

식용유지와 영유아식품 중 아플라톡신 분석방법

허수정 · 박승영 · 김순선 · 이준구 · 송지영 · 강은귀 · 이현숙 · 조대현★

경인지방식품의약품안전청 유해물질분석과

(2011. 2. 25. 접수, 2011. 3. 21. 승인)

Analytical method of aflatoxins in edible oil and infant-children foods

Soojung Hu, Seungyoung Park, Soonsun Kim, Joongoo Lee, Jiyoung Song,
Eungi Kang, Hyunsook Lee and Daehyun Cho★

Hazardous Substances Analysis Division, Incheon Regional Food & Drug Administration
#217 Juanyeok-Gil, Nam-Gu, Incheon 402-835, Korea

(Received February 25, 2011; Accepted March 21, 2011)

요 약: 아플라톡신은 *Aspergillus flavus*와 *A. parasiticus*에 의해 생성되는 독소대사산물로 발암물질이며 곡류(옥수수, 쌀, 보리), 땅콩, 과일류 및 종자류의 생산과 저장과정에서 생성된다. 곰팡이가 생성되기 쉬운 조건에서 오랜 기간 저장된 종자류에서 아플라톡신이 생성될 가능성이 있으며 이를 원료로 하여 유지로 가공 할 때도 아플라톡신이 이행될 우려가 있다. 또한 곡류나 두류 등을 가공하여 만든 영유아용식품도 아플라톡신 오염 가능성이 있다. 따라서 본 연구는 식용유지 및 영유아용식품에 대해 액체 추출법의 아플라톡신 시험법 적용가능 여부를 검토하고 필요시 새로운 분석방법을 확립하고자 하였다. 식용유지에 대한 아플라톡신은 MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion)법으로 아플라톡신을 추출해 내고 면역친화성 칼럼을 사용해 정제하여 형광검출기가 장착된 고성능액체크로마토그래피(HPLC/FLD)를 이용해 분석하였다. 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂) 검량선의 직선성은 상관계수가 0.999 이상을 나타냈고 회수율은 85.9~93.0%의 양호한 결과를 얻었으며 상대표준편차는 5.7% 이하였다. 식용유지에서 액체 추출법과 비교해 볼 때, MSPD-면역친화성칼럼법을 사용하여 회수율을 향상시켜 시험법을 확립하였다. 영유아용식품에 대한 아플라톡신 분석방법은 액체 추출법이 적합하였으며 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂)에 대한 회수율은 89.5~92.3%로 양호한 결과를 얻었다.

Abstract: Aflatoxins are secondary metabolites of the molds of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. They are highly carcinogenic compounds and can affect a wide range of vegetable commodities such as cereals (especially corn), nuts, peanuts, fruits and oil seeds, in the field and during storage. In fact, oilseeds are often stored for weeks in conditions that promote the mould growth, and the possible consequent presence of aflatoxins in oilseeds can lead to their transfer in oil. In addition, aflatoxins can be found as a natural contaminant in multi-cereals and beans making baby food for infants and young-children. The objective of this study was to validate the liquid extraction method or develop an analytical method for edible oil and infant-children foods. Therefore, this study developed condition of extract for aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) in edible oil using a

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)32-450-3251 Fax : +82-(0)32-429-3388

E-mail : dhcho5@korea.kr

high performance liquid chromatography with florescence detector (HPLC/FLD). Aflatoxins were extracted from edible oil samples by means of MSPD (Matrix solid phased dispersion), utilizing C_{18} as dispersing material and purified by using immunoaffinity column. The gression line coefficients were above 0.999. The recoveries for aflatoxins ranged from 85.9 to 93.0%, and relative standard deviations were below 5.7%. The new developed method of aflatoxins effectively enhanced recoveries by using MSPD-Immunoaffinity column compared with liquid extraction. The analytical method for liquid extraction of aflatoxin was appropriate for infant-children food. Reviewing the current method, the recoveries of aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 and G_2) were 89.5~92.3%.

Key words: edible oil, infant-children food, aflatoxins, analysis

1. 서 론

아플라톡신류(Aflatoxins)은 식품 및 농산물과 관련하여 *Aspergillus. flavus* 및 *Aspergillus. parasiticus* 등의 진균류에 의해 생성되며, 인간과 가축에게 가장 치명적인 독성을 나타내는 독소로 간에 직접적인 영향을 미쳐 간암을 일으키는 등 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 인체발암 물질 Group 1으로 분류하고 있다. 주로 땅콩 등의 견과류 및 쌀, 보리, 밀, 옥수수 등과 같은 곡류에서 온도 28~30, 상대습도 80~85% 조건의 고온다습한 열대나 아열대지방에서 잘 생성되며 수확에서 건조까지 저장기간이 길고 환기가 불충분할수록 잘 생성되는 것으로 알려져 있다.^{1,3} 아플라톡신에 관한 연구는 1960년 영국에서 곰팡이(*Aspergillus flavus*)로 오염된 브라질산 땅콩사료를 먹인 칠면조 10만 마리가 집단 폐사한 사건으로 시작되었다.⁴ 아플라톡신은 coumarin ring 구조에 dihydrofuran이나 tetrahydrofuran의 일부가

결합된 형태로 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2 (Fig. 1) 등이 대표적이며 곰팡이의 종에 따라 이성체가 약 20여 종이 있는 것으로 알려져 있다.⁵ 이들은 무색에서 연노랑색의 결정체로 자외선 하에서 나타내는 형광의 색에 따라 B (blue)군, G (green)군으로 구분되며 동물의 소변과 우유에서 발견되는 M (metabolized)군은 대사물질로 청자색(blue-violet)형광을 나타낸다.⁶ 아플라톡신의 독성은 모두 다르며 이 중 아플라톡신 B_1 이 급성독성 및 만성독성 시험에서 가장 강력한 독성을 나타내고 그 다음은 아플라톡신 G_1 , B_2 , G_2 순이다. 또한 물, hexan, 에테르와 같은 비극성 용매에는 거의 녹지 않지만 클로르포름, 메탄올과 같은 중간정도의 극성유기 용매에 잘 녹는 것으로 알려져 있다.⁷ 강산(pH 3.0이하) 및 강알칼리(pH 10 이상)에 불안정하나 열에 대해서는 안정하며 270~280 °C 이상으로 가열하지 않으면 분해되지 않기 때문에 보통의 식품 가공상의 가열처리 또는 조리를 해도 독성이 남아있다. 오염된 식품 및 원료를 통하여 가축 및 인간에게 건강

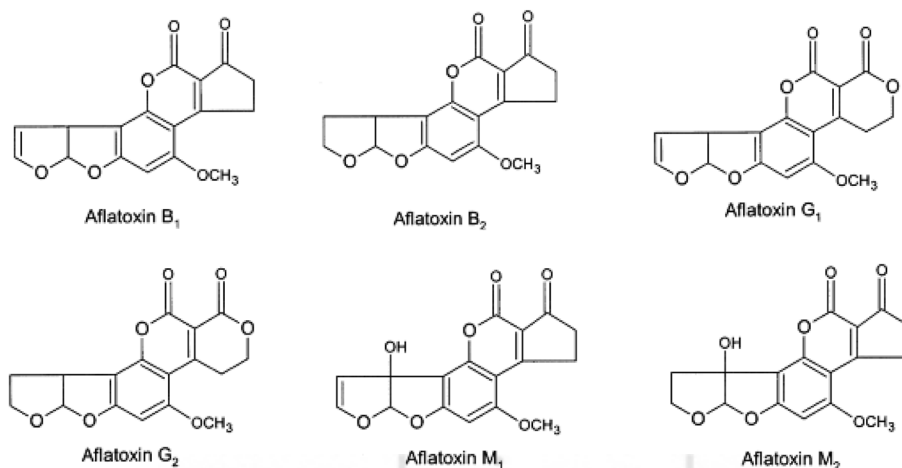


Fig. 1. Chemical structure of Aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2).

상 위해를 나타내게 되며 아플라톡신 M_1 , M_2 는 아플라톡신 B_1 , B_2 의 생체 대사체로 동물의 조직이나 우유에 잔존함으로써 인간에게 이차적인 위해를 나타낸다. 아플라톡신 분석에 있어서 초기에는 주로 thin layer chromatography (TLC)와 자외선을 이용한 분석방법이 이용되어 왔으나, 민감도가 낮고 정량 분석이 어려운 단점을 가지고 있어 최근에는 TLC보다 더 선택적이고 효율성 있는 면역친화성컬럼(immunoaffinity column)을 이용한 HPLC/FLD 분석방법으로 대체되었다.⁸⁻¹⁰ 아플라톡신 분석은 시료 채취, 시료 전처리, 추출, 정제, 농축 및 HPLC를 이용한 기기분석 과정을 거쳐 이루어지며, HPLC를 이용한 분석 시 형광검출기(fluorescence detector)를 사용하면 자외선흡광검출기를 사용한 방법에 비해 30~40배 정도 높은 민감도를 가진다.^{11,12} 그러나 아플라톡신 B_1 , G_1 은 아플라톡신 B_2 , G_2 에 비해 상대적으로 형광성이 낮아 검출한계가 높은 단점을 가지고 있어 유도체화 과정을 통해 검출 신호를 높여 분석하고 있다. 아플라톡신을 유도체화 시키는 방법은 TFA처리하여 hemiacetal 유도체를 형성시키는 컬럼 전 유도체화 방법¹³과 bromine이나 iodine을 가지고 유도체화를 시키거나 광화학반응장치(photochemical reactor)를 이용해 유도체화 시키는 컬럼 후 유도체화 방법이 있다.¹⁴ 컬럼 전 유도체화 방법을 사용 시 아플라톡신 B_2 , G_2 는 포화된 구조를 가지고 있기 때문에 유도체화가 되지 않아 신호(signal)의 차이가 없으나 아플라톡신 B_1 과 G_1 은 형광성이 높아져서 좋은 감도를 보여준다.¹⁵ 현재 식품공전에는 곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그 가공품, 된장, 고추장, 고춧가루 등에 대하여 TLC에 의한 시험법과 추출 후 TFA로 유도체화 시켜 HPLC/FLD를 이용한 시험법이 수록되어 있다.¹⁶ 일반적으로 시료의 성상에 따라 전처리 방법이 다르게 적용될 수 있으므로 본 연구에서는 식용유지 및 영유아용식품에 대하여 액체 추출법이 적용 가능한 지를 검토하고 개선함으로써 이들 식품에 대한 분석방법을 확립하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

분석에 사용한 표준품은 아플라톡신혼합액(Aflatoxin Mix varied in benzene: acetonitrile (98:2), Supelco)으로 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 가 포함된 것을 사용하였으며, 트리플루오로초산(trifluoroacetic acid)은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 용매로서 메탄올(HPLC

grade, Burdick & Jackson, Seoul, Korea), 아세토니트릴(acetonitrile, HPLC grade, Burdick&Jackson)을 사용하였고, 시료 전처리와 이동상에 사용되는 물은 초순수를 사용하였다. 아플라톡신용 면역친화성컬럼(Immunoaffinity column)은 Afla Test™ WB(VICAM)를 사용하였다.

2.2. 기기

고속액체크로마토그래프(high performance liquid chromatograph)는 형광검출기(fluorescence detector)가 장착된 HPLC/FLD (Shiseido, Japan)를 사용하였으며, 컬럼은 Capcell pak- C_{18} column (25 cm×4.5 mm, I.D. 5 μ m)를 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 표준용액 조제

아플라톡신 혼합용액을 아세토니트릴로 희석하여 아플라톡신 혼합 표준용액으로 하고, 이 액을 검량선 작성을 위한 표준용액으로 사용하였다. 식용유지 중 아플라톡신 분석 시 아플라톡신 혼합용액을 아세토니트릴로 1, 2, 5, 10, 25 μ g/kg (아플라톡신 B_1 기준, $B_1:B_2:G_1:G_2 = 1:0.28:0.94:0.28$)의 농도가 되도록 희석하고, 영유아용식품 중 아플라톡신 분석시 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μ g/kg (아플라톡신 B_1 기준, $B_1:B_2:G_1:G_2 = 1:0.28:0.94:0.28$)의 농도로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 하였다.

2.3.2. 식용유지의 전처리 방법

C_{18} 분말 2.5 g을 유발에 취하고 검체 500~600 g을 실온에서 30분간 진탕추출기와 초음파추출기로 균질화 후 0.5 g을 정밀히 달아 유발에 넣고 유봉으로 C_{18} 분말과 검체가 완전히 균질화되게 하였다. 그리고 여과지(Whatman No. 1) 2장을 10 mL 주사기에 넣고 균질화된 혼합물을 주사기에 옮겨 담았다. 이후 혼합물 위에 여과지 1장을 놓고 주사봉을 이용하여 혼합물의 부피가 약 4.0 mL되게 압축하였다. 메탄올 10 mL로 압축된 혼합물을 용출한 후 용출액에 1% tween 20을 가하여 50 mL가 되도록 희석하고 전액을 면역친화성 정제용 컬럼에 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시켰다. 이어서 물 10 mL를 같은 유속으로 유출시키고 컬럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 아세토니트릴 3 mL로 용출시켰다. 용출액을 50 °C에서 감압 건조시키고 잔류물에 트리플루오로초산 0.2 mL를 가하여 어두운 곳에서

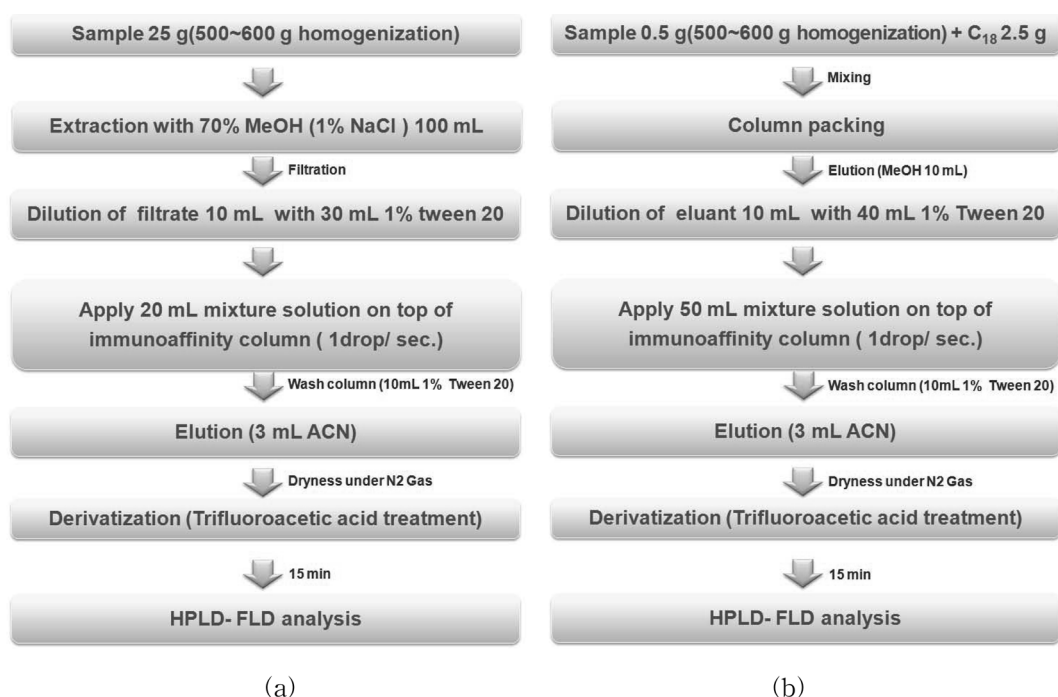


Fig. 2. Comparison of aflatoxin sample preparation methods between (a) liquid extraction method and (b) improved method.

15분간 방치시킨 후 아세트니트릴·물(20:80, v/v) 혼합 용액 0.8 mL를 가하여 혼합하고 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과하여 HPLC/FLD로 분석하였다. 액체 추출법과 차이점은(Fig. 2)에 나타내었다.

2.3.3. 영유아용식품의 전처리 방법

검체를 분쇄하여 균질화 한 후 시료 25 g을 정밀히 달아 추출용액(염화나트륨 1 g을 물 30 mL에 녹인 후 메탄올 70 mL을 가하여 혼합한 용액) 100 mL를 가하고 균질기로 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과하였다. 여액 10 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 1% Tween 20 용액 30 mL를 가하여 흔들어 섞은 후 유리섬유여과지로 여과한 것을 추출액으로 하였다. 추출액 20 mL를 면역친화성 칼럼에 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시켰다. 이어서 물 10 mL를 같은 유속으로 유출시키고 칼럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 아세트니트릴 3 mL로 용출시켰다. 용출액을 50°C에서 질소로 건조시키고 잔류물에 트리플루오로초산 0.2 mL를 가하여 어두운 곳에서 15분간 방치시킨 후 아세트니트릴·물(20:80, v/v) 혼합용액 0.8 mL를 가하여 혼합하고 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과하여 HPLC/FLD로 분석하였다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC/FLD

Parameters	Conditions
Instrument	Nanospace System (Shiseido, Japan)
Detector	FLD (Em : 360, Ex : 450)
Column	Capcell pak-C ₁₈ (5 μ m, 4.5 mm \times 250 mm)
Mobile phase	ACN : D.W. = 25 : 75
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μ L
Oven temperate	40 °C

2.3.4. 기기 분석

아플라톡신을 정량분석하기 위해 형광검출기가 장착된 HPLC/FLD (Shiseido, Japan)를 사용하였다. 아플라톡신 분석에 사용된 이동상 및 기기조건은 Table 1과 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 식용유지

아플라톡신 혼합표준용액을 5단계로 희석하여 직선성을 확인하였다. 실험은 3회 반복하였으며 각각의 농

Table 2. Concentrations of standard aflatoxins used to certificate linearity

Aflatoxins	Concentrations of aflatoxins ($\mu\text{g/kg}$)				
	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
G ₁	1.75	3.40	6.81	13.63	27.27
B ₁	1.55	3.10	6.20	12.41	24.82
G ₂	0.51	1.02	2.05	4.11	8.22
B ₂	0.49	0.99	0.99	3.98	7.97

Table 3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of aflatoxins

Aflatoxins	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
G ₁	0.18	0.59
B ₁	0.10	0.34
G ₂	0.08	0.26
B ₂	0.05	0.18

도 범위(Table 2)안에서 상관계수는 0.9992~0.9999로 양호한 직선성을 보였다. 크로마토그램에서 얻어진 peak의 신호대 잡음비(S/N, signal to noise ratio)를 3과 10으로 하였을 때 검출한계와 정량한계는 Table 3

Table 4. Recoveries of aflatoxins in sesame oil (unit: %)

Aflatoxins	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)		
	5	10	20
G ₁	82.2 \pm 2.1	85.9 \pm 2.5	95.2 \pm 2.4
B ₁	85.3 \pm 2.3	86.8 \pm 0.6	95.2 \pm 2.7
G ₂	80.9 \pm 2.1	86.8 \pm 4.7	91.7 \pm 1.8
B ₂	94.0 \pm 3.0	93.0 \pm 5.7	104.9 \pm 2.3

과 같았다. 또한, 참기름시료에 혼합표준용액(아플라톡신 B₁:B₂:G₁:G₂=1:0.28:0.94:0.28)을 아플라톡신 B₁을 기준으로 10 $\mu\text{g/kg}$ 으로 첨가하여 전처리과정에 따라 6회 반복 실험한 결과, 상대표준편차(CV, %)는 2.5~8.1%로 만족할 만한 수준이었다. 회수율 측정을 위해 참기름시료에 아플라톡신 B₁을 기준으로 5, 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ 이 되도록 혼합표준용액(아플라톡신 B₁:B₂:G₁:G₂농도비=1:0.28:0.94:0.28)을 첨가하여 회수율을 3회 반복 실험한 결과 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 회수율이 각각 85.3~95.2, 93.0~104.9, 82.2~95.2 및 80.9~91.7%로 나타났다(Table 4).

콩기름에서 MSPD법을 사용하여 메탄올로 추출하

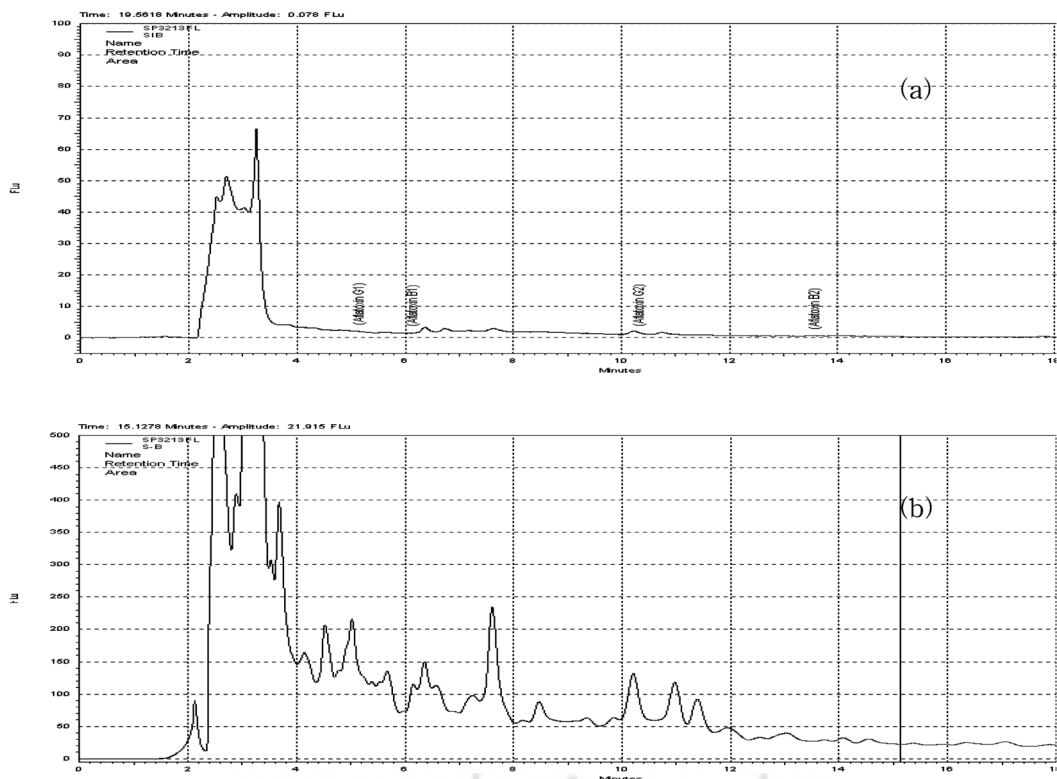


Fig. 3. Comparison of chromatogram according to the (a) MSPD method & (b) MSPD-Immuno affinity column method.

는 방법¹⁷을 시도하였을 때 매트릭스의 영향 없이 아플라톡신(G_1 , B_1 , G_2 , B_2)의 특이성이 입증되었다, 반면, 참기름에서는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 매트릭스의 영향으로 분석이 불가하였으나 아플라톡신에 선택성을 갖는 면역친화성 컬럼을 이용한 정제로 매트릭스 영향을 해결하였으며 그 이후의 TFA 유도체화 과정은 액체 추출법과 동일하게 실험하였다.

액체 추출법의 식용유지 분석 적합성과 본 연구 시험법의 적합성을 비교해 보기 위해 식용유지에 아플라톡신 B_1 을 기준으로 10 $\mu\text{g/kg}$ 이 되도록 혼합표준용액(아플라톡신 $B_1:B_2:G_1:G_2$ 농도비=1:0.28:0.94:0.328)을 첨가하여 회수율을 비교해 보았다. 그 결과 액체 추출법으로 분석하였을 때 아플라톡신 G_1 , B_1 은 각각 80.3, 90.6%로 양호한 회수율을 보였으나 G_2 , B_2 는 각각 44.0%, 49.6%로 나타났다. 반면 MSPD-면역친화성 컬럼법을 이용한 식용유지 중 아플라톡신 시험법의 회수율은 G_1 , B_1 , G_2 및 B_2 는 각각 97.2, 84.8, 89.9 및 100.0%로 액체 추출법에 의한 회수율 80.3 90.6 44.0 49.6% 보다 향상되었다(Table 5). 또한 다양한 식용유지에서 회수율에 차이가 없는지를 확인하기 위하여 참기름, 들기름, 콩기름, 향미유 및 옥수수유를 대상으로 실험한 결과 모든 아플라톡신이 78.1~100.0%의 양호한 회수율을 보였다(Table 6).

3.2. 영유아용식품

아플라톡신 혼합표준용액을 5단계로 희석하여 직선성을 확인하였다. 실험은 3회 반복하였으며 각각의 농

Table 5. Comparison of recoveries aflatoxins according to liquid extraction & MSPD methods

Aflatoxins	Recovery(%)	
	Liquid extraction method	MSPD method
G_1	80.3 \pm 4.8	97.2 \pm 5.1
B_1	90.6 \pm 2.3	94.8 \pm 4.1
G_2	44.0 \pm 11.2	89.8 \pm 5.4
B_2	49.6 \pm 10.1	100.0 \pm 4.5

Table 6. Recoveries of aflatoxins in various edible oils

Afltoxins	Recovery(%)				
	Sesame oil	Perilla oil	Soybean oil	Flavored oil	Corn oil
G_1	85.9 \pm 2.5	88.5 \pm 13.9	97.2 \pm 5.1	91.0 \pm 2.4	95.1 \pm 11.9
B_1	86.8 \pm 0.6	91.0 \pm 5.6	94.8 \pm 4.1	87.1 \pm 1.8	80.1 \pm 2.9
G_2	86.8 \pm 4.7	78.1 \pm 4.8	89.8 \pm 5.4	83.0 \pm 1.3	79.3 \pm 4.8
B_2	93.0 \pm 5.7	95.2 \pm 2.6	100.0 \pm 4.5	89.4 \pm 1.7	81.4 \pm 2.5

도 범위(Table 7)안에서 상관계수는 0.996~0.997으로 양호한 직선성을 보였다. 신호대 잡음비(S/N, signal to noise ratio)를 3과 10으로 하였을 때 검출한계와 정량한계는 Table 8과 같았다. 영유아용식품에 혼합 표준용액(아플라톡신 $B_1:B_2:G_1:G_2$ =1:0.28:0.94:0.28)을 아플라톡신 B_1 을 기준, 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 으로 첨가하여 전처리 과정에 따라 6회 반복 실험한 결과, 상대표준편차(CV, %)는 2.9~7.8로 만족할 만한 수준이었다. 아플라톡신 분석법에 대한 회수율을 측정하기 위해 영유아용식품에 아플라톡신 B_1 을 기준으로 0.1, 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 이 되도록 혼합표준용액(아플라톡신 $B_1:B_2:G_1:G_2$ 농도비=1:0.28:0.94:0.28)을 첨가하여 회수율을 3회 반복하여 실험한

Table 7. Concentrations of standards aflatoxins used to certificate linearity

Aflatoxins	Concentrations of aflatoxins ($\mu\text{g/kg}$)				
	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
G_1	0.06	0.11	0.16	0.22	0.27
B_1	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
G_2	0.02	0.03	0.05	0.07	0.08
B_2	0.02	0.03	0.05	0.06	0.08

Table 8. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of aflatoxins

Aflatoxins	LOD(/kg)	LOQ(/kg)
G_1	0.016	0.053
B_1	0.006	0.019
G_2	0.004	0.012
B_2	0.005	0.015

Table 9. Recoveries of aflatoxins in infant-children food

Aflatoxins	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	
	0.1	0.2
G_1	92.3 \pm 10.1	85.4 \pm 2.5
B_1	91.2 \pm 10.1	82.9 \pm 1.8
G_2	89.5 \pm 8.1	85.9 \pm 1.8
B_2	90.7 \pm 9.0	86.1 \pm 1.9

결과 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 회수율이 각각 82.9~91.2%, 86.1~90.7%, 85.4~92.3% 및 85.9~89.5%로 나타났다(Table 9).

식품공전의 아플라톡신 시험법 중 액체 추출법은 곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그 가공품, 된장, 고추장, 고춧가루 등에 적용가능하다. 본 연구의 대상식품인 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식 및 기타 영·유아식은 곡류 및 두류 등을 주성분으로 하여 가공한 것이고, AOAC의 영유아용 식품 중 아플라톡신 분석의 전처리방법¹⁸을 보면 액체 추출법의 전처리 방법과 비슷하였다. 따라서 영유아용식품 중 아플라톡신 분석은 액체 추출법으로 적용 가능할 것으로 판단되었다. 다만, 영유아용식품에서 아플라톡신을 분석한 기존의 연구들¹⁹⁻²⁰을 보면 기기분석조건에서 주입량을 100~1000 μ L로 늘려 0.10 μ g/kg 이하의 낮은 농도에서도 분석이 가능하게 하였다. 따라서 본 연구에서도 아플라톡신 B₁이 약 0.02, 0.05, 0.1 및 0.2 μ g/kg이 되도록 첨가한 영유아용식품을 액체 추출법으로 전처리 한 후 HPLC/FLD의 주입량을 50, 100 μ L로 비교 분석하였으며, 식품공전의 액체 추출법에 제시되어있는 10 μ L에서도 분석하여 비교하였다. 그 결과 주입량을 10 μ L로 하였을 때 모든 농도에서 peak의 신호가 나타나지 않았으며 주입량을 50 μ L와 100 μ L로 하였을 때의 검출한계와 정량한계는 Table 10과 같아 주입량을 100 μ L로 최적화 하였다.

본 연구에서 확립한 아플라톡신 시험법 중 영유아용 식품에 대한 분석방법을 검증하기 위해 영국 DEFRA (Department for Environment Food and Rural Affairs) 산하 기관인 FERA (Food & Environment Assessment Research)에서 주관하는 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) 검사능력관리프로그램의 Aflatoxin B&G&/total in baby food 분석에 참여하였다. 총 35개 기관이 참여하였으며 분석결과는 정규분포에 따라 통계처리 되어 Z-score값이 -2~+2의 범위에 들어가면 'satisfactory'로 판정된다. 본 연구에서 확

Table 10. Comparison of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of aflatoxins according to injection volume

Aflatoxins	LOD (μ g/kg)		LOQ (μ g/kg)	
	50 μ L	100 μ L	50 μ L	100 μ L
G ₁	0.012	0.016	0.042	0.053
B ₁	0.009	0.006	0.032	0.019
G ₂	0.007	0.004	0.024	0.012
B ₂	0.007	0.005	0.023	0.015

립한 방법으로 분석한 결과, Aflatoxin B&G&/total in baby food 전 항목에서 'satisfactory'를 받았으며 양호한 Z-score값(Fig. 4~8)으로 영유아용식품 중 아플라톡신 분석능력을 인증받았다.

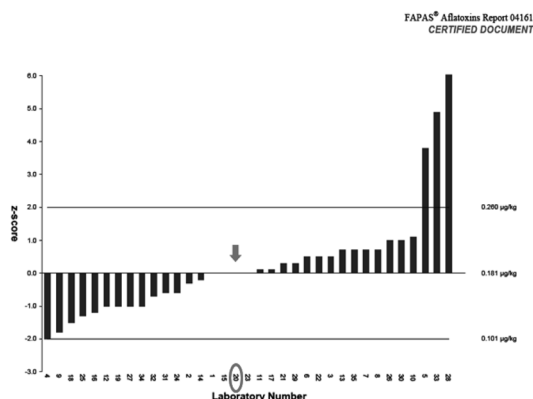


Fig. 4. Z-score for Aflatoxin B₁.

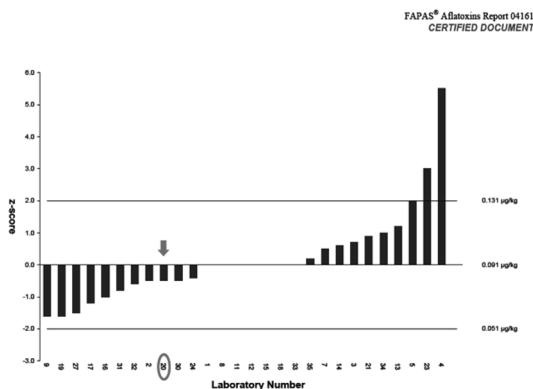


Fig. 5. Z-score for Aflatoxin B₂.

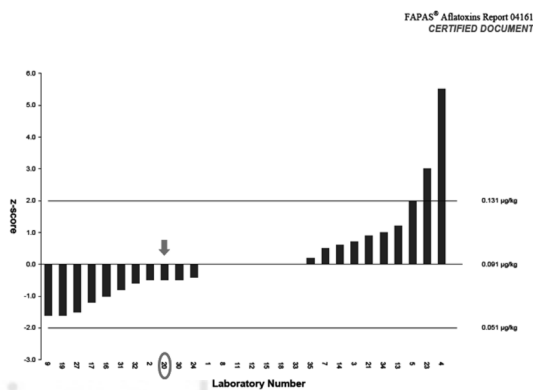


Fig. 6. Z-score for Aflatoxin G₁.

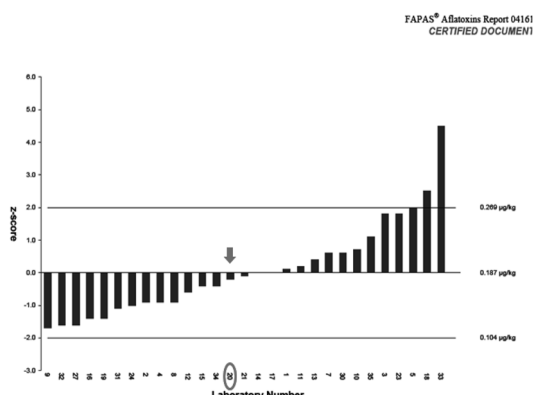


Fig. 7. Z-score for Aflatoxin G₂.

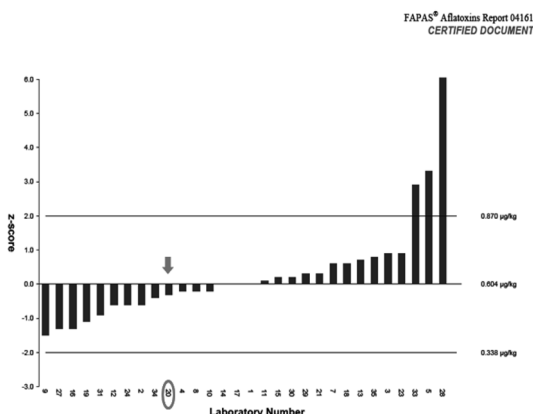


Fig. 8. Z-score for Total Aflatoxin.

4. 결 론

식용유지 중 아플라톡신 분석은 MSPD (matrix solid phase dispersion)법으로 아플라톡신을 추출해 내고 면역친화성 칼럼을 사용해 정제하여 형광검출기가 장착된 고성능액체크로마토그래피(HPLC/FLD)를 이용해 분석하였다. 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂) 검량선의 직선성은 상관계수 0.999 이상을 나타냈고 회수율은 85.9~93.0%의 양호한 결과를 얻었으며 상대표준편차는 5.7% 이하였다. 액체 추출법과 비교해 볼 때, MSPD법-면역친화성 칼럼을 사용하여 회수율을 향상시켜 시험법을 확립하였다. 또한, 영유아용식품에 대한 아플라톡신 분석방법은 액체 추출법이 적합하였다. 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂)에 대한 회수율은 89.5~92.3%로 양호한 결과를 얻었으며, 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂)에 대한 정량한계는 0.019, 0.015, 0.053, 0.012 µg/kg 이었다.

참고문헌

1. IARC, International Agency for Reserch on Cancer, Lyon, Mycotoxins, 169-366(2002).
2. M. Martins, H. I. Tins and F. Bernardo, *Food Additives and Food Science*, **1**, 63-67(2001).
3. S. V. Reddy, K. D. Mayi, R. M. Uma, K. Thrumala-Devi and D. V. Reedy, *Food Additives and Contamination*, **18**, 55-558(2001).
4. T. Asao, G. Buchi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang, E. L. Wick and G. N. Wagan, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1760-1770(1963).
5. H. S. Hussein and M. B. Jeffery, *Toxicology*, **167**, 101-134(2001).
6. K. C. Sargeant, *Chemical Ind. London*, 53-55(1963).
7. Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York, 1-66(1981).
8. M. Holcomb, D. M. Wilson, M. W. Truckness and H. C. Thomason, *J. Chromatography*, **624**, 341-352(1992).
9. J. K Kim, *J. Food Hyg. Safety*, **13**, 41-46(1998).
10. 황준호, 전향숙, 이광근, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**(1), 1-16(2004).
11. M. P. Elizalde-Gonzalez, J. Mattusch and R. Wennrich, *J. Chromatography*. **828**, 439-444(1998).
12. P. B. Andri, S. Joerg and A. Elke, *J. AOAC International*, **85**(2), (2002).
13. A. Carisano and G. D. Torre, *J. Chromatography A*, **355**, 340-344(1986).
14. A. E. Waliking and D. Wilson, *J. AOAC International*, **89**(3), 678-692(2006).
15. D. M. Takahashi, *J. Chromatography A*, **131**, 147-156 (1977).
16. 식품공전 (2010).
17. C. Cavaliere, P. Foglia. C. Guarino, M. Nazzari, R. Samperi and A. Lagana, *Analytica Chimica Acta*, **596**, 141-148(2007).
18. J. Stroka and E. Anklam, *J. AOAC International*, **84**, 4 (2001).
19. J. Tam, M. Mankotia, M. Mably, P. Pantazopoulous, R. J. Neil, P. Calway and P. M. Scott, *Food Additives and Contamination*, **23**(7) 639-699(2006).
20. P. C. Alvito, E. A. Sizoo, C. M. Almeida and H. P. Egmond, *Food Anal. Methods*, **3**, 22-30(2010).