jonghae Lee² and Yong-Nam Pak^{1, *}

¹Department of Chemistry Education, Korea National University of Education, 363-791, Korea

²Division of Metrology for Quality of Life, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea

(Received March 6, 2013; Revised May 21, 2013; Accepted June 4, 2013)

식품중의 셀레늄 화학종의 분리 및 정량연구

장희영¹ · 민형식² · 이종해² · 박용남^{1, *}

¹한국교원대학교 화학교육과, ²한국표준과학연구원 삶의질 측정 표준본부

(2013. 3. 6. 접수, 2013. 5. 21. 수정, 2013. 6. 4. 승인)

Abstract: The purpose of this research is to separate and quantitate selenium species in some food samples with HPLC-ICP-MS. Cation exchange chromatography showed efficient separation only for inorganic Se species while reversed phase ion pair chromatography showed good separation for both inorganic and organic Se species. C₈ column (Symmetryshield™ RP₈, 3.5 μm, 4.6 × 150 mm) was used with optimum condition of 5% methanol mobile phase, 0.05% of nonafluorovaleric acid ion pairing reagent. Five standard Se species of Se(IV), Se(VI), SeCys(selenocystein), SeMet(selenomethionine) and Se-M-C(seleno methyl cystein) were separated successfully under the optimum condition (mobile phase; 5% methanol, ion-pairing reagent; 0.05% nonafluorovaleric acid, flow rate; 0.9 mL min⁻¹). To extract Se species, microwave assisted and enzyme-assisted extraction methods were studied. In enzyme-assisted extraction method, protease I for garlic, protease I plus trypsin for pork and mackerel, and protease XIV for tuna showed the best extraction efficiency. With the optimum condition for each sample, it was found that mostly inorganic Se, SeCys and SeMet are present in the sample studied ranging from few μg g⁻¹ to few tens of μg g⁻¹.

요약: 본 연구에서는 HPLC-ICP-MS를 이용하여 여러 식품에 포함된 셀레늄의 화학종을 분리하고 정량하였다. 양이온 교환 크로마토그래피를 사용할 때에 무기셀레늄 화학종의 분리는 효율적이거나 유기셀레늄 화학종은 분리가 완전하지 못한 반면, 역상 이온쌍 크로마토그래피에서는 유기와 무기 셀레늄 화학종들을 모두 잘 분리 할 수 있었다. C₈ 컬럼(Symmetryshield™ RP₈, 3.5 μm, 4.6 × 150 mm)을 이용하여 최적조건(이동상; 5% 메탄올, ion-pairing reagent; 0.05% nonafluorovaleric acid, 흐름속도; 0.9 mL min⁻¹)하에서 표준물 Se(IV), Se(VI), SeCys (selenocystein), SeMet (selenomethionine), Se-M-C (seleno methyl cystein)를 성공적으로 분리하였다. 시료에서의 셀레늄화학종의 추출은 마이크로파를 이용한 추출과 효소(protease I, trypsin, protease XIV)를 이용한 추출을 사용하였는데 시료에 따라 서로 다른 효율과 결과를 보여주었다. 식물성 시료인 마늘 시료는 protease I, 동물성 시료인 돼지고기와 고등어 시료는 protease I + trypsin이 가장 효율적인 추출을 보여주었다. 각 시료의 최적 조건을 선택하여 셀레늄 화학종을 추출하고 분리 정량한 결과 이들에에는 주로 무기 Se, SeCys, SeMet이 수 μg g⁻¹ 내지 수 십 μg g⁻¹ 수준으로 포함되어 있음을 알 수 있었다.

Key words: Ion exchange chromatography, RP HPLC, ICP-MS, HPLC-ICP-MS, Se species, seleno amino acids

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-230-3732 Fax : +82-(0)43-232-7176

E-mail : pakyn@knu.ac.kr

1. 서 론

셀레늄은 우리가 흔히 접하는 환경이나 식품에 널리 퍼져 있어 우리의 건강과 밀접한 관련을 갖고 있다. 셀레늄은 식품 중에서는 극미량으로 존재하지만 필수 영양원소이며,¹ 노화방지, 갑상선 기능, 생식 능력, 세균 감염 방지 등에 작용하는 생체내 단백질들과 결합하여 작용한다.² 또한 셀레늄이 부족하면 심장병, 관절염, 케산질병 등이 발생할 수 있고,^{3,4} 과잉으로 섭취되면 소화기불량, 피부병, 간 기능 및 신경계에 이상이 나타날 수 있다.^{1,5} 사람은 주로 음식을 통해 셀레늄을 섭취하며 생선 및 해산물과 특정 야채들, 그리고 버섯과 마늘, 브라질호두등에 많이 포함되어 있다. 따라서 우리가 소비하는 식품 및 의약품에서 셀레늄의 함량을 정확히 모니터링하고 통제할 필요성이 있다.

셀레늄은 여러 산화상태와 다양한 유, 무기 화학종으로 존재하며 또한 셀레늄은 그 중에 따라 활성도와 독성이 매우 다르게 나타나므로 반드시 각 셀레늄 화학종별로 모니터링이 이루어져야 할 것이다. 따라서 여러 식품이나 의약품 중에 포함된 다양한 셀레늄의 화학종들은 무엇이며 각 화학종에 따른 농도가 어느 정도인지 정확히 분석할 필요가 있다. 최근 연구되고 있는 셀레늄 화학종들을 Table 1에 나타내었다.

셀레늄의 분석은 유도결합 플라즈마 원자방출분광법(ICP-AES:Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy), 전기분무 이온화 질량분광법(ESI-MS: Electrospray Ionization-Mass Spectrometry),^{6,7} 중성자 방사화 분석법(NAA:Neutron Activation Analysis)⁸ 또는 유도결합 플라즈마 질량분석법(ICP-MS:Mass Spectrometry)^{9,10}등의 다양한 방법으로 이루어질 수 있

다. 그 중 최근에 개발된 ICP-MS법은 분석 시간이 짧으며 ng kg^{-1} 수준의 낮은 검출한계와 높은 정확도로 측정할 수 있는 장점이 있어 널리 보급되고 있다. 비록 아르곤 화학종들에 의한 분광간섭이 심하지만 최근의 충돌셀 기법의 발전으로 동중간섭(isobaric interference)은 거의 제거되고 있다. 본 연구에서도 팔중극자 충돌셀(ORC:Octopole reaction cell) ICP-MS를 이용하여 셀레늄 분석에 유리한 충돌기체와 흐름조건들을 선택하고 분광학적 방해물을 제거하였다.¹¹

한편 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 여러 화학종을 분리하는데 가장 일반적이며 효율적인 기술이다. 따라서 ICP-MS와 HPLC를 결합시킨 HPLC-ICP-MS 기술은 강력한 분리 기술과 고감도의 검출기가 결합되어 극미량의 셀레늄 화학종 분석에 매우 효과적으로 사용되고 있다.¹²⁻¹⁵ 현재 셀레늄의 화학종 연구에는 HPLC외의 모세관 전기영동(CE:Capillary Electrophoresis)^{16,17}이나 기체 크로마토그래피(GC:Gas Chromatography)¹⁸와 같은 분리기술을 사용하기도 하지만 HPLC가 가장 보편적이며 주로 이온 교환^{19,20}이나 역상 이온쌍^{21,22} 크로마토그래피가 사용된다. 역상 이온쌍 액체크로마토그래피는 응용범위가 넓으며 이동상의 분리 조건을 용이하게 변화시킬 수 있고 음이온과 양이온 및 중성의 분자를 동시에 분리할 수 있기 때문에 더욱 효과적이다. 다양한 ion-pairing reagent를 사용하여 여러 식품과 효모 등의 셀레늄 화학종의 분리와 검출에 대한 연구가 성공적으로 수행되고 보고되고 있다.²³⁻²⁶ 본 연구에서는 식품종의 셀레늄 화학종들을 정확하게 정성 및 정량분석을 하기 위하여 먼저 셀레늄 화학종들의 분리에 적합한 HPLC 컬럼과 분리 조건을 찾았다. 또한 HPLC와 ICP-MS사이의 최적의 연결조건을 구하였다.

또한, 화학종 연구에서는 무엇보다도 시료 중의 화학종을 변화시키지 않고 효율적 및 정량적으로 추출하여야 한다. Zachariads는 시료에 따라 추출효율이 달라질 수 있음을 시사 하였는데²⁷ 따라서 각 시료에 따라 최적의 추출방법과 조건을 찾아내어 적용하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 시료에서의 셀레늄 화학종을 정량적으로 추출하기 위하여 마이크로파를 이용한 추출법과 여러 효소들을 사용한 추출법들을 비교하고 각 시료에 따른 최적의 추출조건들을 조사하고자 하였다.

셀레늄에 대한 중요성이 국제적으로 부각되면서 이에 따라 국내에서도 관심이 높아지고 있으며 일부 연구가 진행되고 있지만²⁸⁻³⁰ 아직까지는 주로 셀레늄의

Table 1. Some inorganic and organic selenium compounds commonly found in environment

Chemical name	Formula
Selenous acid (selenite)	$\text{SeO}_3\text{H}_2(\text{SeO}_3^{2-})$
Selenic acid (selenate)	$\text{SeO}_4\text{H}_2(\text{SeO}_4^{2-})$
Trimethylselenonium cation	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Dimethylselenide	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$
Dimethyldiselenide	$(\text{CH}_3)_2\text{Se-Se}(\text{CH}_3)$
Methylselenenic acid	CH_3SeOH
Selenocysteine	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-H}$
Selenomethylcysteine	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Selenocystine	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-Se-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Selenomethionine	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$

총량에 대한 분석연구이며 셀레늄 화학종에 대한 연구는 전무한 상태이다. 따라서 우리나라 국민의 건강과 환경 및 보건을 위하여 우리가 섭취하는 여러 식품과 의약품 중에서 여러 셀레늄 화학종들이 무엇이 얼마나 되는지에 대한 정량분석연구는 매우 시급하며 꼭 필요한 것으로 생각된다.

2. 실험

2.1. 기기

셀레늄 화학종의 분석을 위한 ICP-MS는 7500CE (Agilent Tech., CA, USA)을 사용하였고, HPLC pump는 Model 626 dual pump (Alltech Inc., IL, USA)을 사용하였으며 컬럼은 Symmetryshield™ (Waters, MA, USA) RP₈ (3.5 μm, 4.6 × 150 mm) 및 이온교환 컬럼인 PRP X-200(Hamilton company, NJ, USA)을 사용하였다.

2.2. 시약 및 시료

시약 제조나 용기의 세척에 사용된 물은 Millipore direct-Q System에서 얻은 18.2 MΩ cm⁻¹ 이상의 초순수 물을 사용하였다. 셀레늄 화학종 표준용액은 Sigma-Aldrich (MO, USA)의 sodium selenite (SeIV), sodium selenate (SeVI), seleno-DL-methionine (SeMet), seleno-L-cystine (SeCys), Se-(methyl)selenocystein hydrochloride (Se-M-C)을 초순수에 묽혀 20 μg g⁻¹ 용액을 제조하여 사용하였고, 효소 분해에는 Sigma Aldrich사의 protease type I (from bovine pancreas) 및 protease type XIV (from *Streptomyces griseus*)를 사용하였다. Methanol은 99.8%의 HPLC급 시약(JT Baker, NJ, USA)으로 사용하였고 이온쌍 시약으로는 nonafluorovaleric acid (TCI, Tokyo, Japan) 0.05%를 이동상에 혼합하고 질산으로 pH를 2.5로 맞추어서 사용하였다. 국내산 마늘, 돼지고기, 고등어, 참치시료는 시장에서 구입하여 동결 건조하고 분말화시켜 사용하였다. 현재의 연구에서는 주로 시료의 살부분만을 사용하였고 내장 부위별과 지역별 등의 자세한 구분은 하지 않았다.

2.3. 시료의 전처리

마이크로파를 이용한 추출에서는 테플론 용기에 시료를 약 5 g 넣고, 50% 메탄올을 14 g 첨가한 후 약 10시간을 보낸 다음에 마이크로파를 이용하여 35 °C에서 30분간 추출한 후 식히고 메탄올을 증발시켰다. 그 다음 원심분리기를 이용하여 10분간 원심분리

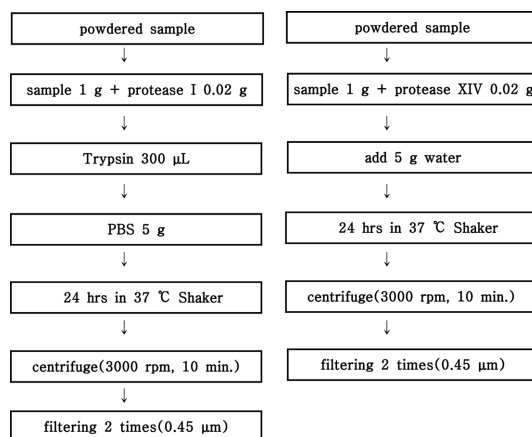


Fig. 1. Flow chart for the extraction process using protease I + trypsin or protease XIV.

(3000 rpm) 후 필터(PVDF syringe filter, 13 mm, 0.45 μm, Whatman)를 사용하여 2회 걸렀다.

효소를 이용한 추출에서는 시료를 약 1 g 취하여 vial에 넣고 protease type I을 0.02 g 넣은 다음 trypsin 300 μL와 PBS (phosphate buffered saline) 5 g을 넣어 뚜껑을 닫고 37 °C shaker에 24시간 두었다. 또는 시료 약 1 g을 취하여 vial에 넣고 protease type XIV를 0.02 g 넣은 다음 초순수 5 g을 넣어 뚜껑을 닫고 37 °C shaker에 24시간 두어 효소를 이용한 추출을 하였다. 그 다음 원심분리(3000 rpm, 10분) 후 2회 걸렀다. Fig. 1에 시료의 추출과정을 요약하여 흐름도로 나타내었다.

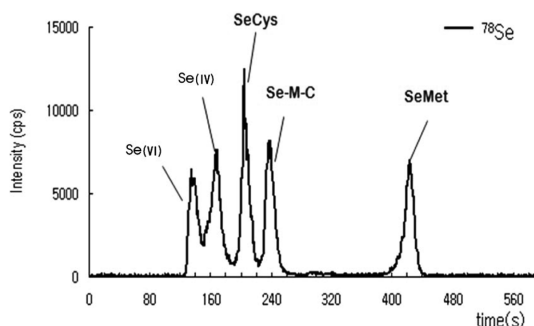
3. 결과 및 논의

3.1. 셀레늄 화학종 분리

HPLC-ICP-MS는 높은 감도와 효율적인 분리분석 기술이 결합된 극미량 수준의 셀레늄 화학종 분석에 효과적인 방법이다. 먼저, ICP/MS의 최적의 기기조건 상태를 유지하기 위하여 실험 전 항상 세부조정하였고 최적 실험조건은 Table 2와 같다. 시료 중에 포함된 여러 셀레늄 화학종을 분리하기 위해서는 먼저 표준시료를 효율적으로 분리할 필요가 있다. 셀레늄 화학종 표준시료인 Se(IV), Se(VI), SeCys, SeMet, Se-M-C의 5가지를 분리하였는데 분리를 위한 최적조건을 Table 2에 실었다. 최적의 조건에서 C₈ 컬럼을 사용한 역상 이온쌍 크로마토그래피의 결과를 보면 Fig. 2에서 나타난바와 같이 Se(IV), Se(VI), SeCys, Se-M-

Table 2. ICP-MS and HPLC operation conditions used in the experiment

ICP-MS Condition	
RF Power, W	1560
Plasma Gas, mL min ⁻¹	15.0
Carrier Gas, mL	0.92
Makeup Gas, mL min ⁻¹	0.12
H ₂ , mL min ⁻¹	4.0
HPLC condition	
Column	Symmetryshield™ RP ₈ 3.5 μm, 4.6 × 150 mm
Mobile Phase	5% methanol, pH 2.5
Ion Paring Reagent	0.05% NFVA
Flow Rate, mL min ⁻¹	0.9

Fig. 2. Separation of selenium 5 standards with C₈ reverse phase column in H₂ gas mode.

C, SeMet의 순서로 5개의 셀레늄 표준물질들이 모두 잘 분리되었다.

3.2. 이온교환크로마토그래피와의 비교

선행 연구에서는 이온교환컬럼을 사용하여 성공적으로 분리한 경우가 있었으므로 본 연구에서도 이온교환컬럼을 사용하고 C₈ 컬럼과의 결과를 비교하였다. 먼저 양이온 컬럼인 Hamilton PRP X-200을 사용하여 표준물을 분리하였다. 실험의 조건은 다음의 Table 3에 요약하여 나타내었다. 결과를 Fig. 3에 보여준 것처럼 무기 셀레늄 Se(IV)와 Se(VI)는 분리가 잘 되는 것을 알 수 있지만 유기셀레늄 화학종들은 일부 분리가 되지 않음을 알 수 있었다. 또한 역상 이온쌍 크로마토그래피와 비교해 볼 때에 전반적으로 분석시간이 더 길고 덜 효율적임을 알 수 있었다.

하지만 이온교환 크로마토그래피는 유기용매를 사용하지 않으므로 ICP-MS에 대하여서는 좀 더 우호

Table 3. Experiential conditions of ion exchange chromatography used for the separation of Se species

Cation Column	
Column	Hamilton PRP X-200 (250 × 4.6 mm)
Guard column	Hamilton PRP X-200
Injection volume	50 L
Mobile phase A	15 mM pyridine formate (pH 5.8)
Mobile phase B	15 mM pyridine formate (pH 6.3)
Mobile phase C	15 mM pyridine formate (pH 3.7)
Gradient program	0 - 3 min 100% A 3 - 10 min 100% B 10 - 15 min 100% C 15 - 25 min 100% A

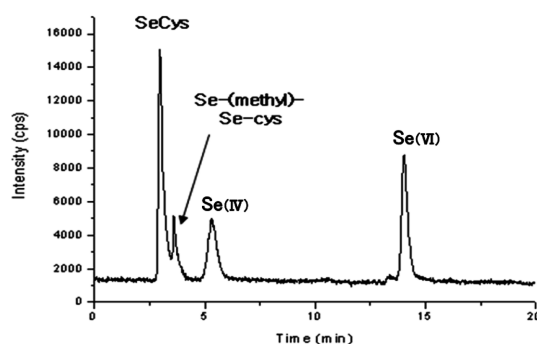


Fig. 3. Separation of Se standards with PRP X-200 cation exchange chromatography.

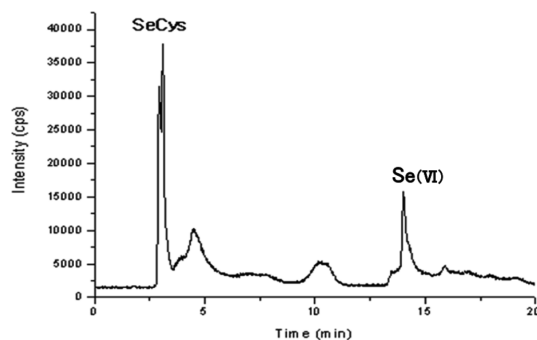


Fig. 4. Separation of Se with PRP X-200 cation exchange column for a garlic sample.

적인 조건이 될 수 있다. 마늘과 고등어시료에 대하여 분석하였고 그 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다.

일부 확인되지 않는 피크들이 검출되고 있으나 유기셀레늄과 무기셀레늄화학종은 분리가 잘 일어나고 있는 반면에 유기화학종들의 분리능이 부족한 것으로 판단되었다.

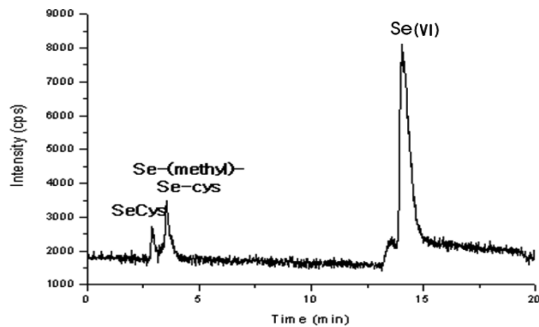


Fig. 5. Separation of Se with PRP X-200 cation exchange column for a mackerel sample.

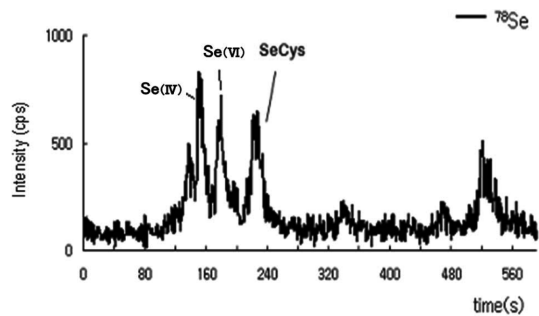


Fig. 7. Selenium species (inorganic Se and SeCys) in a garlic sample extracted by protease I.

3.3. 시료의 추출

음식시료는 식물성 시료인 마늘과 동물성시료인 돼지고기, 그리고 어류인 고등어와 참치를 대표적으로 선택하였다. 시료의 분석에 앞서 시료 중의 셀레늄 화학종을 추출하기 위하여 마이크로파를 이용한 추출과 여러 효소들을 이용한 추출을 조사했는데 이 것은 시료에 따라 셀레늄화학종의 추출은 달라질 수 있기 때문이다. 효소는 protease I 만을 사용하거나, protease I + trypsin을 사용하거나 또는 protease XIV를 사용하였다.

그런데 효소를 이용한 추출을 하게 되면 효소 자체도 단백질이므로 바탕신호를 나타낼 수 있다. 따라서 시료를 제외하고 추출에 사용된 효소인 protease I, trypsin, protease XIV를 포함한 blank를 분석하였다. 바탕 신호는 비교적 작은 편이었고, protease XIV가 두 개의 피크(Fig. 6)를 보여주었고 나머지 효소들은 150초 부근에서 한 개만의 피크를 나타내었는데 시료에 대하여 직접적인 간섭을 보여주지는 않았으므로

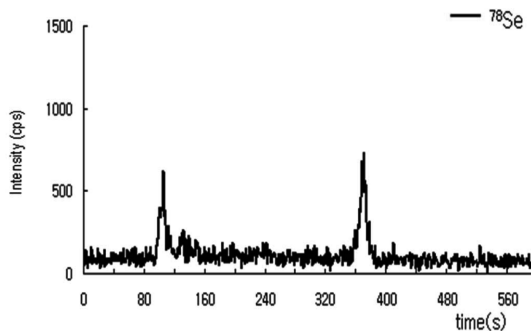


Fig. 6. Representative blank chromatogram of XIV in HPLC-ICP-MS with H₂ gas mode.

용이하게 사용할 수 있었다.

마늘 시료에서는 마이크로파를 이용한 추출과 protease I 또는 protease XIV를 이용한 추출에서 모두 SeCys이 분리되었고, protease I + trypsin을 이용한 경우에는 무기 Se 종만이 분리되었다. Protease I을 이용하였을 때 가장 다양한 종을 추출할 수 있었고, protease I + trypsin을 사용하였을 때는 오히려 유기 Se 종의 추출이 저해되는 것으로 나타났다. 대표적으로 Protease I 일 때의 결과만을 Fig. 7에 나타내었는데 무기셀레늄 Se(VI)과 SeCys가 검출되고 있음을 보여준다. 즉, 마늘의 경우에도 단백질 분해효소를 사용하는 것이 더 좋은 것으로 판단된다. 한편, C₈ 컬럼의 결과는 이온교환 컬럼을 사용하였을 때(Fig. 4)와 다른 결과를 보여주는데 이는 대부분 크로마토그래피의 차이로 기인한다고 생각된다. 육류시료의 경우에 지방을 제거하면 좀 더 효율적인 셀렌 단백질의 추출이 이루어질 수 있을 것으로 생각되나 대부분의 선행연구들은 특이한 경우를 제외하고는 지방을 제거하지 않았으므로 본 연구에서는 사용하지 않았다.

신호는 ⁷⁸Se과 함께 다른 질량대 전하(m/z)도 함께 모니터링 하였는데 매트릭스중의 음이온들은 ⁷⁷[ArCl⁻] 또는 ⁷⁸[ArClH⁻]를 만들어 ⁷⁷Se과 ⁷⁸Se에 간섭을 일으킬 수 있기 때문이다. 비록 충돌기체로 수소를 사용하여 분광간섭을 줄인다 해도 수소의 사용으로 BrH⁺ 등이 생성되어 m/z 80과 82에 간섭을 할 수 있으므로 반드시 여러 동위원소들을 모니터링하면서 동위원소비를 확인해야 한다.¹¹

한편, 육류시료에 대하여서는 마이크로파 추출법은 별로 효과적으로 보이지 않았다(Fig. 8(a)). 그림에서 보듯 무기셀레늄 일부만이 추출될 뿐이며 유기셀레늄은 추출되지 않으므로 육류를 추출할 때에는 반드시 효소를 사용해야 할 것으로 생각된다.

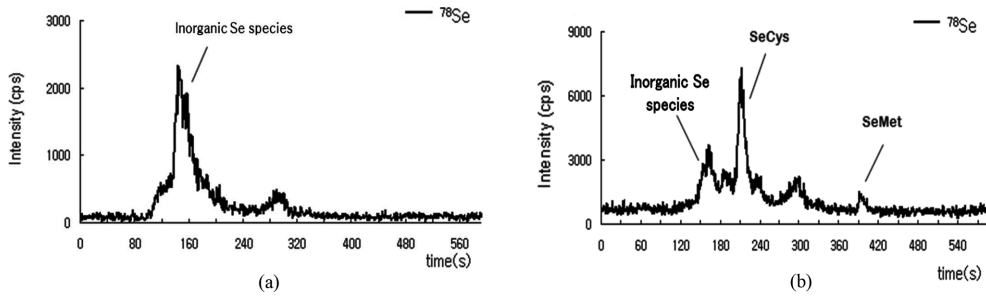


Fig. 8. Selenium species in a pork sample extracted by (a) the microwave method, and (b) protease I + trypsin.

돼지고기 시료에서는 마이크로파를 이용한 추출과 protease I을 이용한 추출에서 무기 셀레늄만이 검출되었으나 protease I + trypsin을 이용한 추출에서는 무기 Se 종과 SeCys, SeMet가 모두 추출되었고, protease XIV를 이용한 추출에서는 무기 Se 종과 SeCys가 검출되었다. 즉, protease XIV를 이용하였을 때에도 모든 화학종을 추출하지 못하였다. 결국, protease I + trypsin을 이용하였을 때 다양하고 많은 양이 추출되어 가장 효율적으로 추출이 이루어졌으며 Fig. 8(b)에 그 결과를 나타내었다.

고등어 시료에서는 protease I 또는 protease XIV를 이용한 추출 시에는 무기 Se 종과 SeCys만이 추출되었고 마이크로파를 이용한 추출과 protease I + trypsin을 이용한 추출 시는 무기 Se 종과 SeCys, SeMet이 추출되었다. Protease I + trypsin과 마이크로파추출법을 비교해 보면 전자가 더 효율적이었고 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 고등어도 돼지고기와 마찬가지로 두 효소를 함께 혼합하여 사용하는 것이 더 효율적으로 판단된다.

참치 시료에서는 효소에 따라 약간의 차이는 보여 주었지만 protease XIV를 이용한 추출이 가장 효과적

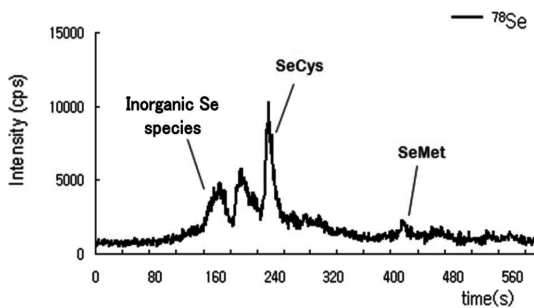


Fig. 9. Selenium species in a mackerel sample extracted by protease I + trypsin.

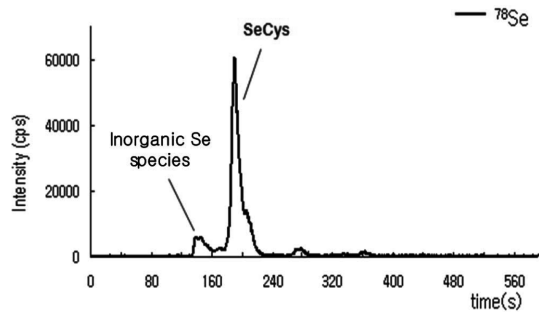


Fig. 10. Selenium species in a bluefin tuna sample extracted by protease XIV.

임을 보여 주었고 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 비록 마이크로파를 이용하였을 때에도 여러 화학종을 추출할 수 있지만 그 양은 효소를 이용한 추출보다는 훨씬 적어서 정량분석에 어려움이 있을 것으로 판단되었다.

3.4. 셀레늄 화학종의 정량분석

시료에 따라 추출효율이 달라질 수 있으므로 각 시료에 따른 효율적 추출을 연구하여야 한다. 식물성이거나 생선류일 때에는 마이크로파 추출법이 비교적 간단하므로 사용이 편리하다. 하지만 추출되는 양은 달라질 수 있으므로 표준물을 잘 선택하여야 정확한 정량분석이 가능할 것으로 기대된다. 육류는 마이크로파 추출법만으로는 부족한 것으로 보이며 반드시 trypsin 효소를 사용하여 잘 분해시켜 셀레늄화학종들을 추출하여야 할 것으로 생각된다. 추출된 시료를 HPLC-ICP-MS로 분석할 때에 충돌기체를 사용하여 분광학적 간섭을 제거하여도 실제 시료에서는 방해가 나타날 수 있으므로 반드시 모든 셀레늄 동위원소를 동시에 모니터링 하여 정확하게 셀레늄 피크만 찾아야 할 필요가 있었다.

Table 4. The concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) of selenium species in several food samples

		Enzymatic digestion	Microwave extraction
Garlic	Inorg. Se	8.5	-
	SeCys	5.2	4.0
Pork	Inorg. Se	34.1	20.6
	SeCys	54.0	-
	SeMet	9.2	-
Mackerel	Inorg. Se	61.8	17.0
	SeCys	74.8	22.1
	SeMet	27.9	18.7
Tuna	Inorg. Se	76.1	30
	SeCys	84	-
	SeMet	trace	8.5

셀레늄 화학종과 각 농도를 측정하여 Table 4에 정리하였다. 전체적으로 불 때에 효소추출법이 마이크로파추출법보다 더 효율적으로 셀레늄 화학종들을 추출하는 것으로 판단된다. 모든 시료에는 공통적으로 무기 셀레늄이 들어있으며 유기셀레늄의 경우에는 마늘 시료에 약간의 SeCys만 포함되어 있었고, 동물시료인 돼지고기 및 어류인 고등어에는 SeCys 외에 SeMet가 포함되어 있었다. 또한 각 시료에는 그밖에 알려지지 않은 몇 가지의 셀레늄 화학종이 분리되었지만 확인할 수 없었다. 대부분의 시료에는 무기셀레늄이나 21세기의 아미노산으로 알려진 SeCys가 공통적으로 포함되어 있는데 SeCys는 유전자 정보에 의해 만들어지는 셀레노 단백질이며 SeMet는 무작위로 포함되는 셀레늄 단백질의 일종이다. SeCys는 포유류에는 많이 나타나지 않으나 어류에는 많이 나타나는 것으로 보고되고 있다.³¹ 참치시료에는 주로 SeCys가 검출되었다.

SeMet는 무작위로 만들어 지므로 모든 시료에 나타나야 하는 것으로 기대되었으나 참치의 경우에는 거의 나타나지 않았다. 이것은 부위별로 다른 것인지 또는 시료개체에 따라 다른 것인지 좀 더 심화된 연구가 필요한 것으로 생각된다. 마늘의 경우에는 단백질이 많지 않기 때문에 유전자 적으로 만들어지는 SeCys 외의 무작위로 생기는 SeMet가 검출되지 않는 것으로 생각된다. 한 편 쌀에 대한 연구에 의하면 SeMet가 검출된 것으로 보고되었다.³² 이 역시, 소량으로써 좀 더 많은 시료에 대한 자세한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

4. 결론 및 제언

이 연구에서는 HPLC-ICP-MS를 이용하여 우리가 자주 접하는 농수산물 식품 중의 셀레늄 화학종을 분리분석 하였다. ORC의 충돌기체로 수소를 사용하여 분광학적 방해물을 제거하였다. 효과적인 셀레늄 화학종의 분리를 위해 역상 이온쌍 크로마토그래피법과 양이온교환 크로마토그래피를 비교한 결과, 전자가 더 우수함을 보여주었고 최적의 조건으로 표준시료 Se(IV), Se(VI), SeCys, SeMet, Se-M-C를 분리하였다. 시료중의 여러 셀레늄 화학종을 온전히 추출하기 위하여 마이크로파를 이용하거나 protease I + trypsin, protease XIV의 효소를 이용하여 비교하였다. 각 방법은 시료 중의 다른 셀레늄 화학종을 추출할 수 있었으며 각 시료마다 가장 효율적인 추출 방법을 찾아 적용하였다.

더 정확한 정량분석을 위하여 동위원소희석법을 적용하는 것이 필요하며 시료의 선택에서도 해산물인 생선 및 갑각류에 국한하여 좀 더 세분화시킨 연구조사가 필요할 것으로 생각된다. 셀레늄은 생체 내 또는 식품 내에서 다양한 형태의 유기화합물로 존재하고 있으며 그 화학종에 따라 활성도와 독성이 매우 다르게 나타나므로 셀레늄의 총량만으로는 생물체에 미치는 독성을 정확히 평가하기가 어렵다. 따라서 이러한 화학종 연구는 매우 의미가 있으며 식품 의약계에서는 셀레늄의 화학종별 통제를 위해 각 셀레늄 화학종의 함량을 정확히 정량하는 이러한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 일반연구(2010-0010880)의 도움으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. O. Wada, N. Kurihara and N. Yamazaki, *Jpn. J. Nutr. Assess.*, **10**, 199-210 (1993).
2. J. L. Shisler, T. G. Senkevich, M. J. Berry and B. Moss, *Science*, **279**, 102-105 (1998).
3. J. Virtamo, E. Valkeila, G. Algrhan, S. Punsar, K. K. Huttunen and M. J. Karvonen, *Cancer*, **60**, 145-148 (1987).
4. K. Kose, P. Dogan and Y. Kardas, *Biol. Trace Elem.*

- Res.*, **53**, 51-56 (1996).
5. O. A. Levander. *Annu. Rev. Nutriti.*, **7**, 227-250 (1987).
 6. J. Far, H. Preud'homme and R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta*, **657**, 175-190 (2010).
 7. M. Klein, L. Ouerdane, M. Bueno and F. Pannier, *Metallomics*, **3**, 513-520 (2011).
 8. J. M. Navarrete, L. C. Longoria, M. T. Martinez and L. Cabrera, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **271**, 599-601 (2007).
 9. P. C. Uden, *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 422-431 (2002).
 10. X. Dauchy, M. Potin-Gautier, A. Astruc and M. Astruc, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **348**, 792 (1994).
 11. H. Cho and Y. Pak, *J. Kor. Chem. Soc.*, **55**(3), 472-477 (2011).
 12. T. D. Grant, M. Montes-Bayon, D. Leduc, M. W. Fricke, N. Terry and J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A*, **1026**, 159-166 (2004).
 13. S. Kokarnig, D. Kuehnelt, M. Stiboller, U. Hartleb and K. A. Francesconi, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 2323-2327 (2011).
 14. Q. Chan, S. E. Afton and J. A. Caruso, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **25**, 186-192 (2010).
 15. Q. Chan, S. E. Afton and J. A. Caruso, *Metallomics*, **2**, 147-153 (2010).
 16. C. B. Hymer and J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A*, **1045**, 1-13 (2004).
 17. A. Prange and D. Pofrock, *Anal. Bioanal. Chem.*, **383**, 372-389 (2005).
 18. T. DeSnaele, P. Verrept, L. Moens and R. Dams, *Spectrochim. Acta. B*, **50**, 1409-1421 (1995).
 19. L. H. Reyes, F. M. Sanz, P. H. Espilez, J. M. Marchante-Gayon, J. I. G. Alonso and A. Sanz-Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **19**, 1230-1238 (2004).
 20. Z. Pedrero, D. Elvira, C. Camara and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta.*, **596**, 251-256 (2007).
 21. M. Kotrebai, M. Birringer, J. F. Tyson, E. Block and P. C. Uden, *Analyst*, **125**, 71-78 (2000).
 22. M. Shah, S. S. Kannamkunarath, J. C. A. Wuilloud, R. G. Wuilloud and J. A. Caruso, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **19**, 381-387 (2004).
 23. C. Ip, M. Birringer, E. Block and M. Kotrebai, J. F. Tyson, P. C. Uden and D. J. Lisk, *Agric. Food Chem.*, **48**, 2062-2070 (2000).
 24. C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski and M. Potin-Gautier, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **14**, 645-652 (1999).
 25. J. K. Kirby, G. H. Lyons and M. P. Karkkainen, *J. Agric. Food Chem.*, **56**(5), 1772-1779 (2008).
 26. S. G. Casal, J. Far, K. Bierla, L. Ouerdane and J. Szpunar, *Metallomics*, **2**(8), 535-548 (2010).
 27. G. A. Zachariadis, D. C. Kapsimali and E. Rosenberg, *Curr. Org. Chem.*, **14**(19), 2282-2299 (2010).
 28. S. Cho, M. Kim, Y. Kim, Y. Min and Y. Kim, *Anal. Science & Tech.*, **19**(3), 203-210 (2006).
 29. O. Lee, Y. Jung and J. Moon, *Korean J. Nutr.*, **43**, 114-122 (2010).
 30. Y. Ham, B. Kim, Y. Kwon, H. Paik and S. Lee, *Anal. Science & Tech.*, **24**(3), 159-167 (2011).
 31. S. Yoshida, M. Haratake, T. Fuchigami and M. Nakayama, *J. Health Sci.*, **57**, 215-224 (2011).
 32. J. L. Guzmán Mar, L. H. Reyes, G. M. M. Rahman and H. M. S. Kingston, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3005-3013 (2009).