J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 2, pp. 142~149 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

면류에서 HPLC를 이용한 데옥시니발레놀 분석법의 검증과 불확도 산정

옥현이 · 장현주 · 강영운[1] · 김미혜[1] · 전향숙*
한국식품연구원 안전성연구단, [1]식품의약품안전평가원 오염물질팀

Single Laboratory Validation and Uncertainty Estimation of a HPLC Analysis Method for Deoxynivalenol in Noodles

Ok Hyun Ee, Hyun-Joo Chang, Young-Woon Kang[1], Meehye Kim[1], and Hyang Sook Chun*
Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute
[1]Food Contaminants Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
(Received March 5, 2011/Revised April 9, 2011/Accepted May 24, 2011)

ABSTRACT - An isocratic high performance liquid chromatography (HPLC) method for routine analysis of deoxynivalenol in noodles was validated and estimated the measurement uncertainty. Noodles (dried noodle and ramyeon) were analyzed by HPLC-ultraviolet detection using immunoaffinity column for clean-up. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 7.5 μg/kg and 18.8 μg/kg, respectively. The calibration curve showed a good linearity, with correlation coefficients r^2 of 0.9999 in the concentration range from 20 to 500 μg/kg. Recoveries and Repeatabilities expressed as coefficients of variation (CV) spiked with 200 and 500 μg/kg were 82 ± 2.7% and 87 ± 1.3% in dried noodle, and 97 ± 1.6% and 91 ± 12.0% in ramyeon, respectively. The uncertainty sources in measurement process were identified as sample weight, final volume, and sample concentration in extraction volume as well as components such as standard stock solution, working standard solution, 5 standard solutions, calibration curve, matrix, and instrument. Deoxynivalenol concentration and expanded uncertainty in two matrixes spiked with 200 μg/kg and 500 μg/kg were estimated to be 163.8 ± 52.1 and 435.2 ± 91.6 μg/kg for dried noodle, and 194.3 ± 33.0 and 453.2 ± 91.1 μg/kg for ramyeon using a coverage factor of two which gives a level of statistical confidence with approximately 95%. The most influential component among uncertainty sources was the recovery of matrix, followed by calibration curve.

Key words: Deoxynivalenol, Dried noodle, Ramyeon, HPLC, Uncertainty

서 론

데옥시니발레놀(deoxynivalenol, vomitoxin, (3α,7α)-3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one)은 epoxy-sesquiterpenoids인 type B 트리코테센류에 속하는 곰팡이독소이다. 데옥시니발레놀은 주로 밀, 보리 옥수수에 오염되며 귀리, 쌀, 호밀, 수수, 라이밀에서도 종종 발견된다. 데옥시니발레놀은 밀에서 붉은곰팡이병과 옥수수에서 이삭썩음병을 일으키는 원인 곰팡이인 *Fusarium graminearum*(Gibberella zeae)과 *F. culmorum*에 의해 주로 생산된다. 밀에서 *Fusarium* 곰팡이에 의한 붉은곰팡이병의 발생은 개화기(anthesis) 동안의 기온, 강우량 및 습도에 영향을 받으며, 미국, 유럽, 아시아와 같은 온대지역에서 주로 발생하는 것으로 알려져 있다. 데옥시니발레놀은 수용성이며 열에 비교적 안정하여(120~180°C) 대부분의 가공/조리과정을 거친 후에도 잔류하게 된다[1)]. 따라서 데옥시니발레놀은 원료 곡물뿐만 아니라 여러 가지 가공식품에서도 검출되며, 곰팡이독소 가운데 전 세계적으로 가장 빈번하게 발생되는 독소로 알려져 있다.

데옥시니발레놀은 국제암연구소(IARC)에 의해 Group 3 (인체에 대해 발암성이 있다고 분류할 수 없음)로 분류되어 있으나[2)], 데옥시니발레놀에 오염된 곡물을 사람과 동물이 섭취하게 되면 구토, 설사, 체중감소를 일으키고 면역계에 독성을 나타내는 등의 건강상 위해를 나타내는 것으로 보고되고 있다[1,2)]. FAO/WHO 합동 식품첨가물전문가위원회(JECFA: FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives)는 2001년에 데옥시니발레놀에 대한 위해평가를

*Correspondence to: Hyang Sook Chun, Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute, Sungnam-si, Gyeonggi-do, 463-746, Korea
Tel: +82-31-780-9273, Fax: +82-31-709-9876
E-mail: hschun@kfri.re.kr

실시하여 데옥시니발레놀의 잠정 일일최대섭취한계량(Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, PMTDI)을 단위 체중(kg) 당 1 μg으로 설정하였다[3]. 2011년에는 데옥시니발레놀의 아세틸화 유도체인 3-acetyl-deoxynivalenol이 체내에서 데옥시니발레놀로 전환되어 독성을 나타낼 수 있으므로 데옥시니발레놀과 아세틸화 유도체에 대해 단위 체중당 1 μg을 그룹 PMTDI로 설정하였다[4]. 데옥시니발레놀의 외국에서는 식품 중 데옥시니발레놀의 안전관리를 위하여 오염실태 조사가 활발하게 이루어지고 있을 뿐만 아니라[5] 일본을 포함한 37 개국에서는 300～2,000 μg/kg 수준으로 허용한계치를 설정하여 규제하고 있다[6]. 우리나라는 2010년 곡류 및 그 단순가공품, 옥수수 및 그 단순가공품과 시리얼에 대해 각각 1 mg/kg, 2 mg/kg과 0.5 mg/kg으로 규격을 설정하였고 시리얼을 제외한 가공식품에 대한 규격은 아직 설정하지 않은 실정이며 오염실태에 관한 연구도 소수에 불과한 실정이다[7-9]. 현재 유럽연합 등에서는 규제하고 있는 모든 곰팡이독소(아플라톡신, 데옥시니발레놀, 제랄레논, 오크라톡신, 파튤린, 푸모니신 및 T-2/HT-2 톡신)에 대하여 원재료뿐만 아니라 가공식품과 영유아식품에 대해 기준 규격을 다른 식품보다 엄격히 설정하여 관리하고 있다[10].

식품 중 데옥시니발레놀을 분석하는 공인방법에는 밀 중 함량을 측정하는 박층크로마토그래피법(AOAC official method 986.17)[11]과 기체크로마토그래피법(AOAC official method 986.18)[12]이 있고, 밀, 엿기름, 보리, 귀리, 옥수수에 대하여는 면역친화컬럼(IAC)을 이용한 액체크로마토그래피법(USDA-FGIS)[13]이 있다. 최근 유럽연합에서 곡류, 곡류가공품 및 곡류를 원료로 한 영유아식품에서 데옥시니발레놀을 분석하는 액체크로마토그래피법을 발표하였다(EN 15891:2010)[14]. 우리나라에서도 2010년에 데옥시니발레놀 분석법을 설정하였으나 적용범위는 곡류, 옥수수와 시리얼로 제한하였다. 이러한 공인분석법으로 식품 중 데옥시니발레놀을 분석할 경우에도 시료 기질(matrix), 시료 전처리 과정, 분석자 또는 분석기기의 오차로 인하여 결과의 차이가 발생하는 것은 불가피하다. 따라서 높은 정확도가 요구되는 측정일수록 측정 불확도가 표시되지 않으면 측정의 의미를 상실할 수밖에 없다고 할 수 있다. 1993년 국제표준화기구(ISO)에서 시험분석 및 교정결과의 품질에 대한 척도로서 측정 불확도 표현지침(GUM : Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)[15]이 제시되었고, 1995년에는 EURACHEM/CITAC 지침이 발간되어 측정 불확도에 대한 수학적, 통계적 이론 및 화학실험에 있어서의 예시가 제시되었다[16]. 2000년에는 유럽연합에 의해 설정된 허용한계치를 충족시키고 실험결과의 정량적인 평가를 위해 EURACHEM/CITAC 지침이 개정되었다[17].

본 연구에서는 식품공전법의 적용범위에 속하는 밀 중 데옥시니발레놀의 측정 불확도를 측정하여 발표한 전보[18]에 이어, 밀 가공품 중 일일섭취량이 높은 건면과 라면에서 데옥시니발레놀 측정에 영향을 끼치는 오차요인을 분석하여 이러한 요인을 감소시킨 분석법을 확립하고자 하였다. 즉, 시료를 면역친화컬럼으로 정제한 다음 HPLC-자외선검출기로 검출하는 분석법을 검증하고 분석의 각 단계마다 실험오차에 영향을 미치는 요인들을 도출한 후, 관계식을 설정한 다음 요인별 측정값으로부터 표준불확도, 합성불확도 및 확장불확도를 산정하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

데옥시니발레놀의 표준품은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, acetonitrile, methanol, *n*-hexane및 water는 Burdick & Jackson(Muskegon, MI, USA)사에서 구입하였다. Immunoaffinity column DONtest WB와 유리섬유여과지 GF/B는 각각 VICAM사(Watertown, MA, USA)와 Whatman사(Maidstone, UK)에서 구입하였다.

시료전처리

건면 중 데옥시니발레놀의 분석은 식품공전법에 준하여 실시하였고, 라면은 다소 변경하여 실시하였다[7]. 즉, 구입한 건면과 라면 시료 2~2.5 kg을 잘 혼합한 다음 시료 1 kg을 취하여 표준체 No. 20에 60~0%가 통과할 정도로 분쇄하였다. 비이커에 분쇄된 시료 20 ± 0.002 g을 취한 다음 증류수 100 ± 2 mL을 붓고 고속균질기(Ultra-Turrex, IKA, Staufen, Germany)로 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 원심분리(5,000 × *g*, 15분)하고 상등액을 취하여 유리섬유여과지로 여과한 것을 추출액으로 하였다. 단, 라면은 노르말 헥산으로 지방을 제거한 후 acetonitrile:methanol:distilled water(25:25:50, v/v/v) 혼액을 추출용매로 사용하여 추출하였다. 추출액 2 mL을 immunoaffinity column에 넣고 초당 한 방울의 속도로 유출시킨 다음 증류수 5 mL로 컬럼을 세척하고 컬럼 내에 남아있는 용액을 주사기로 공기 10 mL을 주입하여 제거하였다. 그런 다음, 3 mL acetonitrile로 데옥시니발레놀을 천천히 용출시키고 감압농축기로 건고시켰다. 잔류물은 이동상 1 mL에 녹인 후 0.22 μm PVDF syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

HPLC 분석조건

HPLC는 JASCO HPLC system을 이용하였다. 컬럼은 C18 reverse phase Synergi Hydro RP (250 mm × 4.6 mm, 4 μm)를 이용하였고 오븐온도는 40ºC로 설정하였다. 이동상은 acetonitrile/water 17/83(v/v) 혼합액이였고 유속은 1 mL/min, 검출기는 JASCO UV-975 detector를 이용하여 220 nm 파장에서 분석하였다.

회수율 실험

보관표준용액 200 μg/mL을 건면과 라면 20 g에 20 μL, 50 μL를 첨가하여 데옥시니발레놀 오염농도가 각각 200 μg/kg과 500 μg/kg이 되도록 처리하여 6회 반복 측정하였다.

모델 관계식 설정

검량선을 작성하여 시료 중의 데옥시니발레놀 함량을 구하기 위한 식은 (1)과 같이 설정하였다.

$$C_s = C_e \times \frac{V_f}{W_s} \times \frac{V_1}{V_2} \quad (1)$$

$$W_s = W_c \times W_{Rp} \times W_{Rs} \quad (2)$$

$$C_e = P_{ReA} \times F_{ReA} \times STD \times Lc \times I_R \times R_M \quad (3)$$

C_s : Concentration of sample (μg/kg)
C_e : Concentration of sample in extraction solution (ng/mL)
V_f : Final volume of sample (mL)
W_s: Weight of sample (g)
W_{Rs}: Resolution of weight of sample
W_{Rp}: Repeatability of sample weight
W_c: Calibration of sample weight
P_{ReA}: Purity of deoxynivalenol
F_{ReA}: Formula weight of deoxynivalenol
STD: Standard stock solution
$STD_{20,100,200,500,1000}$: Standard 20 ng/mL solution, 100 ng/mL solution, 200 ng/mL solution, 500 ng/mL solution, 1000 ng/mL solution
Lc : Linearity of calibration curve
I_R : Reproducibility of instrument
R_M : Recovery of matrix

요인별 측정값과 표준불확도

여러 번 측정하여 구한 평균값을 해당 요인의 측정값으로 사용할 경우, 평균값의 표준편차를 식 (4)를 적용하여 A type 표준불확도로 구하였다. 저울과 플라스크, 피펫 등의 교정시험검사결과를 사용하는 경우나 반복 측정하지 않은 경우는 B type 표준불확도로 평가하였고, 반복시험에 대한 불확도는 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (5)과 (6)을 적용하여 A type 불확도를 구하였다.

$$u(x_i) = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

$$u(x_i) = \frac{S_p}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

$$S_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{M} v_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{M} v_i}} \quad (6)$$

합성표준불확도

측정결과가 여러 개의 다른 입력량으로부터 구해질 때 이 측정결과의 표준불확도를 합성표준불확도라고 하며, 합성은 불확도 전파의 법칙(law of propagation of uncertainty)(7)을 이용하여 구하였다.

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) \quad (7)$$

확장불확도

확장불확도는 포함인자 k와 계산된 합성표준불확도를 곱하여 식 (8)을 이용하여 구하였다. 이 때, 포함인자 k의 값은 EURACHEM/CITAC 지침[17]에 따라 95% 신뢰수준에서 포함인자 k값을 2로 기준하여 확장불확도를 계산하였다.

$$U(y) = k u_c(y) \quad (8)$$

결과 및 고찰

분석법 검증

시료에서 데옥시니발레놀 측정을 위한 기기상 검출한계와 정량한계 값을 신호대 잡음비로 분석한 결과 각각 7.5 μg/kg과 18.8 μg/kg이었고, Kaiser법으로 계산한 결과는 각각 9.6 μg/kg과 17.4 μg/kg이었다. 20 ng/mL에서 1000 ng/mL농도 범위로 5농도의 표준물질로 검량선을 작성한 결과 기울기는 19.2227이었고 y 절편은 −3.1010이었으며 상관계수 값(r^2)은 0.9999이었다(Table 1). 데옥시니발레놀을

Table 1. Limits of detection and quantification and regression curve data

Parameter	Signal to noise ratio method	Kaiser equation method
Detection limit (μg/kg)	7.5[1)]	9.6 (k = 3)
Quantification limit (μg/kg)	18.8[2)]	17.4 (k = 6)
Regression curve	y = 19.2227 × −3.1010	
Correlation coefficient (r^2)	0.9999	

[1)]Signal-to-noise ratio of 3
[2)]Signal-to-noise ratio of 10

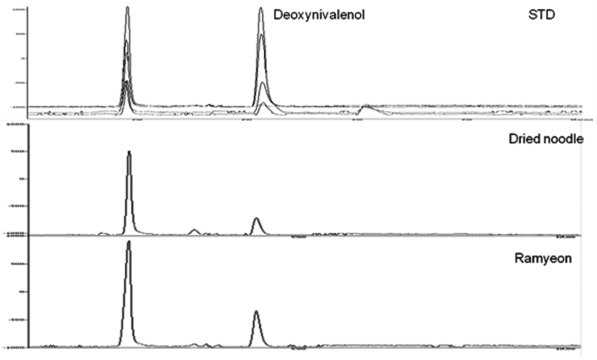

Fig. 1. Chromatogram of standard and samples spiked with 500 μg/kg for deoxynivalenol.

Table 2. Recoveries of deoxynivalenol in dried noodle and ramyeon

Parameter	Dried noodle		Ramyeon	
	200	500	200	500
Raw data (μg/kg)	159.19	434.14	192.32	429.11
	164.49	430.52	190.07	435.79
	164.17	445.64	198.58	426.74
	171.86	431.30	195.34	433.77
	160.03	431.04	192.71	564.07
	163.26	438.67	196.62	429.30
Statistics				
Mean (μg/kg)	163.83	435.22	194.27	453.17
RSD[1)] (%)	2.7	1.3	1.6	12.0
Recovery (%)	82	87	97	91

[1)] Relative standard deviation

자외선검출기로 분석한 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

건면과 라면에 표준물질을 200 μg/kg과 500 μg/kg으로 첨가하여 회수율을 6회 반복 측정한 결과는 Table 2과 같다. 건면에 200 μg/kg과 500 μg/kg을 첨가하여 얻은 회수율은 82%와 87%였고 평균값의 상대표준편차 값은 2.7%와 1.3%였다. 라면에 200 μg/kg과 500 μg/kg을 첨가하여 얻은 회수율은 97%와 91%였고 평균값의 상대표준편차 값은 1.6%와 12.0%였다. 유럽연합에서는 데옥시니발레놀 분석법의 상대표준편차 허용기준 (RSD_r)과 회수율을 100 μg/kg < 또는 ≤ 500 μg/kg에서는 20% 이하와 60~110% 수준으로, > 500 μg/kg에서는 20% 미만으로 70 - 120% 수준으로 설정하였다[10]. 본 연구에서는 기질에 따라 식품공전법을 다소 변형시켜 실시하였고 그 결과 회수율과 상대표준편차 값이 모두 만족할 만한 결과를 얻었다.

시료의 무게 측정시 불확도

데옥시니발레놀의 농도 값에는 시료 무게를 측정하는 과정에서 발생하는 불확도 요인이 포함되어 있다. 시료의 측정 과정에서 발생하는 불확도는 저울 자체의 불확도와 반복 측정에서 오는 불확도로 나눌 수 있다. 저울 자체의 불확도는 교정성적서 상의 불확도, 저울의 안정성과 분해능 등의 불확도 요인이 고려되었다(Table 3). 교정성적서 상의 불확도는 95% 신뢰수준(k = 2)에서 0.00027 g이었으므로 표준불확도($U_{certificate}$, ($u(Wc)$)는 0.000135 g가 된다. 무게를 반복 측정할 때 발생하는 불확도는 시료의 무게에 해당하는 20 g의 분동을 저울로 5일에 걸쳐 5회 반복 측정하여 얻은 값을 식 (5)와 (6)을 적용하여 얻었으며 표준불확도($U_{repeatability}$, ($u(W_{Rp})$) 0.000110 g을 구하였다. 또한, 저울의 분해능은 0.001 g이었으며 분해능에 대한 표준불확도($U_{resolution}$, ($u(W_{Rs})$)는 0.000289 g이었다. 저울의 합성표준불확도($u(W_s)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱근의 제곱근으로 0.000497 g이며, 상대표준불확도($u(W_s)/W_s$)는 0.000017 g이었다.

표준품 순도와 분자량의 불확도

보관표준용액 조제과정의 불확도는 표준품의 순도, 분자량, 용액제조에 사용되는 피펫의 요인이 포함된다. 표준품의 순도(U_{purity})에 대한 불확도를 산출하기 위해 제품의 규격에서 데옥시니발레놀은 순도에 대한 언급이 되어있지 않으므로 표준불확도($u(P_{Rep})$)와 상대합성표준불확도($u(P_{Rep})/P_{Rep}$)는 0이다. 한편, 표준품의 분자량은 296.3이었고 분자

Table 3. Uncertainty budget for the concentration determination of two matrices spiked with 200 μg/kg

Factors	Description	Uncertainty	
		Dried noodle	Ramyeon
Weight of sample	U_r weight = $\sqrt{(U \text{ calibration}^2 + U \text{ resolution}^2 + U \text{ repeatability}^2)}$ / sample weight	0.000017	0.000017
Final volume (1 mL)	$U_r = U_c$ pipette 1 mL / value (=1 mL)	0.004000	0.004000
Stock solution (200 μg/mL)	U_r stock solution = $\sqrt{(U_r \text{ purity}^2 + U_r \text{ weight}^2 + U_r \text{ pipet}^2)}$	0.000644	0.000644
Working solution (10 μg/mL)	U_r 10 μg/mL = $\sqrt{(U_r \text{ stock}^2 + U_r \text{ 0.2 mL}^2 + U_r \text{ 3.8 mL}^2)}$	0.020026	0.020026
STD 1 1 μg/mL	U_r 1 μg/mL = $\sqrt{(U_r \text{ 10 μg/mL}^2 + U_r \text{ 0.4 mL}^2 + U_r \text{ 3.6 mL}^2)}$	0.022399	0.022399
STD 2 0.5 μg/mL	U_r 0.5 μg/mL = $\sqrt{(U_r \text{ 1 μg/mL}^2 + U_r \text{ 2 mL}^2 + U_r \text{ 2 mL}^2)}$	0.022499	0.022499
STD 3 0.2 μg/mL	U_r 0.2 μg/mL = $\sqrt{(U_r \text{ 0.5 μg/mL}^2 + U_r \text{ 1.6 mL}^2 + U_r \text{ 2.4 mL}^2)}$	0.022612	0.022612
STD 4 0.1 μg/mL	U_r 0.1 μg/mL = $\sqrt{(U_r \text{ 0.2 μg/mL}^2 + U_r \text{ 1.6 mL}^2 + U_r \text{ 2.4 mL}^2)}$	0.022711	0.022711
STD 5 0.02 μg/mL	U_r 0.02 μg/mL = $\sqrt{(U_r \text{ 0.1 μg/mL}^2 + U_r \text{ 0.8 mL}^2 + U_r \text{ 3.2 mL}^2)}$	0.023274	0.023274
Calibration curve	$U_r = U_c$ / sample value U_c was involved with slope, intercept, number of measurend, absorbance of standard, concentration of standard, and mean error of standard concentration	0.076598	0.062375
Repeatability of matrix	U_r RM = $\sqrt{(U_r \text{ repeatability}^2 + U_r \text{ recovery}^2)}$	0.128192	0.018320
Instrument	$U_{r \text{ reproducibility}} = \sqrt{(SD/\sqrt{6})^2}$	0.000004	0.000004

구조식은 $C_{15}H_{20}O_6$이다. IUPAC에서 발표된 C, H, O원자 1개의 불확도는 ± 0.008, ± 0.00007, ± 0.0003[12]이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 √3으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.00004 g/mol, 0.00017 g/mol이었으며, 여기에 원자개수를 각각 곱하면 0.069282, 0.000808, 0.001039 g/mol였다. 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{ReP})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.069295이었고 상대합성표준불확도($u(F_{ReP})/ F_{ReP}$)는 0.000234 g/mol이었다.

표준용액 제조과정의 불확도

보관표준용액(STD)은 표준물질 1 mg에 acetonitrile 5 mL을 넣어 200 μg/mL 용액으로 제조하였다. 이 과정에 포함되는 각 마이크로피펫(5 mL)의 교정성적서 상의 불확도와 각 부피의 반복 측정시 불확도, 표준품의 분자량 불확도를 고려하여 보관표준용액의 불확도를 산출하였다(Table 3). 5 mL 마이크로피펫의 교정성적서 불확도는 0.006 mL이었고 표준불확도는 포함인자 k = 2(95% 신뢰수준)로 나누면 0.003 mL, 상대표준불확도는 0.0006 mL이었다. 피펫의 상대표준불확도, 표준품의 분자량 불확도와 무게 측정시 불확도의 제곱합의 제곱근인 보관표준용액의 합성상대표준불확도는 0.0006이었다.

STD_W는 보관표준용액 0.2 mL을 취하고 acetonitrile 3.8 mL로 희석하여 조제하였다. STD_W의 불확도 요인은 보관표준용액의 불확도와 0.2 mL과 3.8 mL 마이크로피펫에 대한 불확도를 고려해야 한다. 보관표준용액의 합성상대표준불확도는 0.000644이었고, 0.2 mL과 1 mL 마이크로피펫의 교정성적서 상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.008 mL와 0.006 mL이므로 표준불확도는 0.004 mL과 0.003 mL이고 상대표준불확도도 0.02 mL과 0.000789 mL이었다. 그러므로 STD_W의 합성상대표준불확도는 보관표준용액의 불확도 0.02, 0.2 mL과 3.8 mL 피펫의 불확도 0.02, 0.000789의 제곱합의 제곱근인 0.020015이었다.

STD_{1000} 용액의 불확도는 STD_W의 불확도와 0.4 mL과 3.6 mL의 마이크로피펫의 불확도를 고려하여 구하였다. 0.4 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.004 mL이었고 상대표준불확도는 0.01 mL이었다. 한편, 3.6 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.003 mL이었고 상대표준불확도는 0.000833 mL이었다. 그러므로 STD_{1000}의 합성상대표준불확도는 STD_W의 불확도인 0.020015와 0.01, 0.000833의 제곱합의 제곱근인 0.022399이었다.

STD_{500} 용액의 불확도는 STD_{1000} 용액의 불확도와 1 mL 마이크로피펫의 2회 사용에 대한 불확도를 고려하여 구하였다. STD_{1000}의 불확도는 0.022399이었고 1 mL 마이크로피펫의 불확도는 STD_W에서 언급했듯이 표준불확도와 상대표준불확도가 각각 0.003 mL이었다. 그러므로 STD_{500}의 불확도는 0.022399, 0.0015, 0.0015의 제곱합의 제곱근으로 0.022499이었다.

STD_{200} 용액의 불확도는 STD_{500} 용액의 불확도와 1.6 mL과 2.4 mL의 마이크로피펫의 불확도를 고려하여 산출하였다. 1.6 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.003 mL이었고 상대표준불확도는 0.001875 mL이었다. 2.4 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.003 mL이었고 상대표준불확도는 0.00125 mL이었다. 그러므로 STD_{200}의 합성상대표준불확도는 STD_{500}의 불확도인 0.022499와 0.001875, 0.00125의 제곱합의 제곱근인 0.022612이었다.

STD_{100}는 STD_{200}용액을 2 mL 취하여 acetonitrile 2 mL로 희석하여 조제하였고 STD_{100} 용액의 불확도는 STD_{200}의 불확도와 2 mL 마이크로피펫의 2회 사용에 대한 불확도를 고려하였다. 2 mL 마이크로피펫의 합성표준불확도는 0.003 mL이었고 상대표준불확도는 0.0015이었다. STD_{100}용액의 불확도는 2 mL 마이크로피펫의 불확도인 0.0015의 제곱값, STD_{200}용액 불확도인 0.022612의 제곱값을 합하여 제곱근을 구한 값인 0.022711이었다.

STD_{20}용액은 용액의 불확도는 STD_{100} 용액의 불확도와 0.8 mL과 3.2 mL의 마이크로피펫의 불확도를 고려하여 구하였다. 0.8 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.004 mL이었고 상대표준불확도는 0.005 mL이었다. 3.2 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.003 mL이었고 상대표준불확도는 0.000937 mL이었다. 그러므로 STD_{20}의 합성상대표준불확도는 STD_{100}의 불확도인 0.022711와 0.005, 0.000937의 제곱합의 제곱근인 0.023274이었다.

기기 측정시 불확도

HPLC를 이용하여 시료를 6회 반복 분석한 결과 평균값은 3137.92이었고 상대표준편차는 0.033381였다. A type의 표준오차로 산출된 표준불확도는 표준편차를 √6으로 나눈 값 0.013628이었고, 상대표준불확도는 표준불확도를 평균면적값으로 나눈 4.343014×10^{-6}이었다.

검량선 작성의 불확도

검량선의 비직선성은 측정 결과값의 주요한 불확도 요인이 된다. 일반적으로, 최소 5개 농도에서 3회 이상 반복 측정한 결과의 평균값을 이용하여 선형 최소제곱법으로 계산한다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은 다음과 같다.

$$A_j = B_0 + B_1 \times C_j \quad (9)$$

1차 회귀식에서 C_j는 분석시료의 계산값이고 A_j는 면적값, 절편인 B_0는 계산된 공시험값, 기울기 B_1은 회귀상수로써 분석법의 민감도를 의미한다.

검량선은 20, 100, 200, 500, 1000 ng/mL의 표준용액을 각각 6회씩 반복 측정하여 작성하였다. 그 결과 상관계수(r^2)는 0.9999, 기울기(B_1)는 19.2227, y 절편(B_0)은 −3.1010이었다. 국수와 라면의 공시료에 200 μg/kg과 500 μg/kg을

첨가하여 분석한 후 작성된 검량선에 적용하여 얻은 농도는 국수인 경우 163.8 μg/kg과 435.2 μg/kg, 라면인 경우 194.3 μg/kg과 453.2 μg/kg이었다. 선형 최소제곱법으로 작성한 검량선에 의한 불확도는 다음과 같이 식 (10)~(12)를 이용하여 계산하면 농도 별 표준불확도는 건면에서 12.546730 ng/g과 11.160260 ng/g, 라면에서 12.117614 ng/g과 11. 280200 ng/g이었다. 농도 별 상대표준불확도는 건면에서 0.076598 ng/g과 0.025642 ng/g, 라면에서 0.062375 ng/g과 0.024895 ng/g이었다.

$$u(C_0) = \frac{s}{B_1}\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{n}+\frac{(C_0-C)^s}{s_{xx}}} \quad (10)$$

$$s = \frac{\sum_{j=1}^{n}[A_j-(B_0+B_1C_j)]^2}{n-2} \quad (11)$$

$$s_{xx} = \sum_{j=1}^{n}[C_j-\overline{C}]^2 \quad (12)$$

p : Number of measurement to determine

n : Number of measurements for the calibration

C_o : Concentration of deoxynivalenol in the extraction solution

$\overline{C}$: Mean value of the different calibration standards

$_i$: Index for the number of calibration standard

$_j$: Index for the number of measurements to obtain the calibration curve

최종 시험용액 부피의 불확도

최종 시험용액 1 mL은 1 mL 마이크로피펫을 이용하였으므로 1 mL 마이크로피펫의 교정성적서 상의 불확도(95% 신뢰수준)가 0.008이었고 표준불확도는 0.004 mL이었으며 상대표준불확도는 value(1 mL)로 나누어 얻은 값인 0.004이었다.

시료의 측정시 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복 측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구하였다.

건면의 공시료에 200 μg/kg을 첨가한 실험을 6회 반복 측정한 결과값은 163.8 μg/kg이었고 공시료에 첨가한 양에서 결과값의 평균을 뺀 값(36.17)을 √3으로 나누어 얻은 회수율에 대한 표준불확도는 20.881781이었고 상대표준불확도는 0.127458이었다. 6회 반복 측정하여 얻은 회수율 값은 0.8192이고 상대표준편차를 √6으로 나누어 반복 측정의 불확도 0.011213를 구하였고 상대표준불확도는 0.013688였다. 이 두 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근인 합성상대표준불확도는 0.128191이었다. 국수의 공시료에 500 μg/kg을 첨가한 실험을 6회 반복 측정한 결과값은 435.2 μg/kg이었고 공시료에 첨가한 양에서 결과값의 평균을 뺀 값(64.78)을 √3으로 나누어 얻은 회수율에 대한 표준불확도는 37.401286이었고 상대표준불확도는 0.085936이었다. 6회 반복 측정하여 얻은 회수율 값은 0.8704이고 상대표준편차를 √6으로 나누어 반복 측정의 불확도 0.005575를 구하였고 상대표준불확도는 0.006404였다. 이 두 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근인 합성상대표준불확도는 0.086175이었다.

라면의 공시료에 200 μg/kg을 첨가한 실험을 6회 반복 측정한 결과값은 194.27 μg/kg이었고 공시료에 첨가한 양에서 결과값의 평균을 뺀 값(5.73)을 √3으로 나누어 얻은 회수율에 대한 표준불확도는 3.306814이었고 상대표준불확도는 0.017021이었다. 6회 반복 측정하여 얻은 회수율 값은 0.9714이었고 상대표준편차를 √6으로 나누어 반복 측정의 불확도 0.006583를 구하였고 상대표준불확도는 0.017021였다. 이 두 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근인 합성상대표준불확도는 0.018320이었다. 라면의 공시료에 500 μg/kg을 첨가한 실험을 6회 반복 측정한 결과값은 453.17 μg/kg이었고 공시료에 첨가한 양에서 결과값의 평균을 뺀 값(46.83)을 √3으로 나누어 얻은 회수율에 대한 표준불확도는 27.037313이었고 상대표준불확도는 0.059662이었다. 6회 반복 측정하여 얻은 회수율 값은 0.9063이고 상대표준편차를 √6으로 나누어 반복 측정의 불확도 0.049034를 구하였고 상대표준불확도는 0.054101였다. 이 두 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근인 합성상대표준불확도는 0.080539이었다.

Table 4. Values and uncertainties for deoxynivalenol analysis by HPLC

Parameter	Dried noodle		Ramyeon	
	200	500	200	500
Concentration (μg/kg)	163.8	435.2	194.3	453.2
Combined uncertainty	26.1	45.8	16.5	45.5
Relative standard uncertainty	0.16	0.11	0.08	0.10
Expanded uncertainty (k = 2, 95% confidence level)	52.1	91.6	33.0	91.1
Uncertainty / Result (%)[1)]	31.8	21.0	17.0	20.1

[1)]EU recommended that the acceptable value of uncertainty in the concentration of 1 mg/kg and < 100 μg/kg were 32% and 44%, respectively[18)].

합성표준불확도

건면과 라면에서 각 요인들의 합성상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 산출하여 구한 결과값은 Table 4와 같다. 즉, 시료량(W_s) 0.000017, 최종부피(V_f) 0.004, 보관표준용액(STD) 0.000644, 표준용액(STD_W) 0.020026, STD_{1000} 0.022399, STD_{500} 0.022499, STD_{200} 0.022612, STD_{100} 0.022711, STD_{20} 0.023274, 기기(I) 0.000004, 그리고 건면과 라면에서 농도 별 검량선(L_c)과 매질(R_m)의 제곱합의 제곱근으로 합성상대표준불확도를 시험결과값에 곱하여 합성표준불확도($u(C_s)$)를 구한 결과, 건면에서는 26.14과 45.8 μg/kg이었고 라면은 16.5와 45.5 μg/kg이었다.

확장불확도

합성표준불확도에 포함인자 k = 2값을 곱하여 확장불확도를 계산한 결과 건면에 200 μg/kg과 500 μg/kg을 첨가한 확장불확도는 52.1과 91.6 μg/kg으로 산정되었고 라면의 확장불확도는 각각 33.0과 91.1 μg/kg이었다. 유럽연합에서는 화학적 분석에 있어서 공동연구 결과를 이용할 경우 실험결과의 확장불확도는 Horwitz equation이나 modified Horwitz predicted σR value을 토대로 결과값을 수용하도록 하는 기준을 제시하였다[19]. 본 연구에서의 확장불확도를 결과값으로 나눈 값은 17~32%범위로 1 mg/kg이하 농도(확장불확도 32%)에서 수용 가능한 값의 범위에 포함됨을 알 수 있었다.

불확도인자의 상대기여도

각 요인이 전체 불확도에 끼치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. 포함된 불확도인자의 상대불확도가 최종 시험결과값에 미치는 영향을 살펴보면 가장 큰 영향을 끼치는 요인으로 매질의 반복측정임을 알 수 있었고 그 다음으로 검량선 작성, 표준물질의 제조순이었다. 검량선 작성의 불확도는 매질에 상관없이 농도가 낮을수록 높아지는 경향을 보였다. 매질에 의한 불확도는 회수율의 재현성 불확도와 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구한 것으로 건면에서는 낮은 농도에서 다소 높아지는 결과를 얻었고 라면은 상반되는 경향을 보였다. 분석법의 확립에 있어 매질에 따른 회수율 및 재현성을 높이기 위해 노력해야 할 것으로 생각된다.

시험결과의 소급성

시험결과의 소급성 유지를 위해 표준인증표준물질(CRM)인 BCR 379 (밀, 673 ± 20 μg/kg)을 이용하여 같은 방법으로 분석한 결과 683.1 μg/kg이었다.

요 약

본 연구에서는 면류에서 면역친화컬럼을 이용한 데옥시니발레놀의 HPLC분석법을 검증하고, 분석과정에서 발생될 수 있는 불확도를 GUM 지침에 따라 측정하였다. 검출한계와 정량한계는 7.5 μg/kg과 18.8 μg/kg이었고 검량선은 20~500 μg/kg농도범위에서 0.9999의 높은 상관성을 보였다. 대표적인 밀 가공품인 건면과 라면에 데옥시니발레놀을 200 μg/kg과 500 μg/kg을 첨가하여 회수율과 반복성을 측정한 결과, 건면에서는 82 ± 2.7%와 87 ± 1.3%의 결과를 얻었고, 라면에서는 97 ± 1.6%와 91 ± 12.0%로 측정되었다. 한편, 불확도 측정을 위한 첫 단계로, 분석과정에서의 불확도 요인은 시료량 측정, 최종 시료부피, 보관표준용액, 작업표준용액, 표준용액, 기기, 매질, 검량선 작성으로 구분하였다. 불확도 요인의 구성요인은 저울의 안정성, 분해능, 재현성, 표준물질의 순도, 분자량, 농도, 표준용액 희석, 검량선, 회수율 및 분석기기의 재현성 등이 작용하였다. 건면과 라면에 데옥시니발레놀을 200과 500 μg/kg을 첨가하여 분석한 결과 건면에서는 163.8 ± 52.1 μg/kg, 435.2 ± 91.6 μg/kg으로 측정되었고 라면에서는 194.3 ± 33.0 μg/kg, 453.2 ± 91.1 μg/kg으로 측정되었다. 확장불확도는 합성표준불확도에 포함인자(k = 2, 신뢰수준 95%)를 곱하여 산출하였다. 건면과 라면에서 데옥시니발레놀을 분석함에 있어 불확도에 영향을 주는 주요인자는 시료의 회수율과 검량선 작성인 것으로 파악되었다. 따라서 면류 시료에서 데옥시니발레놀 분석의 정밀성을 높이기 위해서는 회수율과 검량선 작성에

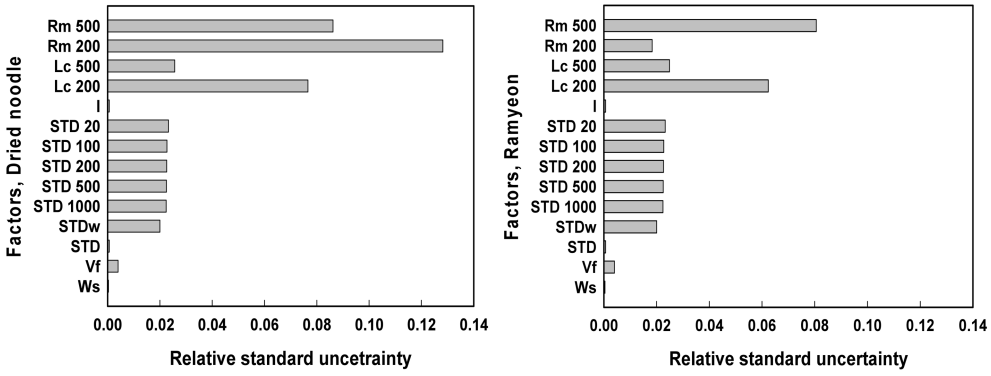

Fig. 2. Uncertainties histogram of the HPLC method for deoxynivalenol in noodles at 200 and 500 μg/kg levels.

영향을 끼칠 수 있는 분석과정을 확인하고 오차를 최소화 할 수 있는 방안을 모색해야 할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 식품의약품안전평가원 용역연구개발과제의 연구개발비(1016식품안009)와 한국식품연구원 주요연구사업비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. WHO. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical report series 906. p. 35-42. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2002).
2. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monograph No. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (1993).
3. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of JECFA. WHO food additives series 47/FAO food and nutrition 74. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2001).
4. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Seventy-second report of the JECFA. WHO technical report series 959. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2011).
5. CODEX committee on Contaminants in Foods (CCCF). Discussion paper on deoxynivalenol. Joint FAO/WHO food standards programme CODEX committee on contaminants in foods. First session. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy (2007).
6. FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO food and nutrition paper 81. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy (2004).
7. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Codex. Korea Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp.10-6-14 (2010).
8. 식품의약품안전청 : 식품 등 위해성 평가 - 식품 중 데옥시니발레놀에 대한 안전성 평가, 식품의약품안전청보고서 (2007).
9. Ok H.E., Chang H.J., Choi S.-W., Cho T.Y., Oh K.S. and Chun H.S. Occurrence and intake of deoxynivalenol in cereal-based products marketed in Korea during 2007-2008. Food Addit. Contam. Part B, **2**(2), 154-161 (2009).
10. European Commission (EC). Commission Regulation 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union L **70**, 12-34 (2006).
11. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18th ed. Method 986.17. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA (2005).
12. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18th ed. Method 986.18. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA (2005).
13. USDA. Quantitative test kit for deoxynivalenol for wheat, malted barley, barley, oats, corn. FGIS 2002-104. United States Department of Agriculture, Washington DC, USA (2002).
14. EN 15891:2010. Foodstuffs - Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection. CEN/TC 275 - Food analysis - Horizontal methods. Mycotoxin Standard Methods, October 6 (2010).
15. ISO. Guide to the expression of uncertainty in measurement. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland (1993).
16. EURACHEM. Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM, London, UK (1995).
17. EURACHEM. Quantifying uncertainty in analytical measurement 2nd. EURACHEM, London, UK (2000).
18. 옥현이, 장현주, 안장혁, 조재용, 전향숙 : 밀에서 HPLC에 의한 데옥시니발레놀 분석의 측정불확도 산정. 한국식품과학회지, **41**, 258-264 (2009).
19. EU. Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation, with particular reference to community legislation concerning (2004). http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling-analysis_2004_en.pdf.