

Application News

No. LAAN-A-LC-E276K

High Performance Liquid Chromatography Nexera-i와 RF-20A_{XS}를 이용한 갈근탕 내 아플라톡신 B₁, B₂, G₁과 G₂의 분석

Analysis of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in Kakkonto Using Nexera-I and RF-20A_{XS}

■ 서론

아플라톡신은 심각한 급성 독성을 일으키는 곰팡이 독소의 일종이다. 또한 발암성 물질이기에 식물에서 추출한 한약 또는 한약을 포함하는 제제에 대해 아플라톡신 검사가 필요하다. 일본제약포럼에서 일본 약전 제17판(2015년 7월) 개정안으로 "한약 및 한약 제품 내 아플라톡신 분석법"이 발표되었다. 이 시험법은 총 아플라톡신(아플라톡신 B₁, B₂, G₁ 및 G₂)에 대해 10 µg/kg 이하의 기준치를 제안하고 있다.

이 뉴스레터는 일본 약전 제17판 개정안을 바탕으로 복합제 한약인 갈근탕 분석법을 소개한다. 개정안에서는 Trifluoroacetic acid(TFA)으로 유도체화한 후, 형광검출기를 사용하여 아플라톡신을 분석하는 방법을 제시하고 있다. 이 뉴스레터는 유도체화법을 사용하여 진행한 분석과 유도체화 없이 형광검출기를 이용하여 진행한 분석에 대해 설명한다.

전 세계적으로 식품에 함유된 아플라톡신은 규제 대상이며, 일본에서는 아플라톡신에 대한 규정*1) 및 시험법*2)이 발표되었다. 이러한 시험법을 이용하여 수행한 식품 내 아플라톡신 분석으로는 이전 뉴스레터 L351, L422, L428, L430 및 L435를 참조할 수 있다.

■ Trifluoroacetic acid 유도체화 분석

극성 용매에서 아플라톡신 B₁, G₁은 아플라톡신 B₂, G₂에 비해 형광 감도가 낮은 것으로 알려져 있다. 감도를 증가시킬 수 있는 방법으로 광화학 반응을 이용한 유도체화, TFA 유도체화 및 전기화학적 유도체화가 있다. 이 뉴스레터는 위에 제시된 분석법 중 TFA 유도체화 방법을 사용한다. TFA 유도체화 반응은 일반적으로 pre-column 분석법으로 알려져 있으며, HPLC 분석 전에 분석 시료의 유도체화를 진행한다. TFA 유도체화 전후의 각 아플라톡신의 구조는 그림 1과 같다.

분석 전에 한약 갈근탕에 아플라톡신 표준용액을 첨가하였으며, 전처리 절차는 그림 2와 같다. 이 전처리는 일본 약전 제17판 개정안에 따라 실시하였다. 카트리지는 불순물 제거를 위해 AFLAKING 면역친화성 컬럼(Horiba, Ltd.)을 사용하였다. 한약 시료에 아플라톡신 표준용액을 첨가하여 각 아플라톡신이 0.25 µg/kg(총 1µg/kg) 농도가 되도록 하였다. 이는 일본 약전 제17판 개정안에 규정된 기준 농도의 1/10에 해당한다.

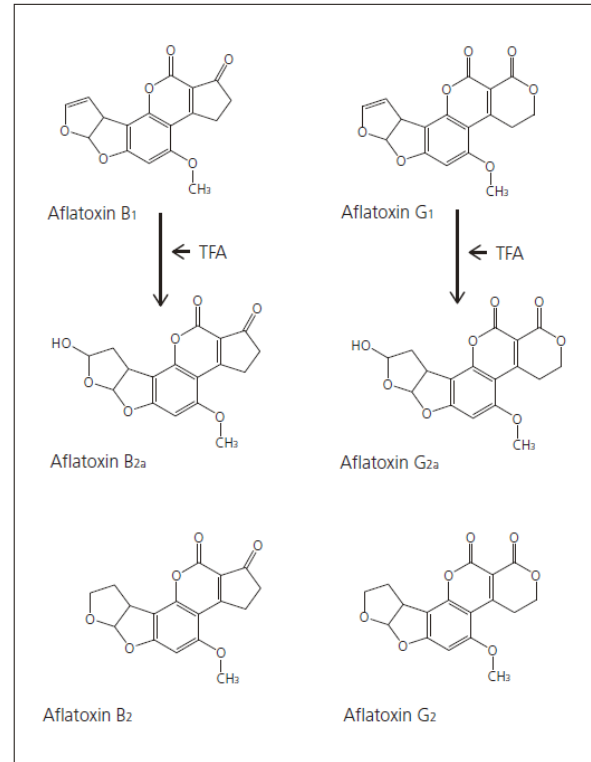


그림 1. 아플라톡신 B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 구조와 TFA 유도체화 후의 아플라톡신 구조(B_{2a} 및 G_{2a})

갈근탕의 분석 크로마토그램과 분석 조건은 각각 그림 3, 표 1에 나타내었다. 비교를 위해 아플라톡신 표준용액을 첨가하지 않은 시료의 분석 예시도 함께 나타내었다. 마지막으로 용출된 아플라톡신인 B₂ 이후에 불순물 피크가 발견되어 컬럼 세척 과정을 추가하였다.

■ 직접 검출 분석

아플라톡신 B₁ 및 G₁은 형광 감도가 낮지만, RF-20A_{XS} 고감도 형광 검출기를 사용하면 유도체화 없이 직접 검출할 수 있다. 이에 RF-20A_{XS}를 이용해 직접 검출을 수행하였고, Shim-pack XR-ODS II 고성능 컬럼을 사용하여 분석시간을 단축하고자 하였다.

그림 4는 TFA 유도체화를 하지 않은 아플라톡신 표준용액의 분석결과(각 아플라톡신 20 µg/L)를 나타낸 것이고, 그림 5는 낮은 농도(각 아플라톡신 0.1µg/L)에서 동일한 분석을 진행한 결과를 나타낸 것이다. 분석 조건은 표 2와 같다.

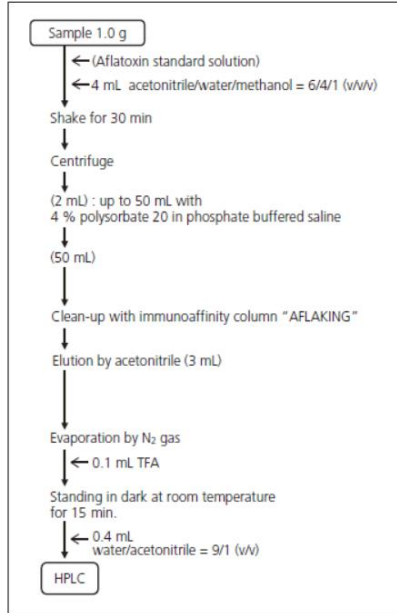


그림 2. 샘플 전처리 과정

표 1. HPLC 분석조건

System	: Nexera-i
Column	: Shim-pack FC-ODS (150 mm L. x 4.6 mm I.D., 3 μm)
Mobile Phase	: A: Water/methanol/acetonitrile=6/3/1 (v/v/v) : B: Acetonitrile
Time Program	: A Conc./B Conc. = 100/0 (0.00 - 15.00 min) - 10/90 (16.00-23.0 min) -> 100/0 (24.00 - 34.00 min)
Flow rate	: 0.80 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 20 μL
Detection	: RF-20AXS, EX. At 365 nm, Em. At 450 nm
Cell Temp.	: 25 °C

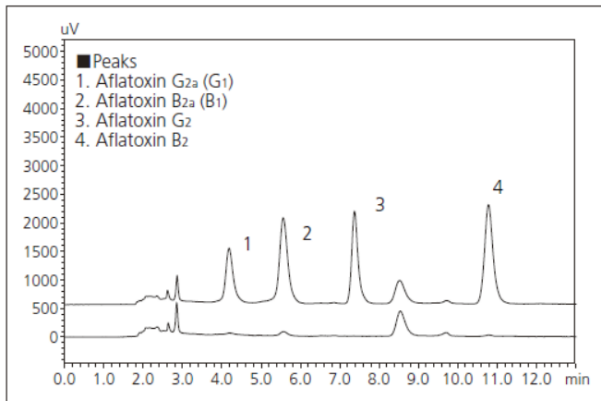


그림 3. TFA 유도체화 후 같은량의 크로마토그램 - HPLC 분석
(위: 표준용액 첨가, 아래: 표준용액 미첨가)

표 2. UHPLC 분석조건

System	: Nexera-i
Column	: Shim-pack XR-ODS II (100 mm L. x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A: Water : B: Acetonitrile
Time Program	: A Conc./B Conc./C Conc. = 65/30/5 (0.00 - 5.50 min) - 15/5/80 (5.51 - 7.0 min) -> 20/80/0 (7.01-9.00 min)- 65/30/5 (9.01-12.00 min)
Flowrate	: 1.00 mL/min
Column Temp.	: 50 °C
Injection Volume	: 10 μL
Detection	: RF-20AXS, EX. At 365 nm, Em. At 450 nm
Cell Temp.	: 25 °C

농도 0.1 μg/L에서 아플라톡신 B₁을 분석했을 때 측정된 피크면적의 상대표준편차(n=6)는 2.6 %였다. 이 결과는 TFA 유도체화를 수행하지 않아도 RF-20A_{XS}를 사용하여 충분한 분석 감도를 얻을 수 있음을 보여준다. 또, RF-20A_{XS}를 사용하면 TFA 유도체화를 이용한 분석 시간의 약 1/3로 단축할 수 있다. 그림 6은 0.1 ~ 20 μg/L 농도 범위에서 각 아플라톡신에 대한 검량선을 나타낸 것으로, 4 가지 화합물 모두에서 R²가 0.9999 이상인 양호한 선형성이 얻어졌다.

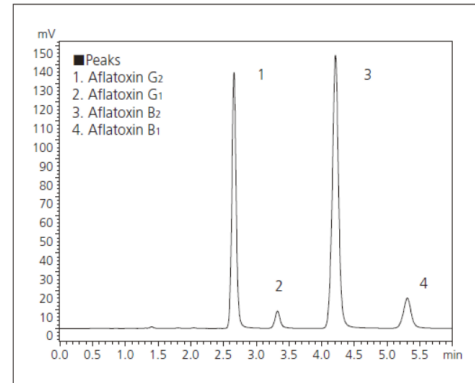


그림 4. 직접 검출을 이용한 아플라톡신 표준 용액의 크로마토그램 - UHPLC 분석(각 20 μg/L, 10 μL)

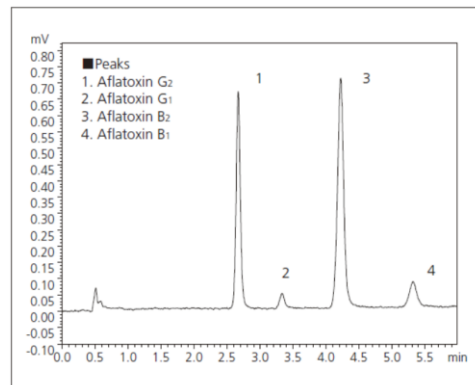


그림 5. 직접 검출을 이용한 아플라톡신 표준 용액의 크로마토그램 - UHPLC 분석(각 0.1 μg/L, 10 μL)

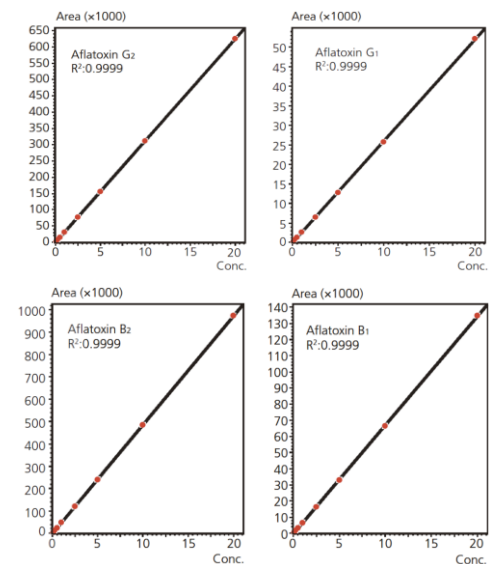


그림 6. 아플라톡신 표준용액의 검정곡선 - 직접 검출 (각 0.1 - 20 μg/L, 10 μL)

TFA 유도체화를 이용한 분석과 동일하게 한약 복합제인 갈근탕에 아플라톡신 표준용액을 첨가하여 분석하였다. 전처리 절차는 그림 7과 같다. 불순물을 제거하기 위해 AFLAKING 면역친화성 컬럼(Horiba, Ltd.)을 카트리지로 사용하였으며, 이 정제 단계까지의 전처리 과정은 그림 2와 같다. 아플라톡신 표준용액을 한약시료에 첨가하여 각 아플라톡신의 농도가 0.25 µg/kg(총 1µg/kg)이 되도록 하였다. 이는 일본 약전 제17판 개정안에 규정된 농도의 1/10에 해당한다.

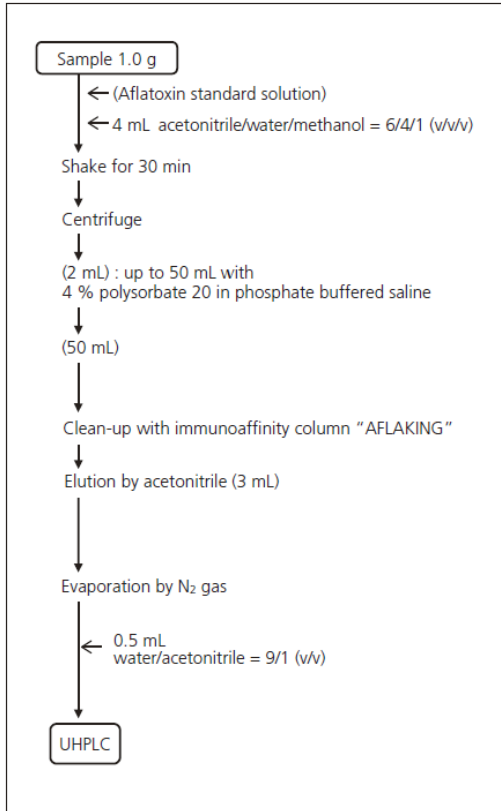


그림 7. 샘플 전처리 과정

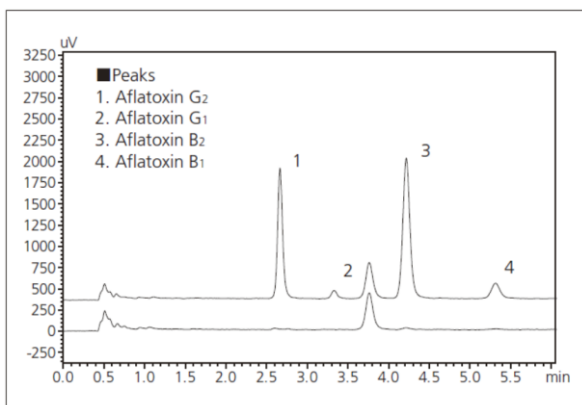


그림 8. 직접검출을 이용한 갈근탕 크로마토그램-UHPLC 분석 (위: 표준용액 첨가, 아래: 표준용액 미첨가)

갈근탕의 분석 예는 그림 8과 같으며, 분석조건은 표 2와 같다. 면역친화성 컬럼을 사용했음에도 불구하고 아플라톡신 G₁과 B₂ 사이에서 불순물 피크가 용출되었지만, 두 개의 아플라톡신 피크와는 완전히 분리되었으며, 세척 공정을 추가하고도 12 분 만에 분석이 완료되었다.

주의: 아플라톡신은 자외선에 의해 분해되며 용액상태에서 유리 표면에 흡착된다. 따라서 실제 분석에는 세척된 저흡착 갈색 유리 바이알을 사용하였다.

■ 참고문헌

- 1) "Handling of Foods Containing Aflatoxins" (Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, Dept. of Food Safety Notification 0331 No. 5, March 31, 2011)
- 2) "Test Method for Total Aflatoxins" (Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, Dept. of Food Safety Notification 0816 No. 2, August 16, 2011)