

HPLC에 의한 aflatoxin 分析法에 관한 研究; 螢光 및 紫外線 吸光 檢出의 比較

김종규 · 강희양 · 민경진
계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Determination of Aflatoxins Using High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence or UV Absorbance Detection

Jong-Gyu Kim, Hoe-Yang Kang and Kyung-Jin Min

Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University Taegu 704-701, Korea

ABSTRACT

A comparison was made of two detection methods(UV absorbance detection and fluorescence detection with pre-column derivatization with trifluoroacetic acid) coupled with HPLC for the simultaneous determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂. A good separation of the four aflatoxins was achieved on a reversed-phase C₁₈ column (30 cm×3.9 mm) with methanol-acetonitrile-water(20+20+60) for absorbance detection or acetonitrile-water(25+75) for fluorescence detection at the flow rate of 1.0 ml/min. The calibration graphs were linear over the ranges 100 ppb-1 ppm for B₁/G₁ and 30~300 ppb for B₂/G₂ with absorbance detection, and 1~500 ppb for B₁/G₁ and 0.3~150 ppb for B₂/G₂ with fluorescence detection. The correlation coefficients were greater than 0.94 and 0.99 for absorbance detection and for fluorescence detection, respectively. The detection limit was 100 ng for B₁/G₁, and 30 ng for B₂/G₂ with absorbance detection, and 1 ng for B₁/G₁ and 0.3 ng for B₂/G₂ with fluorescence detection. Recovery rates of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ added to yeast-extract sucrose broth medium were 66.6%, 59.4%, 67.5% and 59.2%, respectively, for absorbance detection and 82.9%, 71.5%, 80.0% and 69.3%, respectively, for fluorescence detection. The four aflatoxins in culture medium were quantitatively detected by the two methods. The aflatoxins in the rice sample were not detected the absorbance detection method, but were below 10 ppb using the fluorescence detection method. Analysis of aflatoxins by both the absorbance and fluorescence methods coupled with HPLC showed acceptable linearity and good recovery. The absorbance detection was less time-consuming and safer for treatment. The fluorescence detection was more selective and sensitive though elevated B₁ and G₁ contents were determined from the TFA-induced conversion of B₁ to B_{2a} and G₁ to G_{2a}.

Keywords : Aflatoxins, HPLC, Fluorescence detection, UV absorbance detection

I. 서 론

Aflatoxins는 *Aspergillus flavus* 및 *A. parasiticus* 등의 곰팡이가 생성하는 독소이다.^{1,6} 이는 실험동물에 암을 유발하는 강력한 발암물질이며⁷ 전세계적으로 옥수수, 땅콩 및 곡류 등의 다양한 농산물에 오염되어 있는 것으로 알려져 있다. 수종의 aflatoxins가 알려져 있으나 자연계의 시료에서 주로 발견되는 것들

은 B₁, B₂, G₁ 및 G₂ 등으로서 이들을 각종 시료에서 측정함에 있어 그 분리와 확인을 위한 다양한 기법이 시도되었다. 이들 aflatoxins 분석에 있어서 초기에는 주로 thin-layer chromatography(TLC)를 이용한 분석 방법이 적용되어 왔으며 이후 미니 컬럼(mini column)을 이용한 방법, 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography: HPLC) 및 기체크로마토그래피(gas chromatography), en-

zyme-linked immunosorbence assay(ELISA) 등을 이용한 분석이 시도되었다.¹⁸⁻¹⁹⁾ 특히 1970년대 후반부터 널리 이용되기 시작한 HPLC에 의한 aflatoxin 분석법은 고도의 기술을 요하며 추출과 정제 과정에 상당한 시간이 걸리기는 하나 다양한 형태의 시료에 성공적으로 적용될 수 있는 방법으로 평가되고 있다.²⁰⁻²¹⁾

HPLC에 의한 aflatoxin 분석에 있어서는 순상 및 역상의 컬럼이 사용 가능한 것으로 되어있으며 최근에는 역상의 컬럼이 선호되고 있다. 검출기에 있어서는 자외선 흡광 검출기 및 형광 검출기가 사용 가능하다. 특히 HPLC와 형광 검출기는 간섭 물질이 많은 시료에서 잔류 수준의 aflatoxins를 정량함에 있어서도 우수한 능력을 보여주었다. 형광 검출 시스템의 주요한 장점은 자외선 흡광 검출 시스템에서보다 민감도가 우수하며 선택성이 뛰어나다는 점이 잘 알려져 있다. HPLC에 의한 aflatoxins의 분석에 대해서는 최초로 Walter Pons 등^{22,23)}이 순상의 컬럼을 이용하여 자외선 흡광 검출을 시도하였으나 그 후에는 역상의 형광 검출능에 대한 연구가 집중적으로 되어 왔다. 그러나 형광에 의한 aflatoxin 분석에서는 시료 중에 가장 많이 존재하는 aflatoxin B₁ 및 G₁이 충분히 검출되지 않는 문제점이 있으며, 이를 해결하기 위하여 부가의 처리 과정을 거쳐야 하는 어려움이 있다. 즉, precolumn 또는 post-column derivatization을 거쳐야 하며 이는 시료 분석에 있어서의 난점을 더욱 심화시키고 분석 오차를 크게 하는 요인이 되고 있다. 따라서 자외선 흡광 검출이 가능한 농도 범위 내에서는 자외선 흡광 검출 시스템을 이용하여 시료를 분석하는 것이 보다 경제적이고 효율적일 것이며, 시료 중에 존재하는 aflatoxins를 보다 쉽게 검출할 수 있을 것이고 결국 aflatoxins에 관한 연구를 용이하게 하는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 네가지 주요 aflatoxins를 동시에 분석함에 있어서 형광 검출능과 자외선 흡광 검출(UV 검출)능을 비교하기 위하여, HPLC와 형광 및 자외선 흡광 검출 시스템을 이용하여 분리도와 정량 범위 및 회수율을 평가하였으며, 이를 aflatoxin 생성 균주인 *Aspergillus parasiticus*를 접종하여 배양한 배지 추출물과 쌀 시료중의 aflatoxins 분석에 적용하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 시약 및 기구

Aflatoxin 표준 물질은 Supelco Inc.(Bellefonte, U.S.A.) 제품이었으며, HPLC 분석을 위하여 HPLC 용 methanol과 acetonitrile(Merck, Germany)을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 이상이였다. 시료의 처리를 위하여 high speed vibrating sample mill(Heiko, TI 200, Japan)을 사용하였으며 aflatoxin 분석을 위하여 HPLC system(Waters, Milford, MA)을 이용하였다.

2. HPLC 분석 조건

HPLC system의 구성은 Waters사의 M510 펌프, Rheodyne injector, M746 integrater, 역상의 μ -Bondapak C₁₈ column(30 cm×3.9 mm), 그리고 M486 UV/Visible 흡광 검출기 또는 M474 형광 검출기로 구성하였다. UV 검출의 경우 365 nm에서 methanol-acetonitrile-water(20+20+60)의 이동상을, 형광 검출의 경우 여기 파장 365 nm, 방출 파장 425 nm에서 acetonitrile-water(25+75)의 이동상을 1.0 ml/min의 유속으로 흘려 aflatoxins의 분리를 시도하였다. 시료 추출물 및 표준물질의 주입량은 20 μ 였다.

3. 시료의 조제 및 aflatoxin 추출

본 실험에서 분석 대상이 된 시료는 쌀과 aflatoxin이 생산된 배지였다. 쌀은 국내산으로서 낱알을 구득하여 껍질을 제거한 후 도정한 도정미를 사용하였다. Aflatoxin 생산을 위하여 *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517을 사용하였으며, potato-dextrose agar(PDA; Difco Lab, Detroit, MI) 배지에서 계대 배양하여 포자 현탁액을 조제하였다. 이를 Krivobok등의 방법²⁴⁾에 따라 yeast-extract sucrose(YES) broth에 접종하여 28°C에서 7일동안 배양하였다.

시료 중의 aflatoxin 추출은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)²⁵⁾법을 변형하여 수행하였다. 쌀 시료의 경우에는 분쇄한 후 상기의 mill을 이용해서 충분히 마쇄하여 일정량을 취하였다. Aflatoxin을 생성시킨 배지의 경우 배양이 끝난 후 배지를 멸균하고 균체를 제거한 후 배양물을 일정량 취하였다. 쌀과 배지 시료에 NaCl 50 mg을 가한 후 시료와 동량의 methanol 및 chloroform을 가하였다. 이를 시험관 교반기로 충분히 교반하여 aflatoxin을 chloroform층으로 추출하였다. Chloroform층을 분취한 후 다시 동량의 chloroform을 가

하여 앞의 조작을 반복하고 24시간동안 정치시켰다. Chloroform층을 합하여 질소 gas하에서 증발시키고 그 잔류물을 HPLC 분석용 시료로 하였다.

4. 검량선 작성 및 회수율 시험

Aflatoxin 표준 물질 B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 혼합액을 각 농도별로 조제하고 이를 질소 gas하에서 증발시켰다. 표준물질의 혼합은 이제까지 자연계의 시료들에서 검출되었던 바를 고려하여 권장되고 있는 것과 같이 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 10:3:10:3의 비율로 하였다. UV 검출을 위해서는 증발건고물에 주입용매를 가하여 HPLC에 주입하였으며, 형광 검출을 위해서는 trifluoroacetic acid(TFA)를 가하여 유도체화 시킨 후 주입용매를 가하고 HPLC에 주입하여 분리도를 관찰하였다. Aflatoxin 표준물질의 농도별로 나타난 크로마토그램상의 peak area 값으로써 검량선을 작성하였으며, 이로부터 앞에서 조제된 시료의 chloroform 추출 잔류물에 대하여 aflatoxin의 함량을 정량하였다.

쌀과 YES 배지에 aflatoxin 표준물질 혼합액(B₁ 및 G₁ 500 µg/ml, B₂ 및 G₂ 150 µg/ml)을 정확히 첨가한 후 분석 방법에 따라 처리하여 각 aflatoxin의 양을 정량하였으며, 이로부터 회수율을 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분리도

시료 중의 aflatoxins를 효율적으로 정량하기 위하여 본 연구에서 시도한 HPLC와 UV 검출 및 형광 검출의 분석능을 비교하기 위한 항목으로서 우선적으로 분리도(resolution)를 관찰하였다. Aflatoxin 표준 물질 혼합액을 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램은 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

4종의 aflatoxins는 본 연구에서 설정된 두가지 분석 조건에서 모두 양호한 분리를 보였다. UV 검출에서는 G₂, G₁, B₂ 및 B₁의 순으로, 그리고 형광 검출에서는 G₁, B₁, G₂ 및 B₂의 순으로 나타났다. 총 분석 시간은 UV 검출에서는 10분이내였으며, 형광 검출에서는 약 25분이 소요되었다. 두가지 검출 조건에서 용리 순서가 달라졌음을 알 수 있으며 이에 대해서는 형광 검출시에는 TFA 처리 과정을 거쳤다는 점을 상기하여야 한다. Eaton 등²⁶⁾에 의하면 aflatoxin B₁과 G₁은 산 존재시에 이와 반응하여 B_{2a} 및 G_{2a}로 변환된다. 그러므로 aflatoxin B₁과 G₁ 자신의

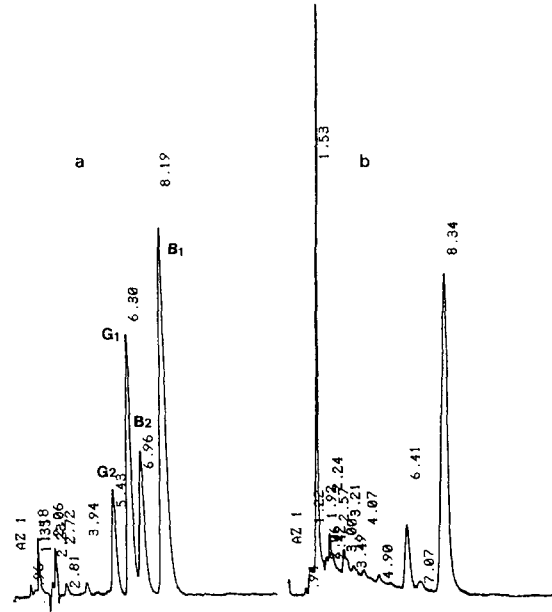


Fig. 1. Elution profile of aflatoxins using HPLC and UV absorbance detector. (a) standard (b) sample extract. Condition: Column; reversed phase C₁₈ column(30 cm×3.9 mm) at room temperature, mobile phase; methanol-acetonitrile-water(20+20+60), flow rate 1.0 ml, injection volume 20 µl, detection; UV at 365 nm.

검출능이 향상된 것이 아니라 분석에서 사용된 이동상 조건에서 형광성을 더욱 강하게 발하는 B_{2a}와 G_{2a}로 변환되어 검출되었다는 점을 잊지 말아야 할 것이다. 즉 Aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}는 본 실험에서 사용된 컬럼에서 분자 구조상 B₂나 G₂보다 먼저 용리될 수 있다는 것을 제시해 준다. 한편 B₂와 G₂는 UV 검출에 비하여 별다른 차이를 보이지 않았으며, 이는 곧 형광 검출에서의 유도체화 과정에 의하여 분자 구조에 영향받지 않음을 나타내는 것이다.

2. 재현성과 정량 범위

다음으로 두가지 검출 방법의 재현성을 비교하기 위하여 aflatoxin 표준물질 혼합액을 여러 농도(B₁과 G₁ 1 ppb~1 ppm, B₂와 G₂ 0.3 ppb~300 ppb)로 조제하고 각각을 HPLC에 주입하였으며, 반복 측정에서 얻은 수치의 재현성을 관찰한 결과는 Table 1, 2, 3 및 4와 같다.

Aflatoxin B₁과 G₁은 UV 검출에서는 100~1000 ppb까지 감응을 보였으며, 형광 검출에서는 1~

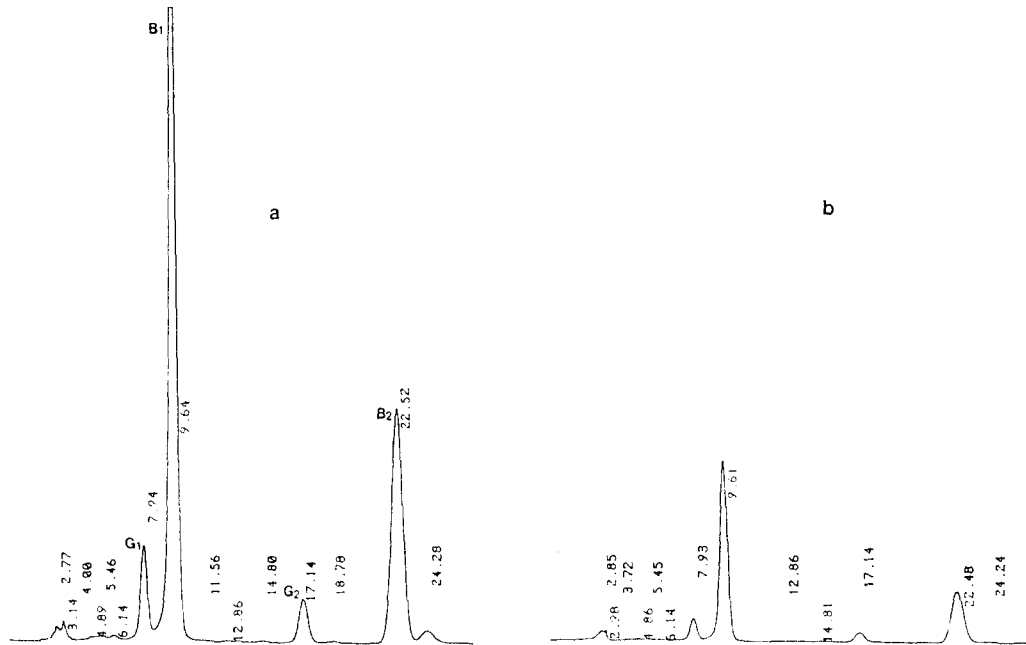


Fig. 2. Elution profile of aflatoxins using HPLC and fluorescence detector. (a)standard (b) sample extract. Condition: Column; reversed phase C₁₈ column(30 cm×3.9 mm) at room temperature, mobile phase; acetonitrile-water(25+75), flow rate 1.0 ml/min, injection volume 20 μl, detection; fluorescence at 365 nm excitation and 425 nm emission.

Table 1. Repeatability of detector response for aflatoxin B₁ determination

Concentration (ppb)	UV detection		Fluorescence detection	
	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾
1000	244244	1.35	29326313	0.96
500	121472	1.83	75908060	1.05
100	24034	1.84	17373615	1.86
10	NR		1897727	2.31
1	NR		191936	3.67

¹⁾Mean of six replications.

²⁾Coefficient of variation.

NR: no response.

1000 ppb까지 감응을 보였다. Aflatoxin B₂와 G₂는 UV 검출에서는 30~300 ppb에서, 그리고 형광 검출에서는 0.3~300 ppb까지 감응을 보였다. 즉 형광 검출은 UV 검출에 비하여 선택성이 100배 이상 향상되었음을 보여 주었다. 또 한가지 관찰된 결과는 본 연구에서 사용한 형광 검출시스템에서 검출기의 감응도가 고농도에서는 한계를 나타내었다는 점이다. 즉 Table 1~4에서 보는 바와 같이 aflatoxin B₁과 G₁의 경우 1000 ppb에서, B₂과 G₂의 경우 300 ppb에서 감응을 보이기는 하였으나 이보다 낮은 농도에 비

하여 더 이상의 증가된 감응을 나타내지 않았다. 실제로 이 때의 감응인자(response factor) 값들이 낮아졌음을 실험에서 관찰할 수 있었다. 이는 정량 범위를 결정하는 데 중요한 요인이 될 것이며, 다음의 검량선에서 확인될 것이다. 한편 각 농도에서 나타나는 감응도의 변이 계수(coefficient of variation; CV)값들은 aflatoxin B₁, B₂ 및 G₁의 경우 0.7~6.7%이내로 나타났으며, G₂의 경우 저농도에서 10%이상의 값을 보였으나 전반적으로 양호한 결과를 보였다. 위에서와 같이 반복 측정에서 얻은 크로마토그램상의

Table 2. Repeatability of detector responses for aflatoxin B₂ determination

Concentration (ppb)	UV detection		Fluorescence detection	
	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾
300	79010	0.91	23513131	0.78
150	39404	1.01	34458602	2.73
30	8505	1.39	7588479	0.73
3	NR		818413	2.80
0.3	NR		87369	3.13

¹⁾Mean of six replications.²⁾Coefficient of variation.

NR: no response.

Table 3. Repeatability of detector responses for aflatoxin G₁ determination

Concentration (ppb)	UV detection		Fluorescence detection	
	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾
1000	148372	1.22	3383999	1.13
500	89922	1.22	9167487	2.31
100	19149	4.42	1991607	3.15
10	NR		203830	0.97
1	NR		16877	6.67

¹⁾Mean of six replication.²⁾Coefficient of variation.

NR: no response.

Table 4. Repeatability of detector responses for aflatoxin G₂ determination

Concentration (ppb)	UV detection		Fluorescence detection	
	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾	Peak area ¹⁾	CV(%) ²⁾
300	40870	5.56	3063339	3.08
150	28186	5.56	4872461	1.67
30	4658	10.17	1065974	0.73
3	NR		115596	4.06
0.3	NR		12777	10.71

¹⁾Mean of six replicate trials²⁾Coefficient of variation

NR: no response.

peak 면적으로부터 검량선을 작성한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4에서 보는 바와 같다.

UV 검출에서는 aflatoxin B₁과 G₁은 100 ppb~1 ppm까지의 범위에서 직선성을 보였으며, B₂와 G₂는 30 ppb~300 ppb까지의 범위에서 각각 직선성을 보였다. 이때의 상관 계수(correlation coefficient)는 모두 0.946 이상이었다. 반면 형광 검출에서는 aflatoxin B₁과 G₁은 1~500 ppb까지의 범위에서, 그리고 B₂와 G₂는 0.3~150 ppb까지의 범위에서 직선성을 보였으며 0.999 이상의 상관계수를 보였다.

Aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 검출 하한치는 절대량으로 UV 검출에서는 각각 100 ng, 30 ng, 100 ng 및 30 ng이었으나 형광 검출에서는 각각 1 ng, 0.3 ng, 1 ng 및 0.3 ng으로 나타났으며 UV 검출기는 이 정도의 낮은 농도에 대해서는 검출이 불가능함을 나타내 주고 있다. 형광 검출은 UV 검출에 비하여 앞의 검출기 감응 정도에서도 나타났던 바와 같이 B₁과 G₁에 대한 민감도를 크게 향상시켰음을 나타내었다. 일반적으로 HPLC에 의한 각종 물질의 분석에서 형광 분석은 흡광 분석에 비하여 선택적이며 최대

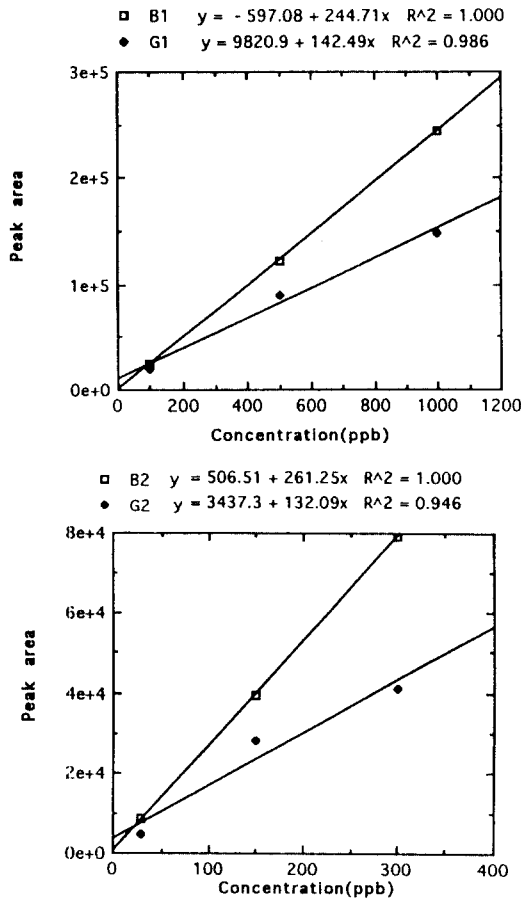


Fig. 3. Calibration graphs for aflatoxins using HPLC and UV absorbance detection. See Fig. 1 for analytical condition.

1000배까지 민감도를 향상시키는 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서 시도한 aflatoxin 분석 방법은 100배의 민감도 향상을 보였으며 여기서 aflatoxin 분석의 어려움을 다시 한번 나타내 주고 있다. 그러나 검출 한한치를 다른 분석방법들과 비교하여 보면 aflatoxin B₁의 경우 ELISA에서는 1 ng,²⁷⁾ 그리고 GC에서도 1 ng으로¹⁹⁾ 나타나고 있어 HPLC에 의한 방법이 결코 뒤떨어지지 않음을 알 수 있다.

식품과 사료 및 자연계에서 aflatoxin이 발견되는 경우에 주로 ppb 수준으로 검출되고 있으며 각 국가의 허용기준치도 대개 이 수준으로 유지하려는 경향이다. 우리나라의 경우 식품류에서 10 ppb, 사료 원료에서 50 ppb로 설정되어 있다. 그러나 한편 저장 곡류에서 *A. flavus*나 *A. parasiticus*의 오염으로 인하여 고농도로 aflatoxin이 발견되기도 하며, 또 이들

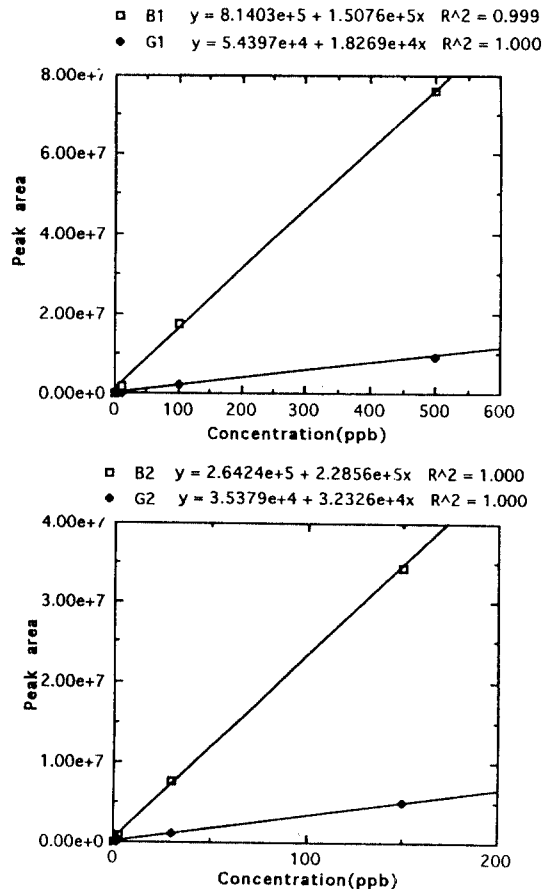


Fig. 4. Calibration graphs for aflatoxins using HPLC and fluorescence detection. See Fig. 2 for analytical condition.

곰팡이 균주들을 일정 조건에서 배양시킨 경우에는 ppm 수준의 aflatoxins가 발현되는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 따라서 시료중의 기대치 범위에 맞게 UV 검출, 또는 형광 검출을 시도하는 것이 바람직하다고 생각된다. 그런데 본 연구에서 시도된 바와 같이 TFA 등의 산처리를 거쳐야 하는 형광 분석법에서는 aflatoxin B₁과 G₁이 각각 B_{2a}와 G_{2a}로 변환되어 검출된다는 점이 해결되어야 할 과제로 남아 있다. 다음에 기술되는 회수율 시험과 시료 분석치에서 그 변환 정도를 알 수 있다.

3. 회수율과 시료 추출물중의 aflatoxin 분석 결과

두가지 검출 방법에 의한 회수율을 비교하기 위하여 네가지 aflatoxin 표준물질 (B₁과 G₁ 각각 500ppb, B₂와 G₂ 각각 150ppb)을 쌀과 YES 배지 시

Table 5. Recovery rates of aflatoxins in yeast-extract sucrose broth obtained with the two detection methods

Aflatoxin	Added (ppb)	UV detection			Fluorescence detection		
		Found(ppb) ¹⁾	CV(%) ²⁾	Recovery rates(%)	Found(ppb) ¹⁾	CV(%) ²⁾	Recovery rates(%)
B ₁	500	339.1±6.1	2.5	66.6	414.9±9.1	3.8	82.9
B ₁	150	89.1±1.2	1.9	59.4	107.2±17.5	28.3	71.5
G ₁	500	337.4±6.2	2.6	67.5	399.9±33.4	14.5	80.0
G ₂	150	88.9±7.3	11.7	59.2	103.9±15.3	14.7	69.3

¹⁾Mean±S.E. of six replications.²⁾CV: Coefficient of variation**Table 6.** Amount of aflatoxins in samples determined by the two detection methods¹⁾

Sample	UV detection				Fluorescence detection			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Rice(ppb)	ND	ND	ND	ND	8.8±0.3	0.6±0.1	2.1±0.3	0.4±0.1
Culture ²⁾ (ppm)	11.2±0.4	2.3±0.1	2.4±0.2	0.6±0.1	43.11±6.8	3.6±1.2	10.3±1.4	0.7±0.3

¹⁾Mean±S.E. of five replications.²⁾Aflatoxins were produced by *A. parasiticus* in yeast-extract sucrose broth.

ND: not detected.

료에 첨가한 후 앞과 같은 방법으로 전처리하여 UV 검출 및 형광 검출을 시도하였다. 그 결과는 Table 5와 6에서 보는 바와 같이 UV 검출에서는 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 회수율이 각각 66.6%, 59.4%, 67.5% 및 59.2%였으며 형광 검출에서는 각각 82.9%, 71.5%, 80.0% 및 69.3%였다. 형광 검출은 네가지 aflatoxin 모두 UV 검출에 비하여 회수율이 우수하였으나 CV 값에서 나타나 있는 바와 같이 분석치의 변이가 더 큰 것으로 나타났다. 옥수수 시료에 10~30 ng/g으로 aflatoxin을 첨가하고 LC에 의하여 분석하였을 때 aflatoxin 총량으로 본 회수율은 약 70%였다는 보고가 있으며²⁶⁾, Truckess 등¹⁷⁾은 옥수수과 땅콩 버터에 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 첨가하고 HPLC에 의하여 분석하였을 때 각각의 회수율이 네가지의 총량으로서 81~83%에 이르렀다고 보고하여 본 연구의 결과보다 우수하였다. 그의 연구 결과는 HPLC에 의한 aflatoxin 분석 결과중에서 매우 우수한 것으로 평가되고 있으나 그는 형광검출을 위한 유도체화 과정으로서 post-column derivatization system을 사용하였으며, 이러한 장치의 사용 없이 얻어진 본 연구의 결과는 비교적 좋은 자료라고 생각된다. Aflatoxin 분석을 ELISA에 의하여 시도하였을 때에는 일반적으로 CV값이 종종 20%에까지 달하는 것으로 알려져 있으며²⁷⁾ 또한 GC에 의한 분석에서는 네가지 aflatoxins에 대한 CV값이 3.2~6.0%로 보고

된 바 있다.¹⁹⁾ 그러나 GC 분석에서는 분리도가 본 연구의 결과보다 매우 불량했던 것으로 나타나 있다.

한편 쌀과 *A. parasiticus*를 접종하여 배양한 YES 배지에서 aflatoxin을 추출하여 UV 및 형광 검출기로 분석한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. 이들 시료 추출물도 역시 Fig. 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 양호한 분리도를 보였다. 배양액의 추출물에서는 UV 및 형광 검출시 모두 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂가 검출되었다. 두가지 검출조건에서 모두 ppm 수준으로 검출되었으며 형광 검출시 훨씬 높은 농도를 나타내었다. 그러나 쌀 추출물에서는 UV 검출시에는 aflatoxins가 전혀 검출되지 않았으며 형광 검출에서 측정된 수치는 모두 10 ppb이하로 나타나 앞의 정량 범위에서 제시된 바와 같이 UV 검출에서는 측정이 불가능한 농도 범위이므로 당연한 결과라고 생각된다.

생체내에서 일어나는 aflatoxin의 대사 기전 중 aflatoxin B_{2a}와 G_{2a} 대하여 몇가지 추론이 있다. 현재까지는 실험동물에서 경구적으로 섭취된 aflatoxin B₁ 및 G₁은 위에서 비효소적 산화를 거쳐 B_{2a} 및 G_{2a}로 변환된다는 추측과 또 microsomal oxidation에 의하여 이러한 변환이 일어날 수 있으며 이는 생리적 pH에 의하여 주로 영향받는 것으로 추측되고 있다.^{26,29)} Aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}는 바로 aflatoxin의 활성형이기 때문에 생체의 대사과정에 직접

관여하게 된다. 그러나 그 기전과 이 과정 중에 나타나는 여러 대사 산물들이 아직까지 완벽하게 밝혀지는 못하였으며, aflatoxin B₁이나 G₁을 섭취하였을 때 B_{2a} 및 G_{2a}로 변환되는 것에 대한 정량적 평가도 이루어지지 못하고 있다. 이에 관한 연구가 미진한 이유중의 하나는 시료 중에서 aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}에 대한 추출이 매우 어렵고 또 추출이 되었다 하더라도 이를 확인하고 정량하는 방법이 아직 확립되어 있지 못하기 때문이다.

앞에서도 지적된 바와 같이 본 연구의 결과는 바로 이러한 난제를 해결할 때까지 유용하게 활용될 수 있는 의미있는 자료가 될 수 있다. UV 검출에서 59.2~67.5%의 회수율을 보인 반면 형광 검출에서는 69.3~82.9%로 10%이상 향상된 회수율을 보였을 뿐만 아니라 배양물 시료의 분석에서도 aflatoxin B₁과 G₁은 3~4배의, 그리고 B₂와 G₂는 1~1.5배의 높은 농도를 보였다. B₁과 G₁에서 나타난 이러한 결과를 분석능의 향상이라고만 할 수는 없으며, 앞에서 언급된 바와 같이 aflatoxin B₁은 B_{2a}로, G₁은 G_{2a}로 변환되어 검출되었음을 상기하여야 할 것이다. 이 결과를 토대로 우선적으로 aflatoxin 분석 방법에 있어 aflatoxin B₁과 B_{2a}, 그리고 G₁과 G_{2a}의 양-반응 관계가 이루어지기를 기대한다.

IV. 요약 및 결론

HPLC에 의한 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 동시에 분석함에 있어서 자외선 흡광 검출(UV 검출)과 trifluoroacetic acid(TFA)에 의하여 pre-column derivatization을 거친 형광 검출(형광 검출)의 검출능을 비교하였다. 역상의 μ -Bondapak C₁₈ column(30 cm × 3.9 mm)을 상온에서 사용하였으며, UV 검출의 경우 365 nm에서 methanol-acetonitrile-water(20+20+60)의 이동상을, 형광 검출의 경우 여기 파장 365 nm, 방출 파장 425 nm에서 acetonitrile-water(25+75)의 이동상을 1.0 ml/min의 유속으로 흘러 4종의 aflatoxins의 분리를 시도한 결과 표준물질 및 시료 추출물에서 모두 양호한 분리도를 보였다. UV 검출에서는 aflatoxin B₁과 G₁은 100 ppb~1 ppm의 농도 범위에서, B₂와 G₂는 30~300 ppb에서 직선성($r=0.94$ 이상)을 보였으며 검출 하한치는 B₁과 G₁은 100 ng, B₂와 G₂는 30 ng이었다. 형광 검출에서는 UV 검출에서보다 감응도가 높았고 aflatoxin B₁과 G₁은 1~500 ppb의 농도 범위에서, B₂와 G₂는 0.3~

150 ppb에서 직선성($r=0.99$ 이상)을 보였으며 검출 하한치는 B₁과 G₁은 1 ng, B₂와 G₂는 0.3 ng이었다. Yeast-extract sucrose (YES) broth 배지에서 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 회수율은 UV 검출에서는 각각 66.6%, 59.4%, 67.5% 및 59.2%였으며, 형광 검출에서는 각각 82.9%, 71.5%, 80.0% 및 69.3%였다. 쌀 시료와 aflatoxin을 생성시킨 YES 배지 추출물을 분석한 결과 쌀에서는 UV 검출에서는 aflatoxin이 인지되지 않았으며 형광 검출에서는 4종의 aflatoxin이 10 ppb이하의 수준을 보였고, YES 배지 추출물에서는 두 검출 조건에서 모두 ppm 수준이면서 B₁과 G₁은 형광 검출시 UV 검출에 비하여 3~4배 높은 수치를 보였다.

결론적으로 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 동시에 분석할 때 UV 검출과 TFA에 의한 pre-column derivatization을 거친 형광 검출은 모두 양호한 방법으로 평가되었으며 시료중의 예측치에 따라 적절한 방법을 선택하여야 한다. UV 검출은 형광 검출에 비하여 시간이 적게 걸리며 전처리 과정이 적어 보다 안전하였다. 형광 검출은 UV 검출에 비하여 최저 검출 한계를 100배 향상시켰고 회수율을 10% 이상 증가시켰으며, 시료 분석에서 B₁과 G₁에 대하여 3~4배 높은 검출 수준을 보였다. 그러나 B₁과 G₁이 각각 B₂와 G₂로써 정량된다는 문제가 남아 있다.

참고문헌

- 1) Smith, J. E. and M. O. Moss: Mycotoxins, formation, analysis and significance. John Wiley & Sons, Chichester, 1985.
- 2) WHO: Mycotoxins, Environmental health criteria, 11. World Health Organization, Geneva, 1979.
- 3) 이용욱, 정영채, 신광순, 신효선: 최신 식품위생학, 개정중보, 신광출판사. 서울, 1989, pp 171-188.
- 4) Patterson, D. S. P. et al. : Aflatoxin and related compounds. In: Wyllie T. D. and L. G. Morehouse(eds), Mycotoxigenic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses; an encyclopaedic handbook. Marcel Dekker, New York, 1977, pp 131-233.
- 5) Concon, J. M.: Food toxicology, Part B. Marcel Dekker, New York, 1988, pp. 677-770.
- 6) Wilson, B. J. : Hazards of mycotoxins to public health. J. Food Prot. 41(5): 375-384(1978)
- 7) Wogan, G. N and P. M. Newberne: Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. Cancer Res. 27: 2370-

- 2376(1967)
- 8) Jones, B. D.: Methods of aflatoxin analysis. Tropical Products Institute, London, (1972)
 - 9) Eppley, R. M.: A versatile procedure for assay and preparatory separation of aflatoxins from peanut products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 49: 1218-1223(1966)
 - 10) Walkling, A. E., G. Bleffert and M. Kiernan: An improved rapid physio-chemical assay method for aflatoxin in peanuts and peanut products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45: 880-884(1968)
 - 11) Walkling, A. E.: Collaborative study of three methods for determination of aflatoxins in peanuts and peanut products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53:104-113(1970)
 - 12) Romer, T. R., N. Ghouri and T. M. Boling: Minicolumn screening methods for detecting aflatoxin: State of art. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:795-797(1977)
 - 13) Pons, W. A., Jr., L. S. Lee and L. Stoloff: Revised method for aflatoxins in cottonseed products, and comparison of thin layer and high performance liquid chromatography determinative step: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63(4): 899-905(1980)
 - 14) DeVries, J. W. and H. L. Chang: Comparison of rapid high pressure liquid chromatographic and CB methods for determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65(2): 206-209(1982)
 - 15) Campbell, A. D., O. J. Francis Jr., R. A. Beebe and L. Stoloff: Determination of aflatoxins in peanut butter, using two liquid chromatographic methods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 312-316(1984)
 - 16) Tosch, D., A. E. Walkling and J. F. Schlesier: Past and present research on aflatoxin in peanut products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(1): 8-9(1984)
 - 17) Trucksess, M.W. et al.: Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(1): 81-88(1991)
 - 18) Patey, A. C. et al.: Liquid chromatographic determination of aflatoxin levels in peanut butters using an immunoaffinity column clean-up methods: International collaborative trial. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(1): 76-81(1991)
 - 19) Goto, T., M. Matsui and T. Kitsuwa: Determination of aflatoxins by capillary column gas chromatography. *J. Chromatogr.* 447: 410-414(1988)
 - 20) 김종규: Aflatoxin 분석법에 관한 연구; 추출 및 정제 방법의 비교, *식품위생학회지* 8(4): 251-254(1993)
 - 21) Thean, J. E. et al.: Extraction, clean up and quantitative determination of aflatoxins in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63(3):631-633(1980)
 - 22) Pons, W. A., Jr.: Resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59(1): 101-105(1976)
 - 23) Pons, W. A., Jr. and A. O. Franz, Jr.: High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60(1): 89-94(1977)
 - 24) Krivobok, S., F. Seigle-Murand, R. Steiman and D. Marzin: Screening methods to detect toxigenic fungi in liquid media. *J. Microbiol. Methods* 7: 29-36(1987)
 - 25) Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis 15th ed. Arlington, Virginia, 1990, pp.1185-1205.
 - 26) Eaton, D. L., H. S. Ramsdell and G. E. Neal: Biotransformation of aflatoxins. In: Eaton D. L. and J. D. Groopman(eds), *The toxicology of aflatoxins, human health, veterinary and agricultural significance.* Academic Press, San Diego, 1994, pp. 51-52.
 - 27) 김종규, 이용욱: Aflatoxin B₁에 대한 항체 생산 및 ELISA법을 이용한 쌀의 aflatoxin B₁ 오염에 관한 연구. *국민보건연구소 연구논총* 2(1): 53-88(1992)
 - 28) Trucksess, M. W. and G. E. Wood: Recent methods of analysis for aflatoxins in foods and feeds. In: Eaton D. L. and J. D. Groopman(eds), *The toxicology of aflatoxins, human health, veterinary and agricultural significance.* Academic Press, San Diego, 1994, p. 415.
 - 29) Beebe, R. M.: Reverse phase high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61(6): 1347-1352(1978)