

Review

식품 내 벤조피렌 분석법의 기존 연구동향 및 라만분광법 기반기술 전망

이미현^{1,2†}, 이소윤^{1,2†}, 김현연¹, 최대식³, 이한주^{2*}, 이진규^{1*}

¹이화여자대학교 식품공학과

²한국기초과학지원연구원 시공간분자이미징연구팀

³(주)에스엠텍

Received: August 26, 2015 / Revised: September 1, 2015 / Accepted: September 1, 2015

Conventional Analytical and New Raman Spectroscopy-Based Methods for Detecting Benzo[a]pyrene in Food: Review and Perspective

Mi-Hyun Lee^{1,2†}, So-Yoon Yee^{1,2†}, Xuanyan Jin¹, Dae Sik Choi³, Hanju Rhee^{2*}, and Jin-Kyu Rhee^{1*}

¹Department of Food Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

²Space-Time Resolved Molecular Imaging Research Team, Korea Basic Science Institute, Seoul 02841, Republic of Korea

³SM Tech, Daejeon 34302, Republic of Korea

With a view to supporting the provisions of the current Korean food code for the detection of Benzo[a]pyrene, various analytical methods of detection in foods were evaluated and established in terms of linearity, limits of detection/quantitation, efficiency, and accuracy, amongst others. It was observed that to improve the technologies involved in the application of these methods, complicated and combined preparation processes of foods, including extraction, separation and purification, have been the main focus of efforts at optimization. Recently, on-site quick reaction for the detection of hazardous substances in the environment and food materials aims at developing simplified examination processes, such as label-free and non-invasive technological analysis, to reduce the costs and time involved in the examination. Herein, current benzo[a]pyrene detection methods are reviewed in addition to new Raman spectroscopy-based trials established to pursue improve the speed, simplicity and suitability of testing.

Keywords: Benzo[a]pyrene, raman spectroscopy, detection, quantitation

서론

벤조피렌(Benzo[a]pyrene, BaP)은 다환 방향족 탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs))의 한 종류로 방향족 고리 5개가 융합된 형태의 유기화합물이다. 벤조피렌

은 황색 고체 결정을 띠고 있으며 2006년 국제 암 연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서 발암물질(group 1) (Table 1)로 분류되었고, 발암성에 근거하여 캐나다 및 미국 등에서는 다환 방향족 탄화수소중 위해성주의 우선순위 대상으로 선정되어 관리되고 있다[36, 38]. 또한 국제식품 규격위원회, Codex와 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)에서는 벤조피렌을 발암가능 물질 및 내분비계 장애물질로 분류하고 있다(Table 1) [5]. 이러한 벤조피렌을 다양한 식품으로부터 검출하기 위해 각각의 식품류에 부합하는 신뢰도가 높고 효율적인 분석방법들이 개발, 적용되어 왔다. 이와 더불어 시료의 전처리 과정의 간편화 및 최적화를 위한 많은 시도들 역시 진행되어 왔다[[5, 6, 10, 12, 15, 20–23, 25, 26, 35–38,

*Corresponding authors

H. R.

Tel: +82-2-6943-4141, Fax: +82-2-6943-4109

E-mail: hjrhee@kbsi.re.kr

J.-K. R.

Tel: +82-82-2-3277-4297, Fax: +82-2-3277-4508

E-mail: jkrhee@ewha.ac.kr

†These authors contributed equally to this work.

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Table 1. Major 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) classified by the IARC (International Agency for Research on Cancer) monographs [13].

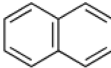
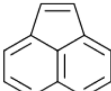
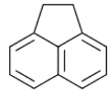
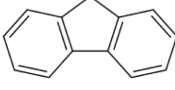
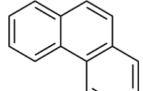
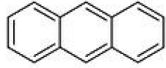
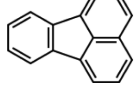
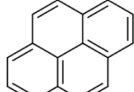
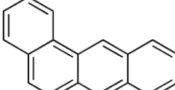
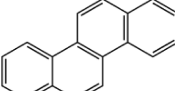
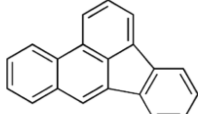
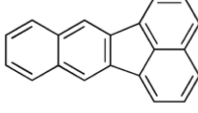
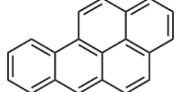
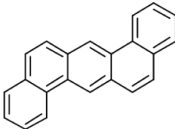
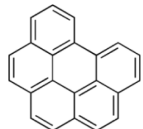
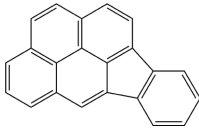
No.	PAHs	Abbreviation	M.W.	Structural formulas	IARC group
1	Naphthalene	NA	128		2B
2	Acenaphthylene	ACL	152		2B
3	Acenaphthene	AC	154		3
4	Fluorene	FL	167		3
5	Phenanthrene	PHE	178		3
6	Anthracene	AN	178		3
7	Fluoranthene	FA	202		3
8	Pyrene	PY	202		3
9	Benzo[a]anthracene	BaA	228		2B
10	Chrysene	CRY	228		2B
11	Benzo[b]fluoranthene	BbF	252		2B
12	Benzo[k]fluoranthene	BkF	252		2B
13	Benzo[a]pyrene	BaP	252		1

Table 1. Continued.

No.	PAHs	Abbreviation	M.W.	Structural formulas	IARC group
14	Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracene	DahA	278		2A
15	Benzo[<i>g,h,i</i>]perylene	BghiP	276		3
16	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	PY	202		2B

Group 1: carcinogenic to human

Group 2A: probably carcinogenic to human

Group 2B: possibly carcinogenic to human

Group 3: not classifiable as to its human

44]. 근래에 들어서는 많은 시간과 고비용을 필요로 하는 기존 방법의 단점을 극복하고 현장에서 저비용과 신속성으로 적용가능한 신검출 기술에 대한 필요로, 비표지, 비파괴 분석법인 quartz crystal microbalances, fluorescent spectrometry 등이 시도되었으나 선택성과 민감도가 부족하다는 단점이 보고되고 있다[3]. 라만 분광법의 경우에도 낮은 감도로 미량 성분 분석에 적합하지 않은 측면이 있지만, 표면 증강 라만 산란(surface enhanced Raman scattering, SERS) [3, 9, 24, 27], 그래핀 증강 라만 산란(graphene enhanced Raman scattering, GERS) [8] 및 자외선 공명 라만(UV resonance Raman, UVRR) [2, 11, 19] 등 다양한 라만 신호 증강 기법이 개발되어 적용되고 있다. 이번 총설에서는 이들 각각의 방법에 대해 적용 사례를 리뷰하고, 특히 새로이 개발된 라만 신호 증강 분광법을 이용한 벤조피렌 검출법에 대해 소개하고자 한다.

식품 내 벤조피렌의 위해성

벤조피렌의 생체내 기작

벤조피렌의 생체내 생성은 유기물이 고온에서 분해되면서 생성된 ethene, propene, 1,3-butadiene 등이 Diels-Alder 반응에 의해 cyclic alkene을 형성하는 기작으로 제안되었다 [33]. 이렇게 생성된 cyclic alkene은 탈수소화 반응에 의해 단일 고리를 갖는 방향족 화합물로 형성되고 이로부터 naphthalene, phenanthrene과 같은 다환 방향족 탄화수소가 생성된다(Fig. 1). 다환 방향족 탄화수소의 발암성에 관한 연구는 많이 이루어져 방향족 환의 개수 및 위치에 따라 발

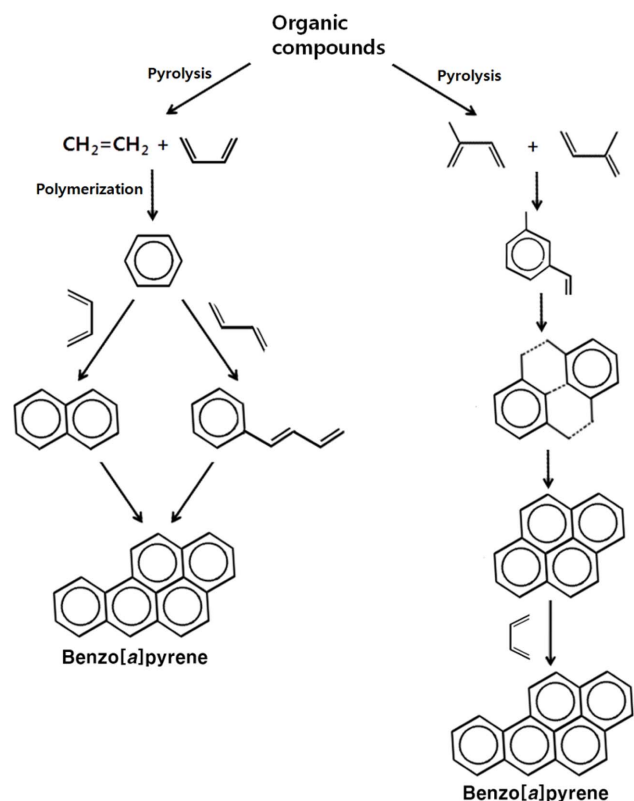


Fig. 1. *In vivo* major generation pathway of benzo[*a*]pyrene [36].

암성의 정도에 차이를 보인다는 사실이 알려졌다[4, 7, 33, 37, 41, 42]. 특히 본 총설에서 중점으로 다룬 벤조피렌의 경

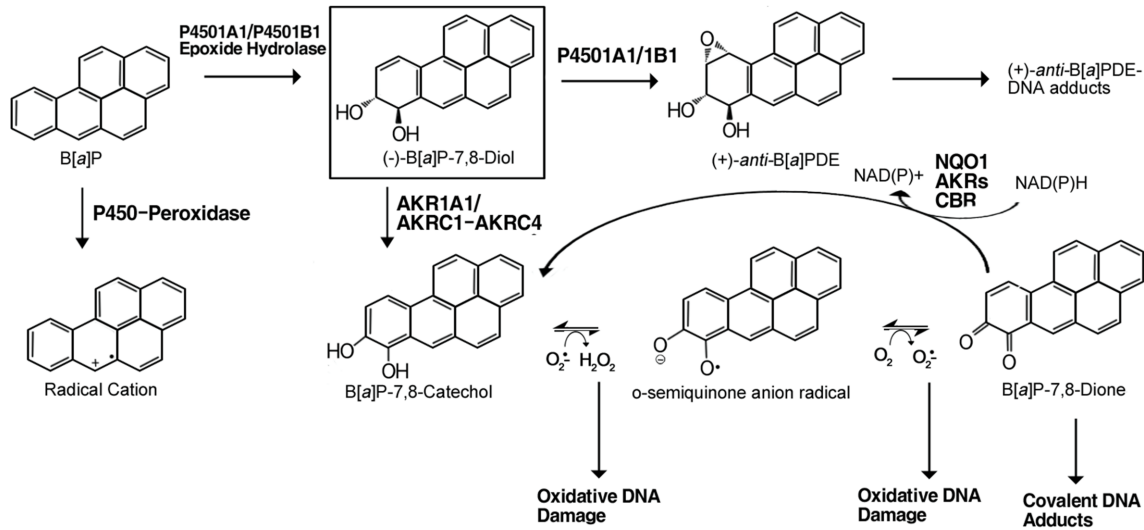


Fig. 2. Pathways of benzo[a]pyrene activation [24].

우 거의 모든 실험동물에서 가능한 모든 경로를 통해 암을 유발시키는 것으로 확인되었다.

벤조피렌 생성기작은 7R,8R-trans-dihydrodiol에서 ketol로의 NAD(P)⁺-의존 산화 과정을 포함하며, 이는 aldo-keto reductase family 1, member A1 (AKR1A1), member C1 (AKR1C1)-member C4 (AKR1C4)에 의해 촉매된다. 이후 Ketol은 산소에 의한 산화과정을 거쳐 B[a]P-7,8-dione과 활성화산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성하면서 지속적으로 catechol로 재배열된다(Fig. 2). B[a]P-7,8-dione은 DNA와 반응할 수 있는 친전자체이면서 산화-환원 활성이 있다. 환원 당량과 NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1), aldo-keto reductase (AKR)s, carbonyl reductase 존재시, quinones는 catechol로 재환원될 수 있다. 만약 이러한 물질들이 futile 산화-환원 순환 반응(redox cycle)을 방해하면 NADPH는 고갈되며 활성화산소종은 증가한다. 이 물질의 활성 기작은 공기 중의 phenanthrene, chrysene, 5-methyl-chrysene, benz[a]anthracene, B[a]P와 같은 몇몇 다환 방향족 탄화수소류에서 관찰되어 왔으며 이는 생체 내 재조합 효소와 사람의 폐 세포에서도 발생한다[34, 39]. 벤조피렌 및 그 대사물은 조직 내 단백질의 존재에 크게 의존하는데 이들이 단백질과 결합하여 조직에 축적됨으로써 기관에서의 세포독성, 돌연변이성, 발암성이 증가하고 긴 잔류기간과 강력한 독성으로 인해 보다 심각한 문제가 야기될 가능성이 높아진다.

식품 내 벤조피렌

벤조피렌의 인체 노출 기여도를 보면 공기 5.6%, 물 0.6%, 식품 93.8%로 식품이 가장 높은 주요 기여 요인으로 보고되

고 있는데[14], 2002년 Scientific Committee on Food (SCF)에서는 식품에서 다환 방향족 탄화수소류의 발암성을 판단하는 지표로 B[a]P를 사용할 수 있다고 보고하였다[15]. 벤조피렌은 조리 및 가공을 통해 가열하는 과정에서 생성되고 식품의 주성분인 탄수화물, 단백질, 지방 등이 열분해, 불완전 연소되어 생성되기도 하며, 훈제 공정에서 연기에 의해 주로 발생된다. 특히 지방함유 식품, 식용유지류(식용유, 정제 올리브유, 해바라기유, 참기름, 들기름 등)과 불꽃이 직접 접촉할 때 검게 탄 부위에서 많이 생성된다. 또한 가공하지 않은 농산물 및 수산물 등의 식품에도 환경오염 등으로 인하여 존재할 수 있다[6]. 참고로 숯불에서 조리한 스테이크 내 벤조피렌의 평균 농도는 약 9 µg/kg 정도로 보고된 바 있다[22].

국립독성연구원에서 발표한 벤조피렌에 노출될 수 있는 식품 1일 섭취량은 육류 54.5%, 채소류 19.2%, 곡류 11.5%, 과일류 5.3%, 서류 5.1%, 식용유지 3.6%, 패류 0.2%, 어류 0.7% 순으로 나타났는데 육류가 가장 높은 비율을 차지하는 것을 알 수 있다[12]. 미국 환경보호국(U.S.EPA)에서 제시한 toxic equivalency factors (TEFs)를 적용하여 식품 섭취를 통한 총 인체 노출량을 환산한 경우, 8.38×10^{-7} mg/kg b.w./day로 알려져 있으며, 위상부암 발생에 근거한 benzo[a]pyrene의 발암력은 6.11×10^{-6} 에 달하는 초과발암 위험도를 나타내었다. 이는 100만명당 6명의 위상부암 발생위해 가능성을 의미하며, 1×10^{-5} 이하로서 우려되는 수준은 아닌 것으로 알려져 있다[37].

국내외 벤조피렌 이슈 및 현황

2006년 올리브유(olive oil) 내 벤조피렌 검출이 이슈화된 후, 식품의약품안전처와 제조업체가 자발적으로 벤조피렌 저

감화 사업을 실시해왔으며, 2007년 10월에 모든 식용유지에 대한 벤조피렌 기준을 2.0 µg/kg으로 규정, 관리하게 되었다 [21, 23]. 식품의약품안전처는 식품별 허용 기준을 고시하고 있다. 훈제어육의 경우 건조제품은 예외이고, 훈제건조어육은 생물을 기준으로 하되 건조제품은 수분함량이 변화된 경우 수분함량을 고려하여 적용한다(Table 2) [18].

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)에서는 식품 내 벤조피렌 함량을 최대 10.0 ppb로, EU에서는 유지 내 벤조피렌 함량을 최대 2.0 ppb로 규정하였다. 특히 올리브유 내 벤조피렌 기준은 캐나다, 스웨덴, 스페인은 각 나라별로 2.0-5.0 ppb의 차이가 있고 중국의 경우 10.0 ppb 이하, 이탈리아, 포르투갈, 그리스에서는 8 heavy 다환 방향족 탄화수소를 기준으로 개별 2.0 ppb 이하, 종합 5.0 ppb 이하로 기준을 설정하였다[35]. 미국과 일본은 기준

이나 규격을 따로 설정하지 않고 저감화 관리만 시행하고 있다(Table 3) [20, 44].

우리나라는 2006년 7월 올리브유에 대하여 벤조피렌 2.0 ppb로 기준을 설정한 이후, 2007년 2월에는 모든 식용유지에 그 대상을 확대하였고 2013년 저감화 5개년 중장기 계획을 수립하였으며 벤조피렌, 아크릴아마이드 등 23종의 유해화학물질을 선정해 저감화를 위한 노력을 벌이고 있다 [35].

식품 내 벤조피렌의 전처리과정 및 검출법

식품 내 벤조피렌을 분석하기 위해서 시료는 균질화-추출-정제의 전처리 과정을 거쳐 검출하게 된다. 벤조피렌의 경우, 식품 중 미량으로 존재하기 때문에 적절한 추출과 정제과정을 거쳐야만 분석시 방해물질로부터 영향을 받지 않으므로 분석 자료의 정확성을 높일 수 있다[31]. 국내 식품공전에는 식품 별 분석법이 제시되어 있는데, 제 1법으로 액체 크로마토그래피/형광검출기(HPLC/FLD)를 사용한 방법이, 그리고 제 2법으로는 가스 크로마토그래피/질량분석기(GC-MS)을 이용한 방법이 기술되어 있다[2]. 또한 내부표준물질을 비롯해 분석원리, 사용되는 장치, 시약, 시험용액 조제법, 시험조작법이 규정되어 있다[31]. 그 외에 quartz crystal microbalances, fluorescent spectrometry 등이 시도되었으나 선택성, 민감도에 있어 보다 개선이 필요함을 지적하고 있다[3].

추출

다환 방향족 탄화수소 추출법은 식품의 matrix 및 성질에 따라 좌우된다. 식용유지의 경우 hexane, methanol, acetonitrile,

Table 2. Maximum allowable levels for PAHs in various food groups.

Food	Maximum level (µg/kg)
Edible oil and fat	2.0
<i>Rehmannia glutinosa</i>	5.0
Smoked fish meat	5.0
Smoked dried fish meat	10.0
Fish	2.0
Shellfish	10.0
Mollusks and crustacean	5.0
Infant/baby formula diet	1.0
Smoked meat and its processed foods	5.0

Table 3. Standards for PAHs in oil.

	Food	Targets	Maximum level (µg/kg)
Korea (KFDA)	Edible oils & fats	B[a]P	2.0
EU	Oils & fats	B[a]P	2.0
Spain	Olive residue oils	8 PAHs ¹⁾ sum of PAHs	2.0 5.0
Canada	Pomace olive oil	8 PAHs ²⁾	3 TEQ ³⁾
Germany (German Society for Fat Science)	Edible oil	Heavy PAHs ⁴⁾ sum of PAHs	5.0 25.0
China	Edible oil	B[a]P	10.0

1) Benzo[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Benzo[e]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene, Benzo[g,h,i]perylene, Indeno[1,2,3,-cd]pyrene

2) Benzo[a]anthracene, Chrysene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene, Benzo[g,h,i]perylene, Indeno[1,2,3,-cd]pyrene

3) Toxic Equivalent Quotient

4) Benzo[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Benzo[k]fluoranthene, Dibenzo[a,h]anthracene, Indeno[1,2,3,-cd]pyrene

acetone, acetate 등과 같은 용매 추출법이 이용된다[35]. 일반적으로 식품 전반에 적용 가능한 추출방법으로 알칼리분해 후 액-액 추출하는 방법이 있으며 이 방법은 식품의 지방조직 내 벤조피렌 추출법이다. 특히, 액-액 추출(liquid-liquid extraction) 방법은 음료류와 같은 액상 식품에 적용하고, 식품자체가 지방인 식용유지인 경우 액-액 추출방법으로 역추출하는 방법을 적용한다. 초음파추출 방법은 지방이 거의 없는 과일 및 채소류와 같은 식품에 적용하며, 복잡한 추출 조건 없이 쉽게 추출할 수 있다[26]. 육류나 생선 등의 고체상 식품은 액-액 추출법 또는 유기용매에 따른 비누화 방법을 이용한다[36].

정제

추출된 다환 방향족 탄화수소의 정제는 비교적 극성이 강한 고정상을 가진 플로리실(florisil)을 충전한 컬럼을 사용하는 방법이 많이 사용되고 있다[5]. 이 방법은 비극성인 벤조피렌과 극성 방해물질의 분리에 매우 효과적이나, 컬럼 준비 및 활성화시키는 데 많은 시간이 걸린다는 단점이 있다. 이러한 점을 보완하기 위해 상업적으로 시판되고 있는 고체상 카트리지를 사용하면 정제효율과 분석시간 단축시킬 수 있다[36]. 일반적으로 플로리실과 실리카겔 카트리지가 많이 사용되는데, 벤조피렌의 경우 실리카겔 카트리가 더 높은 회수율을 나타낸다는 연구결과가 보고되었다[28].

검출

식품 내 다환 방향족 탄화수소의 검출한계와 회수율은 혼합물, matrix, 실험방법에 의존적인 경향을 보이며, 검출한계는 보통 0.1-1 µg/kg으로 보고되고 있다(Table 4). 일부 다환 방향족 탄화수소는 더 낮거나 높으며 최대 20 µg/kg으로 보고된다[1]. 단, MS/MS 방법은 높은 선택성 때문에 검출한계가 0.1 µg/kg보다 낮다[42]. 회수율은 HPLC와 GC 모두 70% 이상이지만 일부다환 방향족 탄화수소는 그보다 낮은 것으로 보고되었다[1, 16].

Table 4. Sensitivities of various methods for benzo[a]pyrene detection.

Analysis	Limit of detection (µg/l)	References
Electrochemical	2.8	[30]
HPLC	0.005	[17]
GC-MID	0.1	[32]
GC-MS	0.06	[40]
Fluorescence	0.36	[29]
SERS	20	[43]
SERS	1	[9]

국내 식품공전에는 지용성인 벤조피렌 특성을 고려하여 대상식품을 지방함유 여부, 물성 등에 따라 식용유지류, 음료류, 건조식품, 과일 및 채소류, 그 외 식품으로 구분하였다. 또한 시료 처리, 추출, 정제 등의 과정을 거치는 분석법을 제시하였다. 제 1법으로 액체크로마토그래피/형광검출기(HPLC/FLD), 제 2법으로 가스크로마토그래피/질량분석기(GC-MS)가 서술되어 있다[26]. European Food Safety Authority (EFSA)가 18개국을 대상으로 실시한 조사에서, 식품 내 벤조피렌 분석 시, 전체 중 54%가 HPLC-FLD 또는 HPLC-UV/FLD를, 43%가 GC-MS를 사용하는 것으로 보고되었다[1].

HPLC/FLD(High Performance Liquid Chromatograph/Fluorescence Detector): 벤조피렌의 특징적인 형광파장을 이용하여 검출하는 방법으로, 시료의 방해물질로부터 효과적으로 벤조피렌을 분리, 정량할 수 있는 기기분석방법이다[26]. 가장 널리 쓰이고 있으나, 유지류 내 벤조피렌 분석시 내부표준물질(3-메틸콜란트렌)의 회수율이 낮다는 단점이 있다[1]. 내부표준물질의 회수율 측정 실험에서 올리브유 61.26 ± 5.53, 들기름 48.30 ± 8.26, 참기름 42.57 ± 6.92%로 낮게 나타났다[36, 44].

GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry): 동위원소를 쓰기 때문에 정확성을 높일 수 있다. 즉, 동위원소를 내부표준물질로 이용 시, 분석물질과 그 동위원소의 물리화학적 유사성으로 인해 정량분석에 매우 효과적이다. 동위원소를 이용한 정량분석은 1966년에 최초로 보고되었으며, 이후 미량물질 분석에 널리 쓰이고 있다. 유지류 내 벤조피렌 분석에 내부표준물질(벤조피렌-d12) 사용시 HPLC에 비해 회수율이 향상되었는데, 올리브유 106.95 ± 9.27, 들기름 93.26 ± 3.28, 참기름 94.24 ± 19.82%로 나타났다. 또한 GC 방법에서 Programmed Temperature Vaporization (PTV) 주입법은 많은 양의 시료를 주입할 수 있어서 보다 낮은 검출한계를 나타낸다[36, 44]. 그러나 전처리 과정이 필요하며 시간이 많이 소모되고 고비용이라는 단점을 가지고 있다[3].

라만분광법을 이용한 벤조피렌 분석법

이상 서술한 방법은 국내 식품공전에 기술된 대표적인 식품 내 벤조피렌 분석법으로 이미 그 효용성과 정확성이 검증된 방법이지만 시료 추출 및 분리, 정제 등의 복잡한 시료 전처리 과정을 포함하고 있다. 환경 및 식품 내 위해물질 검출과 관련된 연구분야의 현 추세는 고비용의 많은 시간을 요구하는 복잡한 방법을 지양하고 관리 현장에서 신속히 적용 가능한 저비용, 비표지, 비파괴 분석법의 개발을 강조하고 있다. 이번 절에서는 라만분광법의 기본 개념과 여러

가지 라만 신호 증강 기법을 이용한 벤조피렌 검출법에 대해 자세히 소개하고자 한다.

라만 분광법(Raman spectroscopy)

라만 분광법은 빛에 의한 라만 산란 현상을 이용해 분자의 진동 구조를 관찰하는 방법 중 하나이다. 모든 분자는 화학결합 상태에 따라 각기 고유한 분자 진동 주파수를 가지는데 라만 분광법은 이러한 물질의 고유한 진동 구조 정보를 제공하기 때문에 별도의 형광 표지자 없이도 확실한 분자 선택성을 가지며 이를 통해 상이한 화학결합을 가지는 다양한 분자의 식별이 가능하다. 분자의 진동 준위들 간 직접적인 광 흡수를 측정하는 적외선 흡광 분석과는 달리 라만 분광법은 주로 가시광선을 입사광으로 사용하여 이 주파수로부터 적색 천이(red shift)된 스톱스 라만 산란(Stokes Raman scattering) 스펙트럼을 측정한다. 기존 방법과는 대조적으로 라만 분광법에서는 단순히 시료에 레이저 빛을 쬐여준 후 발생하는 산란광의 스펙트럼을 광 검출기로 측정하기 때문에 시료에 대한 복잡한 전처리 과정이 필요없이 비파괴 분석이 가능하며 식품 위해물질에 대한 일차적인 검출 분석을 식품 관리 현장에서 곧바로 적용할 수 있는 장점이 있다.

그러나 입사광 대비 10^{-7} 수준의 매우 미약한 신호 세기로 인한 낮은 검출한계 및 다양한 혼합물이 공존하는 시료의 경우 낮은 선택성 문제 등이 단점으로 지적되고 있다. 따라서 일반적인 라만 분광법은 미량 성분 분석에 적합하지 않은 측면이 있는데 이러한 문제를 극복하기 위해 표면 증강 라만 산란(surface enhanced raman spectroscopy, SERS) [3, 9, 24, 27], 그래핀 증강 라만 산란(graphene enhanced Raman scattering, GERS) [8] 및 자외선 공명 라만(UV resonance Raman, UVR) [2, 11] 등 다양한 라만 신호 증강 기법이 개발되었고 다음 절에서는 이들 각각의 방법에 대해 적용 사례를 들어 설명하도록 하겠다(Table 4).

표면 증강 라만 산란 검출법

표면 증강 라만 산란(SERS) 검출법은 금속 나노입자 및 나노패턴 구조의 표면에서 표면 플라즈몬 공명 현상을 통해 라만 산란 신호를 10^6 배 이상 증폭시킴으로써 기존 라만 분광법의 낮은 검출한계를 획기적으로 증가시킬 수 있는 고감도 라만 신호 검출 방법 중 하나이다[9, 19, 24, 27]. 그로 인해 pM 농도 수준의 극미량 분석 시료에 대한 검출이 가능하며 신호 증강 효과를 극대화하기 위해 Au 또는 Ag를 이용한 다양한 형태의 금속 나노입자 및 나노구조체 합성 연구 또한 활발히 진행되고 있다. 한 예로 lucigenin으로 표면 개질화(surface modification) 된 금 나노판(Au nanoplate)을 이용해 다환 방향족 탄화수소계열 분자인 피렌(pyrene)에 대한

SERS 검출 연구가 수행되었는데 7.3×10^7 배의 신호 증강 효과를 구현함으로써 5×10^{-10} M 농도의 극미량 검출이 가능함을 실험적으로 증명하였다[27]. 최근에는 inositol hexaphosphate (IP₆)로 개질화 된 Au 나노입자 SERS를 이용해 실제 식용유 내 ppb 수준의 벤조피렌 함량을 성공적으로 검출한 연구결과가 발표되었다[27]. SERS와 기존 방법의 검출한계를 비교하고 있으며 IP₆-Au 나노입자 SERS의 경우 검출한계가 1 µg/l까지 도달할 수 있음을 보여준다. 또한 미시 함량의 벤조피렌이 들어있는 3종류의 식용유 시료를 SERS 분석한 결과 HPLC-MS와 비교할 만한 수준의 정량 분석이 가능함을 확인하였다[27]. 이처럼 SERS 검출법의 높은 신호감도와 그에 따른 효율성이 여러 연구결과를 통해 증명되고 있지만 금속 나노입자와 나노패턴의 형태에 따른 신호 증강 재현성 문제가 여전히 단점으로 존재한다. 뿐만 아니라 벤조피렌 등 다환 방향족 탄화수소계열의 분자들은 거의 대부분 금속에 대한 친화력이 없기 때문에 이들을 금속 표면에 흡착시키기 위해 금속 표면을 반드시 개질화해야 하는 단점이 있다. 따라서 금속 SERS의 경우 정량 분석의 재현성 구현 및 분석시료에 대한 흡착 선택성을 향상시킬 수 있는 SERS 기판 제작 기술 개발이 향후 무엇보다도 중요한 해결과제로 남아 있다.

그래핀 증강 라만 산란 검출법

앞서 설명한 대로 금속을 이용한 SERS 검출법은 hot spot의 농도와 나노패턴의 구조에 의존하여 신호 증강률이 현저하게 변하기 때문에 경우에 따라 정량 분석의 정확성이 떨어질 가능성이 높다. 이와 함께 표면을 개질화해야 하는 불편함 또한 존재한다. 최근 SERS의 또 다른 형태로 그래핀 증강 라만 산란(GERS) 검출법이 등장하였는데 여기서는 Au나 Ag 금속 대신 그래핀(graphene)이 SERS 기판으로 사용된다[8]. 최근 보고된 티민(thymine) 분자의 GERS 연구결과에 의하면 신호 증강률은 최대 500배 수준으로 금속 SERS에 비해 신호 감도는 훨씬 낮은 편이다(Table 4). 그러나 결맞음 반-스톱스 라만 산란(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 등의 방법을 함께 결합하면 상대적으로 낮은 신호 증강률의 단점을 극복하는 것이 가능하다. 한편, GERS의 장점으로는 화학적 증강(chemical enhancement) 메커니즘에 의한 높은 신호 재현성과 다환 방향족 탄화수소계열 분자에 대한 흡착 용이성을 들 수 있다. 아직 신호 재현성과 관련된 자세한 연구결과가 보고된 바가 없기 때문에 향후 면밀한 정량 분석 연구를 통해 이를 실험 입증할 필요가 있을 것으로 판단된다. 또한 그래핀의 경우 광학영역에서 투과도가 좋기 때문에 휴대용 라만 장치에 부착하여 사용할 경우 식품의 신선도 구별이나 위해물질 검출을 위한 현장 응용 가능성이 상당히 높아질 것으로 예상된다.

자외선 공명 라만 산란 검출법

자외선 공명 라만 산란(UVRR)은 분석 시료의 전자전이(electron transition)에 해당하는 UV 흡수 영역에 입사광의 주파수를 공명시켰을 때 발생하며 대략 10^6 이상의 신호 증강률을 가진다[2, 11, 19]. 앞선 방법들과는 달리 별도의 SERS 기판이 필요없고 입사광으로서 자외선 레이저가 필요하다. UV 공명 흡수에 따라 신호 증강이 일어나므로 다양한 혼합물 중 분석하고자 하는 시료에 대한 분자 선택성이 앞선 방법들에 비해 상대적으로 높다. UVRR를 이용한 검출법에서는 NO^{2-} 와 NO^{3-} 에 대해 $14 \mu\text{M}$ (200 ppb) [11], 다환방향족 탄화수소계열인 피렌과 안트라센(anthracene)에 대해서는 10^{-7} M (20 ppb) 수준의 검출한계가 보고되었다[2]. 단점으로는 공명 흡수에 의해 필연적으로 발생하는 형광 배경잡음 때문에 라만 신호 측정에 어려움이 있을 수 있는데 레이저 공명 주파수를 심-자외선(deep UV) 쪽으로 적절히 조절하면 이러한 문제를 피할 수 있다. 그러나 장시간 심-자외선 노출이 있을 경우 원치 않는 광화학 반응으로 인해 시료 변성이 발생할 가능성이 존재하며 따라서 분석시료의 심-자외선 안정도가 추가로 요구된다. 또한 가시광선에 비해 자외선 레이저 사용 시 통상적으로 주파수 분해능이 저하되므로 초점거리가 긴 분광기를 사용하거나 여러 개의 분광기를 붙여서 사용하는 등 측정장치의 부피가 커지는 한계가 있다. 그럼에도 불구하고 UVRR 방법은 검출감도와 시료 선택성 및 신호 재현성이 타 방법에 비해 전반적으로 모두 우수한 편이기 때문에 적절한 형광 제거 기술 및 고분해능 라만 측정장비 소형화 기술 개발을 통해 향후 타 방법과의 상보적인 분석 도구로서의 활용가치가 매우 높을 것으로 판단된다.

향후 벤조피렌 검출 연구의 전망

벤조피렌에 대한 인체 노출위험에 대처하기 위해서는 식용유지 생산단계에서의 발암물질인 벤조피렌 저감화 방안에만 연구뿐 아니라, 제조 공정에서 즉각적으로 벤조피렌을 정량할 수 있는 측정법 개발이 시급하다. 현재 시행되고 있는 벤조피렌 검출법의 단점을 보완할 수 있는 새로운 검출 도구 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다. 현재 식품산업에서는 Raman spectroscopy를 비롯한 비파괴, 비표지 물질검출법이 아직은 초기단계에 머물러 있다. 이 총설에서 벤조피렌 검출에 적용 가능한 다양한 분석법에 대해 살펴본 바에 의하면 복잡한 시료 전처리 과정이 필요한 기존 방법과는 달리 라만 분광법에서는 시간과 비용의 절감 및 비파괴 분석이 가능한 장점이 있다. 그러나 아직은 라만 분광법을 식품 내 위해물질 검출에 현장 적용할 수 있는 기술적 토대가 확립되어 있지 않다. 따라서 본 총설에서 언급한 SERS,

GERS 및 UVRR 등의 검출법 개발 연구를 심화 발전시키고 향후 휴대용 라만 분석 장치와 접목시킨다면 시장 유통단계나 식품 관리 현장에서 직접 적용 가능한 새롭고 신속한 식품 위해물질 검출법의 출현이 머지않아 가능할 것으로 전망된다.

요약

국내 식품공전에 기술되어 시행중인 식품 내 벤조피렌 분석법은 회수율, 검출 및 정량 한계, 효용성과 정확성 등이 검증되어 적용되고 있다. 그러나, 기존의 시험법에는 시료의 추출 및 분리, 정제 등의 복잡한 전처리 과정이 포함되어 있다. 환경 및 식품 내 위해물질 검출법의 연구 및 개발의 현 추세는 시험비용과 시간소모를 최소화하고 시험과정을 단순화할 수 있는 비표지, 비파괴 분석법을 통해 관리 현장에서의 신속대응을 지향하고 있다. 본 총설에서는 현행의 벤조피렌 분석법에 대해 정리하고, 그 한계점을 극복하기 위한 새로운 시도로 라만 분광법을 이용한 벤조피렌 검출법에 대해 소개하고자 한다.

Acknowledgments

This work was supported by the Ewha Womans University Research Grant of 2015 to J.-K. Rhee from Ewha Womans University and the Korea Basic Science Institute Grant (T35428) to H. Rhee.

References

- Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi J-P, Dogliotti E, Domenico AD, et al. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *EFSA. J.* **724**: 1-114.
- Asher SA. 1984. Ultraviolet resonance Raman spectrometry for detection and speciation of trace polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* **56**: 720-724.
- Bao L, Sheng PT, Li J, Wu SY, Cai QY, Yao SZ. 2012. Surface enhanced Raman spectroscopic detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using a gold nanoparticles-modified alginate gel network. *Analyst.* **137**: 4010-4015.
- Castegnaro M, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer., France. Ministère de l'environnement. 1991. *Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes : some polycyclic heterocyclic hydrocarbons*. International Agency for Research on Cancer, Distributed in the USA by Oxford University Press, Lyon, France / New York.
- Cho HK, Kim M, Park SK, Shin HS. 2011. Analysis of

- Benzo[a]pyrene Content and Risk Assessment. *Korean J. Food Sci. Animal. Resour.* **31**: 960–965.
6. Chung S-Y, Sho Y-S, Park S-K, Lee E-J, Suh J-H, Choi, W-J, *et al.* 2004. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils and fats. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 668–691.
 7. Falco G, Domingo JL, Llobet JM, Teixido A, Casas C, Muller L. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: Human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J. Food Protect.* **66**: 2325–2331.
 8. Fesenko O, Dovbeshko G, Dementjev A, Karpicz R, Kaplas T, Svirko Y. 2015. Graphene-enhanced Raman spectroscopy of thymine adsorbed on single-layer graphene. *Nanoscale. Res. Lett.* **10**: 163.
 9. Fu S, Guo X, Wang H, Yang T, Wen Y, Yang H. 2015. Functionalized Au nanoparticles for label-free Raman determination of ppb level benzopyrene in edible oil. *Sensors. Actuators. B: Chem.* **212**: 200–206.
 10. Hu S-J, Jin S-H, Lee K-H, Choi D-M. 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in processed foods. *Anal. Sci. Technol.* **23**: 196–204.
 11. Ianoul A, Coleman T, Asher SA. 2002. UV resonance Raman spectroscopic detection of nitrate and nitrite in wastewater treatment processes. *Anal. Chem.* **74**: 1458–1461.
 12. Incheon Airport Customs Analysis Team. 2008. Public harmful substance(Monitoring of benzopyrene in food processing). *Guideline of Incheon airport customs analysis team.*
 13. International Agency for Research on Cancer. 2010. Agents Classified by the IARC Monographs. 92.
 14. Ireland J, Bemrah-Ouachria N, Thebault A, Pouillot R, Volatier J. 2004. Collection of occurrence data on polycyclic aromatic hydrocarbon in food. *Reports on tasks for scientific cooperation: Report of participating in Task 3.2.12.*
 15. Jang M-R, Hong M-S, Jung S-Y, Choi B-C, Lee K-A, Kum J-Y, *et al.* 2014. Analysis and Risk Assessment of Benzo[a]pyrene in Edible Oils. *J. Food Hyg. Safety* **29**: 141–145.
 16. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2005. Food Contaminants. *Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).*
 17. Kato K, Shoda S, Takahashi M, Doi N, Yoshimura Y, Nakazawa H. 2003. Determination of three phthalate metabolites in human urine using on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **788**: 407–411.
 18. KFDA (Korea Food and Drug Safety Administration). 2011. Food acts and subordinate statutes, notifications, etc. *Food code of KFDA (Korea Food and Drug Safety Administration).*
 19. Kim H, Kosuda KM, Van Duyne RP, Stair PC. 2010. Resonance Raman and surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy methods to study solid catalysts and heterogeneous catalytic reactions. *Chem. Soc. Rev.* **39**: 4820–4844.
 20. Kim M. 2014. Analysis of PAHs Amounts in Vegetable Oils Sold at Domestic Market. *Master Thesis (ChungAng University).*
 21. Kim M. 2014. Risk management of benzo[a]pyrene in food company. *Food Ind. Nutr.* **19**: 15–19.
 22. Kim S. 2009. Examination of Benzopyrene in herb medicine. *Guide Book of NIFDS (National Institute of Food and Drug Safety evaluation).*
 23. Kim S. 2014. Policy of reducing benzopyrene in foods. *Food Ind. Nutr.* **19**: 5–12.
 24. Kolomijeca A, Kronfeldt HD, Kwon YH. 2013. A portable surface enhanced raman spectroscopy (SERS) sensor system applied for seawater and sediment investigations on an arctic sea-trial. *International. J. Offshore. Polar. Eng.* **23**: 161–165.
 25. Lee H-M. 2009. Risk management study and cost benefit analysis of benzopyrene in foods. *Final report of KFDA(Korea Food and Drug Safety Administration).*
 26. Lee K-H. 2008. Analysis of benzopyrene in foods. *Guideline of of KFDA (Korea Food and Drug Safety Administration).*
 27. Lin WH, Lu YH, Hsu YJ. 2014. Au nanoplates as robust, recyclable SERS substrates for ultrasensitive chemical sensing. *J. Colloid. Interface Sci.* **418**: 87–94.
 28. Lund M, Duedahl-Olesen L, Christensen JH. 2009. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. *Talanta.* **79**: 10–15.
 29. Nahorniak ML, Booksh KS. 2006. Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy in conjunction with multiway analysis for PAH detection in complex matrices. *The Analyst.* **131**: 1308.
 30. Ni Y, Wang P, Song H, Lin X, Kokot S. 2014. Electrochemical detection of benzo[a]pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-graphene biosensor. *Anal. Chim. Acta.* **821**: 34–40.
 31. Oh SS. 2011. Outbreak mechanism and properties of novel harmful substances. *Research Report of Youlchol Foundation.*
 32. Olatunji OS, Fatoki OS, Opeolu BO, Ximba BJ. 2014. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography – Flame ionization detector. *Food Chem.* **156**: 296–300.
 33. Phillips DH. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mut. Res.-Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* **443**: 139–147.
 34. Rosenlund M, Bellander T, Nordquist T, Alfreidsson L. 2007. Long-term exposure to air pollution and cancer. *Epidemiol.* **18**: S66–S66.
 35. Shin BR, Yang S-O, Kim Y-S. 2014. Trends in the reduction of benzo[a]pyrene in sesame oils. *Food Ind. Nutr.* **19**: 5–12.
 36. Shin H-S. 2010. Improvement of analytical method for benzo[a]pyrene in foods and study on monitoring and exposure. *Contaminated chemical division, KFDA (Korea Food and Drug Safety Administration).*
 37. Soo JH. 2005. Carcinogenic risk assessment and comparison

- of contamination pattern by construction of analytical method of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Doctral Thesis (Sungshin Women's University)*.
38. Sung T-K, Lee J-S, Lee H-G. 2012. Benzo(a)pyrene contents in commercial vegetable oils and changes during processing of vegetable oils. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 269–273.
 39. Theophanides M, Anastassopolou J, Theolphanides T. 2008. Air Pollution and Cancer. *Anticancer. Res.* **28**: 3554–3554.
 40. Tseng W-C, Chen P-S, Huang S-D. 2014. Optimization of two different dispersive liquid–liquid microextraction methods followed by gas chromatography–mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. *Talanta.* **120**: 425–432.
 41. Vainio H, International Agency for Research on Cancer. 1992. *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. International Agency for Research on Cancer, Distributed in the USA by Oxford University Press, Lyon, New York.
 42. Varlet V, Serot T, Monteau F, Le Bizec B, Prost C. 2007. Determination of PAH profiles by GC-MS/MS in salmon processed by four cold-smoking techniques. *Food Addit. Contam.* **24**: 744–757.
 43. Wang N, Yang H-F, Zhu X, Zhang R, Wang Y, Huang G-F, et al. 2009. Synthesis of anti-aggregation silver nanoparticles based on inositol hexakisphosphoric micelles for a stable surface enhanced Raman scattering substrate. *Nanotech.* **20**: 315603.
 44. Yoon H-J. 2013. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Report of Food Contaminants Divison, NIFDS (Natioal Institute of Food and Drug Safety Evaluation)*.