J. Fd Hyg. Safety 11(2), 149 - 157(1996)

식품중 Aflatoxin 측정방법의 비교

김명희
서울특별시 보건환경연구원

Comparison of methods for Determination of Aflatoxins in food Products

Myung Hee Kim
Seoul Institute of Health and Environment, Seoul, 137-130, Korea

ABSTRACT — A procedure for the determination of Aflatoxins in food and grains which utilizes reversed phased liquid chromatographic (LC) analysis with postcolumn derivatization by an electrochemical cell and determination with a fluorescence detector has been evaluated. The LC mobile phase was water-acetonitrile-methanol (6+2+2) with 1mM KBr and 1 mM HNO_3 which gave baseline separation for the four Aflatoxins (AfB_1, AfB_2, AfG_1, AfG_2). The electrochemical cell set at 7V, generated bromine and derivatized aflatoxins B_1 and G_1, The derivatives were detected by the fluorescence detector. The aflatoxins in naturally contaminated corn samples were isolated by three different cleanup procedures: the AOAC method I column (CB method), a rapid filtrate column (Romer's column), and an immunoaffinity column. The final extract were quantitated with fluorodensitometric TLC and the LC postcolumn derivatization techniques. The results were quite similar, however the LC technique showed less interferences and could be automated. Samples of corn, raw peanuts, peanut butter and dried dates were also analyzed successfully with this procedure.

Key word □ Aflatoxin, Romer's column, immunoaffinity column, fluorodensitometric TLC, HPLC

서 론

국가경제의 발전에 따라 국민들의 식생활 의식수준이 향상되면서 식품안전성에 대한 문제가 사회적으로 자주 대두되고 있다. 식품중에서도 농산물과 그 가공품에 대한 중금속, 농약 및 미생물에 의하여 생성되는 Aflatoxin류를 비롯한 각종 mycotoxin의 오염여부에 대한 관심도가 높아져 이 분야에 대한 체계적 연구가 요구되고 있다.

특히 수종의 *Aspergillus*속 미생물에 의한 대사결과 생성되는 독성성분중 Aflatoxin류는 현재 약 17종이 알려져 있으며 이중에서도 B_1, G_1, M_1 등은 강력한 발암물질로 보고되었다.[1~3] 따라서 미국, 영국, Canada, 일본 등 선진국에서는 Aflatoxin을 비롯한 많은 mycotoxin류에 대한 활발한 연구가 이루어지고 있으며 특히 Aflatoxin에 대하여는 식품과 사료 등의 허용기준을 정하여 규제하고 있다. 그러나 아직 우리나라에서는 Aflatoxin에 대한 기준을 잠정적으로 10 ppb로 정하고 시험법은 AOAC의 CB method에 준하고 있을 뿐 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.[4,5]

Aflatoxin류의 측정방법은 종래의 AOAC의 CB method의 TLC법,[4,6] Fluorometry,[7] HPLC법[8~11] 그리고 Immuno affinity column[12~14]을 이용한 방법과 많은 상품화된 ELISA kit들에 의한 신속한 screening방법들이 개발되고 있다.

이에 저자는 AOAC method에 따른 silica column, Romer's clean up column 및 affinity column에 의한 추출법과 이를 TLC 및 HPLC에 의하여 분석한 결과를 비교검토하여 실제 시료의 분석시 정확하고 신속한 방법을 제시하므로서 수입 개방의 시대를 맞아 안전성이 보장된 농산물의 확보와 더불어 수입압력에 능동적으로 대처하는 방안을 모색하고자 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

재료

Total Aflatoxin 함량이 1ng 이하인 ground corn, peanut

butter, ground raw peanut 각각 25 Lb, 그리고 자연적으로 Aflatoxin에 오염된 ground corn(28 ppb, 121 ppb, 농도 미상)를 시료로 하였다.

시약

Aflatoxin 표준품은 B_1, B_2, G_1, G_2를 사용하였으며 미국 FDA 및 Applied science(State College PA16804)에서 구득하였다. 실험에 사용된 water, methanol, acetonitrile등은 HPLC grade이였고 기타 chloroform, hexane, NaCl, KCl, HBr 등의 시약은 특급을 사용하였다. Column chromatography에 사용된 충진제는 silicagel 60 (E. Merk, 0.63 0.2mm, NO7734)로 100°C에서 4시간 activation시킨 후 사용하였고 affinity column은 Aflatest-P(Vicam. Somerville, MA 02145)를, rapid cleanup column은 Romer's column(Tom Romer Lab. Inc.)를, 그리고 TLC plate는 Silicagel 60F(Merck Co)를 사용하였다.

기기

High Pressure Liquid Chromatograph with fluorescence detector, and electro chemical cell, glass column, TLC scanner, High speed waring blender, Micropipet & Tip, glass microfiber filter paper, Hand pump.

실험방법

Aflatoxin 표준액은 AOAC method[4] (971.22, 15th Ed.)따라 benzen-acetonitrile(98+2)용액 1 ml 중 500 ng B_1, 125 ng B_2, 250 ng G_1, 125 ng G_2가 함유되도록 stock solution을 만들어 냉장보관하고 이 stock solution 적당량을 2ml volumetric flask에 취하여 N_2 stream하에서 실온 건조시키고 이를 1 ml의 methanol로 용해시킨 후 H_2O를 가하여 2 ml로 하여 사용하였으며 이 working standard solution은 매일 조제 사용하였다.

AOAC-CB method : ground corn, peanut, peanut butter 각각 50 g의 시료에 총 Aflatoxin함량이 5, 10, 20, 30 ppb가 되도록 Aflatoxin 혼합표준액(B_1 : B_2 : G_1 : G_2 = 10 : 3 : 10 : 2)를 spike하여 이들 시료들을 AOAC method 968.22(15th Ed.)에 따라 추출, column chromatography를 행하였으며 그 방법은 Fig. 1에 도시되었다. 각 시료에 대한 실험은 2개의 다른 column을 사용하여 duplicate로 하였다.

Immuno Affinity Column Method : 이 원리는 시료 중의 Aflatoxin을 80% methanol로 추출하여 이를 희석한 후 Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2에 각기 특이한 monoclonal antibody가 붙은 sepharose가 충진된 affinity column에 apply하여 결합된 Aflatoxin들을 methanol로 용출시켜 그 함량을 측정하는 것이다.

시료 25 g을 Fig. 2에 제시된 방법에 따라 80% methanol

50 g Sample
↓ Add 25 ml H_2O & 25 g diat earth
EXTRACT with 250 ml $CHCl_3$
↓
FILTER with prefolded filter paper
↓
APPLY 50 ml filtrate to silica column
↓
WASH with 150 ml, hexane
↓
WASH again with 150 ml, ether
↓
ELUTE 150 ml, MeOH/$CHCl_3$ (3:97)
↓
EVAPORATE under N_2 stream at 40℃
↓ ↓
TLC HPLC

Fig. 1. Extraction of Aflatoxins by AOAC-CB method.

25 g Sample
↓ Add 5 g NaCl
EXTRACT with 125 ml, 80% MeOH by blender for 3min. at high speed
↓
FILTER with prefolded filter paper
↓
PIPET 15 ml filtrate
↓ Add 30 ml, H_2O
FILTER through the glass microfiber filter paper
↓
APPLY 15 ml, second filtrate to mini affinity column
↓ Pass 2~3 ml air through column
WASH two times with 10 ml H_2O
↓ Pass 2~3 ml air through column
ELUTE 1.0 ml HPLC grade MeOH
↓
EVAPORATE under N_2 stream at 40℃.
↓ ↓
TLC HPLC

Fig. 2. Extraction of Aflatoxins by affinity column method.

125 m*l*로 추출하고 그 여액 15 m*l*에 물30 m*l*를 가하여 희석하고 다시 glass microfiber filter로 여과한 후 (이 때 H_2O로 희석한 후 30분 이내에 column에 apply하여야함) 10 m*l*의 reservoir가 달린 hand pump에 affinity column을 연결하고 2차 여액을 15 m*l* column에 apply한다(시료 1.0 g에 해당). 실험에 사용된 affinity column은 aflatest-P column으로 1 m*l* syringe 통에 Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2에 특이성을 지닌 monoclonal antibody가 부착된 sepharose가 충진된 것으로 완충액으로 채워져 있으며 실온에서 1년간 보관, 사용이 가능하다. Reservoir에 2차 여액을 apply하고 hand pump에 air를 채워서 서서히 piston을 밀어 유출액이 2 drops/sec되도록 조정한다. Apply한 시료액이 column을 다 통과하면 2~3 m*l*의 air를 통과시키고 10 m*l*의 H_2O로 세척한다. 이때도 유출속도는 2 drops/sec로 조정하고 H_2O이 다 통과되면 다시 2~3 m*l* air를 통과시킨다. 이 조작을 2회 되풀이 한다.

세척이 끝나면 1.0 m*l*의 HPLC grade methanol 로 column에 결합되었던 Aflatoxin을 용출시키고 다시 air를 2~3 m*l* 통과시킨다. Aflatest-P column은 2~3회 반복사용이 가능하다. 이 methanol 용출액 1.0 m*l*를 N_2 stream하에서 건조, 냉장보관 후 실험에 사용하였다.

Romer's cleanup column method : 25 g의 시료에 90% acetonitrile 100 m*l*를 가하고 Waring blender로 3분간 high speed로 추출하여 여과하였다. 이 여액 5 m*l*를 직경 0.8 cm의 test tube에 옮기고 끝에 filter가 달리고 3 cm 높이의 충진제가 들어있는 column을 test tube에 서서히 밀어 넣어 이 column 위로 올라오는 여액 2 m*l*를 정확히 취한다(시료 0.5 g에 해당). 이 액을 40°C이하에서 N_2 stream하에서 건조시키고 냉장보관 후 실험에 사용하였다 (Fig. 3).

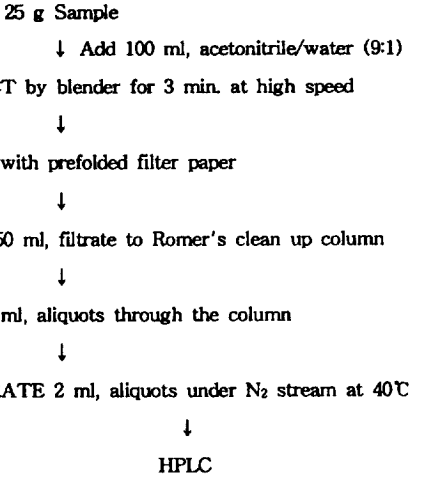

Fig. 3. Extraction of Aflatoxins by Romder's clean up column method.

TLC법 : 냉장보관된 추출한 시료를 정확히 1.0 m*l*의 methanol에 용해시켜 이 중 500 μ*l*를 채취하여 redry시킨다. 이 redry된 시료를 100 μ*l* $CHCl_3$에 용해시켜 TLC를 행하였으며 plate는 silicagel 60 F precoated glass plate를 사용하여 1 cm 간격으로 10~20 μ*l*씩 표준액혼합액과 시료를 spot하였다. 전개용매는 $CHCl_3$/acetone/H_2O를 90 : 10 : 1로 조제하여 사용하고 전개시에는 전개조를 aluminum foil로 싸서 차광시켰다. 전개가 끝나면 이 plate를 꺼내어 자연건조시켜 TLC scanner로 정량하였으며 이 때 TLC scanner의 조건은 Table 1과 같다.

HPLC법 : 1.0 m*l*의 methanol에 녹인 추출 시료의 일부를 정확히 취하여 농축, 건조하고 이를 100 *l*의 80% methanol에 녹여 HPLC의 20 μ*l* loop에 injection하였으며 용매와

Table 1. Conditions of TLC scanner.

Model : CAMAG
Hg lamp : 100 V/ 0.5 A
Deuterium lamp : 80 V / 0.3 A
Wavelength : 366 nm (UV)
Scanning length : 60 mm
Spot interval : 100 mm
Level of Integrator : 1000
Integrator : Spectraphysics SP 4100
Attenuation : 64
MA : 5000
PT : 5000

Table 2. Conditions of HPLC.

Column : 5 l-spherical C18/Waters, O/N 85711
Detector : Waters 470 scanning fluorescence detector
Cell : Korba electrochemical cell (7V)
Mobile-phase : H2O/MeOH/CH3CN (60:20:20)
with 1 mM KBr and 1 mM HNO3
Flow rate : 1 ml/min.
Wavelength : Ex 360 nm, Em 445 nm
Inject. vol. : 20 l loop
Att : ×4 or ×8
Gain : 100
Chart speed : 0.5 cm/min.
Filter : 0.5 sec.
Signal + : - 0.0002

Table 3. Results of TLC method : Comparison of AOAC-CB, affinity and Romer's column extraction.

Aflatoxins Added(ng/g)		AOAC-CB Column					Affinity Column					Romer's Column				
		B_1	B_2	G_1	G_2	Total	B_1	B_2	G_1	G_2	Total	B_1	B_2	G_1	G_2	Total
Corn	0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.3	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.2	0.0	0.1	0.0	0.3
	5	1.6	0.4	2.1	0.4	4.5	2.1	0.5	0.8	0.4	4.8	2.1	0.6	2.0	0.4	5.1
	10	3.2	1.4	3.0	1.0	8.6	3.4	1.2	3.1	0.9	8.6	4.1	1.0	3.9	0.6	9.6
	20	5.8	2.4	7.0	1.0	17.1	7.2	1.6	6.1	1.2	16.1	7.8	1.8	7.4	1.4	18.4
	30	8.2	3.6	8.8	3.5	24.1	10.5	3.7	7.6	2.7	24.5	10.8	3.6	10.9	2.1	27.4
Peanut	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5	1.5	0.3	1.7	0.2	3.7	2.0	0.4	1.5	0.2	4.1	2.1	0.7	1.9	0.3	5.0
	10	2.8	1.5	2.6	0.8	7.7	3.1	1.0	3.1	1.0	8.2	4.0	1.1	4.0	1.2	10.3
	20	6.0	1.8	7.1	1.2	16.1	6.8	4.9	6.5	1.3	16.5	7.8	1.9	7.6	1.0	18.3
	30	10.2	3.1	9.8	1.8	24.9	10.9	3.2	10.5	2.1	26.7	11.0	3.8	10.8	2.4	28.0
Peanut butter	0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.4	0.2	0.0	0.2	0.0	0.4	0.3	0.0	0.2	0.0	0.5
	5	1.5	0.4	1.8	0.4	4.1	2.0	0.5	1.8	0.3	4.6	2.1	0.4	2.1	0.4	5.0
	10	3.2	1.0	2.8	0.6	7.6	3.2	1.0	3.4	0.9	8.5	4.0	1.1	4.1	0.6	9.8
	20	6.0	2.1	6.4	1.6	16.1	7.4	1.8	6.1	1.3	16.6	8.1	2.3	8.3	1.5	20.2
	30	10.0	2.7	9.7	2.0	24.2	10.6	3.5	9.1	2.4	25.6	11.3	3.6	10.8	2.1	27.8
N.C.	$Corn_1$	14.9	1.5	0.0	0.0	16.4	15.3	1.6	0.0	0.0	16.9	20.6	1.5	0.1	0.0	22.2
	$Corn_2$	68.5	6.6	1.4	0.0	76.5	71.8	5.6	1.5	0.0	78.9	91.3	9.1	1.6	0.0	102.0

N.C. : Naturally Contaminated

Table 4. Results of HPLC method : Comparison of AOAC-CB, affinity and Romer's column extraction.

Aflatoxins Added(ng/g)		AOAC-CB Column					Affinity Column					Romer's Column				
		B_1	B_2	G_1	G_2	Total	B_1	B_2	G_1	G_2	Total	B_1	B_2	G_1	G_2	Total
Corn	0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.3	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	0.4
	5	1.7	0.4	2.0	0.5	4.6	2.1	0.5	1.8	0.4	4.8	2.1	0.5	2.2	0.4	5.2
	10	3.4	1.5	3.1	0.9	8.9	3.6	1.1	3.7	1.0	9.4	4.1	1.1	3.9	0.7	9.8
	20	7.6	1.0	7.2	1.1	16.9	7.5	1.8	6.9	1.4	17.6	7.9	2.3	8.1	1.4	19.7
	30	9.4	2.8	9.9	2.0	24.1	10.8	2.0	11.0	2.0	26.7	11.2	3.0	11.1	1.9	27.2
Peanut	0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1
	5	1.8	0.4	1.7	0.3	4.2	2.1	0.5	1.9	0.4	4.9	2.1	0.6	2.1	0.4	5.2
	10	3.6	1.4	3.0	0.8	8.8	3.6	1.2	3.8	0.6	9.2	4.0	1.2	3.9	0.8	9.9
	20	7.8	1.6	7.4	1.0	17.8	7.7	2.0	7.2	1.3	18.2	7.9	2.4	8.1	1.5	19.9
	30	10.5	2.8	10.6	1.9	25.7	11.4	3.2	10.9	2.1	27.6	11.8	3.5	11.4	2.0	28.7
Peanut butter	0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.4	0.2	0.0	0.2	0.0	0.4	0.3	0.0	0.2	0.0	0.5
	5	1.9	0.4	1.8	0.3	4.4	2.0	0.5	1.8	0.4	4.7	2.1	0.6	2.1	0.4	5.2
	10	3.6	1.2	3.2	0.6	8.6	3.8	1.0	3.7	0.6	9.1	4.1	1.1	4.2	0.8	10.2
	20	7.8	1.7	7.4	1.1	18.0	7.6	2.3	7.7	1.4	19.0	8.2	2.3	8.1	1.5	20.1
	30	10.4	2.8	10.6	1.9	25.7	11.4	3.2	10.9	2.1	27.6	11.8	3.5	11.4	2.0	28.7
N.C.	$Corn_1$	15.8	1.6	0.0	0.0	17.4	16.8	1.7	0.0	0.0	18.5	21.2	1.6	0.1	0.0	22.9
	$Corn_2$	72.8	6.4	1.6	0.0	80.8	76.5	7.1	0.6	0.0	84.2	92.0	8.9	1.6	0.0	102.5

N.C. : Naturally Contaminated

Table 5. Comparison of recovery rate by TLC and HPLC quantitation of Aflatoxins.

	Aflatoxins Added(ng/g)	TLC			HPLC		
		CB-C.	Aff-C.	Romer-C.	CB-C.	Aff-C.	Romer-C.
Corn	5	90.0	96.0	102.0	92.0	96.0	104.0
	10	86.0	86.0	96.0	89.0	94.0	98.0
	20	85.5	80.5	92.0	84.5	88.0	98.5
	30	80.3	81.7	91.3	80.3	89.0	91.7
Peanut	5	74.0	82.0	100.0	84.0	98.0	104.0
	10	77.0	82.0	103.0	88.0	92.0	99.0
	20	80.5	82.3	91.5	89.0	91.0	99.5
	30	82.7	89.0	93.3	80.3	89.3	96.7
Peanut butter	5	82.0	92.0	100.0	88.0	94.0	104.0
	10	76.0	85.0	98.0	86.0	91.0	102.0
	20	80.5	83.0	101.0	90.0	95.0	100.5
	30	80.7	85.3	92.7	85.7	92.0	95.7
Mean±S.E.		81.3±1.23	85.4±1.24	96.7±1.22	86.4±1.01	92.4±0.84	99.5±1.04
			87.8±1.31			92.8±1.05	
N.C.	$Corn_1$	58.2	60.3	79.2	62.1	66.1	81.4
N.C.	$Corn_2$	63.2	65.2	84.3	66.7	69.6	84.7
Mean±S.E.			68.4±4.00			71.8±3.38	

N.C.:Naturally Contaminated

HPLC의 조건이 Table 2에 제시되었다.

결과 및 고찰

Aflatoxin류의 측정에 있어 서로 다른 3종류의 column을 이용하여 시료를 추출하고 이를 각기 TLC와 HPLC method에 따라 측정한 결과가 Table 3~5에 제시되었다. TLC method에서 가장 회수율이 높은 column은 Romer's column으로 5 ppb의 경우 104.0%, 30 ppb에서는 90% 이상의 회수율을 나타내어 세가지 column중 용출이 우수하였고, affinity column이 CB-method column보다 전체 시료에서 약간의 높은 회수율을 나타냈다. 그러나 affinity column은 가격이 비싸며 용출시 많은 주의와 technique이 필요로 하는 결점이 있다. 즉 용출시 pressure를 심하게 가하거나 특수유기용매 등에 의해 antibody가 파괴되어 data의 variation이 심하다. 따라서 aflatoxin 추출시 용출율이 높은 acetone이나 acetonitrile등의 추출액을 affinity column에 apply할 수 없는 단점도 갖고 있다. CB-method의 silica column 추출은 소요 시간이 길고 다량의 유기용매를 다루어야 하는 단점이 있다.

시료별로 관찰하여 보면 raw peanut나 peanut butter가 corn에 비하여 약간 회수율이 높은 듯하나 통계적으로 그 유의성은 인정되지 않았다. 또한 인위적으로 표준액을 spike한 시료보다는 자연적으로 오염된 시료들의 회수율이 현저히 낮게 나타났다. 이런 결과는 Mary 등의 보고[13]와도 잘 일치하였다.

TLC plate를 scanner를 이용하여 그 나타난 spot들을 정량한 chromatogram이 Fig. 4에 도시되었다. 이 그림에서도 CB-method에 의한 추출보다는 affinity column에서 Aflatoxin B_1의 회수율이 높았으며 또한 affinity column에 의한 추출액의 baseline이 아주 깨끗하여 분리가 순수하게 이루어졌음을 볼 수 있다. 반면 Romer's column의 90% acetonitril 추출액은 다른 2종의 column에 비하여 baseline이 균일하게 나타나지 않아 불순물의 혼입이 되었음을 볼 수 있으나 Aflatoxin B_1, B_2의 분리에는 큰 영향을 주지 않았다. 또한 85% acetone으로 시료를 추출한 경우는 추출율은 가장 높았으나 Rf치 0.92정도 위치에 큰 spot가 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며 Aflatoxin류의 spot도 약간의 tailing이 있었다.

HPLC를 이용한 실험결과가 Table 4,5에 제시되었다. 본

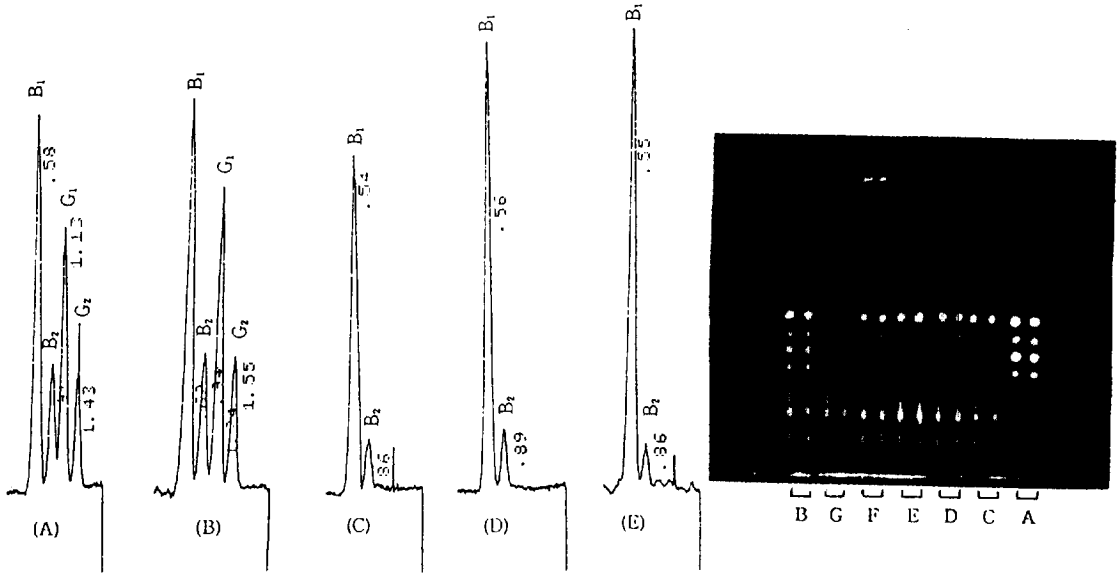

Fig. 4 TLC detection of Aflatoxins by TLC scanner

(A) : Aflatoxin standard (B_1 2.0 ng, B_2 0.6 ng, G_1 2.0 ng, G_2 0.6 ng)

(B) : Corn sample spiked with Aflatoxin standard

(C) : Naturally contaminated corn sample by AOAC-CB method

(D) : Naturally contaminated corn sample by affinity column method

(E) : Naturally contaminated corn sample by Romer's column method

(G) : Control corn

방법은 post-column derivatization을 응용한 것으로 electrochemical cell (일명 Karba cell)을 이용하여 brome을 발생시키므로서 Aflatoxin B_1, G_1의 유도체를 만들어 fluorescence detector로 측정한 것으로 최초로 electrochemical cell을 이용하여 iodine의 유도체가 아닌 brome 유도체로 만들어 Aflaroxin의 측정을 시도한 것이다. HPLC에 의한 결과 역시 TLC와 유사하게 나타나 Romer's column에 의한 추출이 평균회수율 99.5%로 다른 두 column에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.01$). 특히 우리가 일반적으로 사용하는 CB-method의 silica column 경우 86.4%로 가장 낮은 회수율을 보였다.

또한 Table 5에 제시된 바와 같이 TLC법과 HPLC법을 전체적으로 비교할 때 HPLC법이 약 5%정도 회수율이 높게 나타났으며 이는 통계적으로도 유의하였다. 그러나 자연적으로 오염된 시료의 경우는 약 3% 정도 회수율이 높았다.

Romer's column을 이용하여 3종류의 각기 다른 용매 (90% acetonitrile, 80% methanol, 85% acetone)로 농도 미상의 Aflatoxin이 오염된 corn을 추출하여 10회 이상 반복 실험한 결과가 Table 6에 제시되었다. 이에 의하면 추출율은 85% acetone이 가장 높게 나타나고 80% methonol의 경우는 acetone에 비하여 약 70% 정도만이 추출되었음을 알 수 있다. 따라서 우리가 80% methanol을 사용하여 affinity

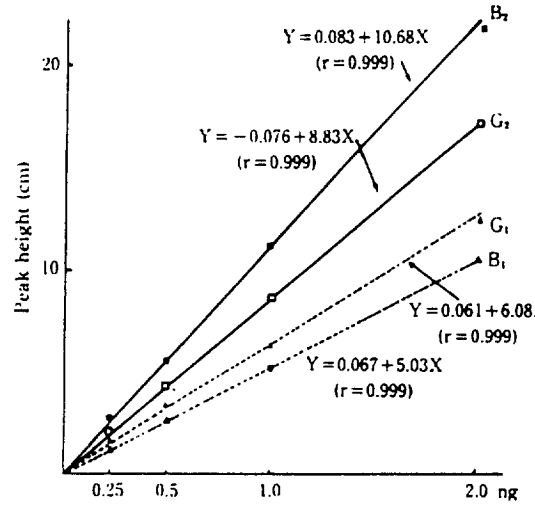

Fig. 5 Standard calibration curve of Aflatoxin standard by HPLC

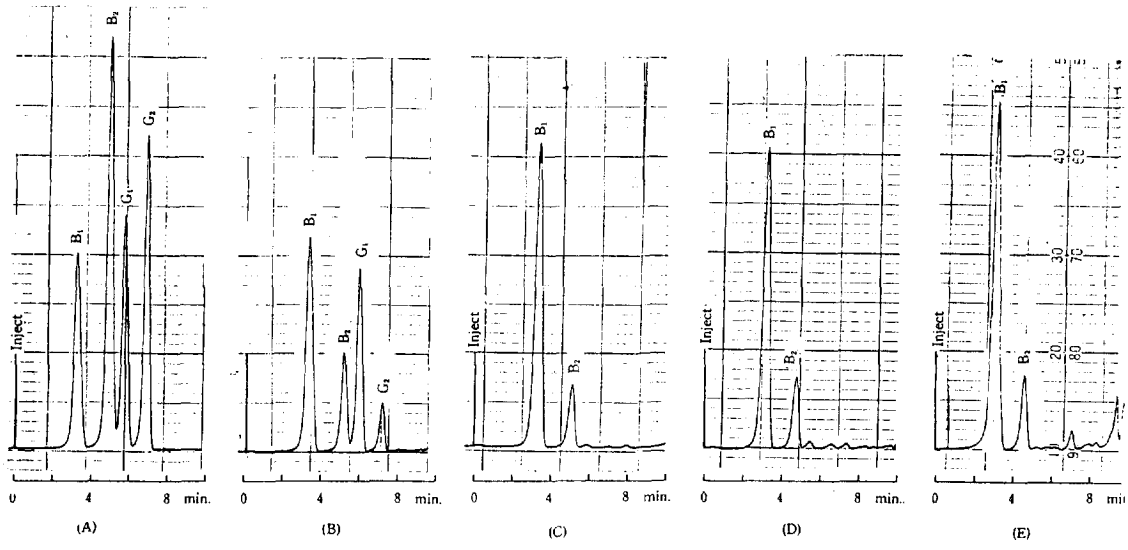

Fig. 6 HPLC chromatogram of Aflatoxin standard and samples

(A):Mixed Aflatoxin standard (each 1 ng)

(B):Corn sample spiked with Aflatoxin standard (B_1 1.0 ng, B_2 0.3 ng, G_1 1.0 ng, G_2 0.2 ng)

(C):Naturally contaminated corn sample extracted by AOAC-CB method

(D):Naturally contaminated corn sample extracted by affinity column method

(E):Naturally contaminated corn sample extracted by Romer's column method using 85% acetone

Table 6. Quantitation of Aflatoxins in high naturally contaminated corn by TLC and HPLC followed Romer's clean up column procedure: comparison of extracting solvents. **(ng/g)**

	90% CH_3CN		80% MeOH		85% Acetone	
	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC
1	139.4	134.8+(8.0)	91.4	93.4+(7.0)	132.3	139.1+(8.6)
2	124.4	125.6+(7.1)	92.6	92.7+(6.9)	132.8	138.0+(8.6)
3	120.1	118.5+(7.2)	97.6	104.5+(7.2)	139.4	129.3+(8.6)
4	122.9	125.8+(7.2)	108.8	105.4+(7.2)	139.4	135.7+(9.0)
5	102.6	116.5+(6.8)	115.2	107.8+(7.1)	124.4	130.6+(9.2)
6	120.1	123.7+(7.0)	97.0	98.2+(7.1)	128.9	131.7+(9.2)
7	117.5	119.4+(7.0)	92.4	100.8+(7.3)	127.2	132.7+(8.7)
8	120.1	123.4+(6.9)	92.6	98.2+(7.1)	103.5	141.8+(9.6)
9	127.4	126.7+(7.2)	92.8	95.3+(7.2)	121.7	127.5+(8.2)
10	113.2	115.5+(6.8)	85.0	81.6+(6.2)	114.6	121.8+(8.5)
11	116.2	120.6+(7.0)	91.0	83.7+(6.1)	158.3	146.5+(9.2)
12	119.0	118.7+(7.0)	92.3	81.6+(6.1)	150.7	149.2+(9.2)
13					150.8	109.4+(8.0)
Mean±S.E	120.0±2.43	122.4±1.49	95.7±2.31	95.3±2.51	131.8±4.05	133.6±2.78

( ):Aflatoxin B_2

column으로 정제하거나 혹은 다른 방법으로 실험할 경우 다른 용매에 비하여 추출율이 현저히 떨어진다는 것을 감안하여야 할 것이다. 그러나 acetone의 경우 추출율은 대단히 높으나 불순한 타성분까지 추출되어 혼입되는 것을 염

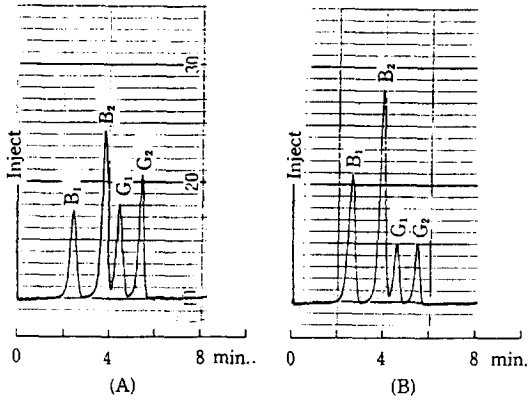

Fig. 7 HPLC chromatogram of same standard solution at Em 350/Ex 420 and Em 360/Ex 445 nm of fluorescence detector.
(A):Em 360/Ex 445 nm (0.5ng each STD)
(B):Em 360/Ex 420 nm (0.5ng each STD)

두에 두고 실험에 임하여야 할 것으며 HPLC을 이용하여 분석하는 경우에는 Aflatoxin의 분리에는 큰 영향이 없으나 HPLC column의 오염을 고려하여야 할 것이다.

또한 fluorescence detector의 파장을 변화시키므로서 측정하고자 하는 Aflatoxin류의 분석을 좀더 정밀히 할 수 있음이 Fig. 7에 도시되었다. 즉 미량 존재하는 Aflatoxin G_1, G_2를 분석하고자 하는 경우 detector의 파장을 Ex 360 nm, Em 445 nm 로, 그러나 B_1, B_2를 중점적으로 측정하고자 하는 경우는 Ex 360 nm, Em 420 nm로 맞추고 측정하면 좀더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 즉 Fig. 7에 제시된 바와 같이 동일한 농도의 표준액 혼합액을 injection한 경우 파장 Ex 360/Em 420 nm의 경우는 Aflatoxin B_1, B_2의 peak가 훨씬 크게 나타나는 반면 파장 Ex 360/Em 445 nm 에서는 G_1, G_2의 peak가 크게 나타나고 있어서 우리가 Aflatoxin을 측정할 경우 그 측정하고자 하는 성분이나 혹은 오염도에 따라 detector의 파장도 적절히 선정, 사용하여야 될 것이다.

감사의 말씀

본 연구를 위하여 시료, 표준품 및 column 등을 제공하여 준 US-FDA의 Dr. Mary Trucksess에게 감사드립니다.

국문요약

Aflatoxin의 실험방법과 column의 종류에 따른 추출율을 비교 검토하고 이를 TLC와 HPLC로 각각 분석하는 동시에 이를 실제로 시료분석에 적용하여 다음과 같은 결론을 얻었다. AOAC-CB 방법을 이용하여 aflatoxin을 추출하는 경우 TLC법으로는 약 80%, HPLC법으로는 약 86%의 회수율을 나타냈다. HPLC의 실험방법은 post-column derivatization을 응용한 것으로 electrochemical cell 을 이용하여 fluorescence detector 로 측정하였다. Affinity column을 이용하여 추출하는 경우 85-90%의 회수율을 나타냈으나 column의 가격이 비싸고 특수 유기용매는 사용할 수 없는 단점과 숙련된 기술을 필요로 한다. Romer's column은 추출과정이 매우 신속하고 간단하며 acetone과 acetonitrile 등의 유기용매로 추출시 95-99%까지 회수율이 증가되나 불순물의 혼입 등을 고려하여 실험하여야 하며 affinity column에는 적용할 수 없는 결점이 있다. TLC와 HPLC 방법을 비교한 결과 HPLC법이 약 5% 정도 회수율이 높았으며 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 장점이 있다. 자연적으로 오염된 시료의 경우는 인위적으로 오염시킨 시료보다 회수율이 낮아 약 70% 정도를 나타냈다. 실제로 다량의 검체를 신속하고 정확하게 분석할 경우에는 Romer의 column을 이용하여 acetone으로 추출한 후 HPLC에 의하여 정량하는 방법을 권장하고자 한다.

참고문헌

1. Lee, L.S., Wall, J.H., Cotty, P.J. & Bayman, P. : Integration of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Conventional Chromatographic Procedure for Quantitation of Aflatoxin in Individual Cotton Bolls, Seed and Seed Section *J. AOAC*, **73**, 581-584 (1990).
2. Groopman, J.D., Donahye, K.F. : Aflatoxin, A Human Carcinogen : Determination in Feeds and Biological Samples by Monoclonal Antibody Affinity Chromatography. *J. AOAC*, **71**, 861-867 (1988).
3. Trucksess, M.W., Morris, D.K. & Lewis, E. : Proc. 2nd

Pan-Americal Biodeterioration Society Meeting Washington DC, pp. 301 (1988).

4. AOAC: Offical Methods of Analysis. 15th Ed. Arlington VA. p. 1184 (1989).
5. 식품공업협회 : 식품공전 p. 510 보사부고시 90-34호 (1990. 4. 25).
6. Boyacioglu, D. & Gönül, M. : Comparison of four Thin-Layer Chromatographic Methods for the Determination of Aflatoxins in Raisins. *J. AOAC,* **71**, 280-281 (1988).
7. Beaver, R.W., Willson, D.M. & Trucksess, M.W. : Comparision of Postcolumn Derivatization-Liquid Chromatography with Thin-Layer Chromatography for Determination of Aflatoxins in Naturally Contaminated Corn. *J. AOAC,* **73**, 579-589 (1990).
8. Dorner, J.W. & Cole, R.J. : Rapid Determination of Aflatoxins in Raw Peanuts by Liquid Chromatography with Postcolumn Iodination and Modified Minicolumn Clean up. *J. AOAC,* **71**, 43-47 (1988).
9. Francis, O.J., Ware, G.M. & Kuan, S.S. : Cyclodextrin Post-Column Fluorescence Enhancement of Aflatoxins for Reverse-Phase Liquid Chromatographic Determination in Corn. *J. AOAC,* **71**, 725-727 (1988).
10. Paulsch, W.E., Sizoo, E.A. & Egmond, H.P. : Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Feedstuffs Containing Citrus Pulp. *J. AOAC,* **71**, 957-960 (1988).
11. Park, D.L., Nesheim, S., Trucksess, M.W. & Stack, M. : Liquid Chromatographic Method for Determination of Aflatoxin B1, B2, G1, G2 in Corn and Peanut Products. *J. AOAC,* **73**, 260-266 (1990).
12. Park, D.L., Miller, B.M., Page, S.W. : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Screening Aflatoxin B1 in Cottonseed Product and Mixed Feed. *J. AOAC,* **71**, 326-332 (1989).
13. Trucksess, M.W., Young, K. & Donahue, K.F. : Comparison of Two Immunochemical Method with Thin-Layer Chromatographic Methods for Determination of Aflatoxins. *J. AOAC,* **73**, 425-428 (1990).
14. Chu, F.S., Lee, R.C. : Evaluation by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Cleanup for Thin-Layer Chromatography of Aflatoxin B1 in Corn, Peanut, and Peanut Butter. *J. AOAC,* **71**, 953-956 (1988).