

수입농수축산물과 가공식품중 유해잔류물질의
분석기술에 관한 연구

A Study on the Analytical Methods of
Detrimental Residues in Imported Foodstuffs

연 구 기 관

한국식품개발연구원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “수입농수축산물과 가공식품중 유해잔류물질의 분석기술에 관한 연구” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1991. 12. .

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

연구책임자 : 허우덕 (한국식품개발연구원 선임연구원)

참여연구원 : 남영중 (한국식품개발연구원 책임연구원)

석호문 (한국식품개발연구원 책임연구원)

하재호 (한국식품개발연구원 선임연구원)

박용곤 (한국식품개발연구원 선임연구원)

요 약 문

I. 제 목

수입농수축산물과 가공식품중 유해잔류물질의 분석기술에 관한 연구

II. 연구개발 목적및 중요성

극미량성분의 분석은 풍부한 경험과 정밀분석기기의 완벽한 작동에 의해서만 가능하다. 그러나 우리나라에서는 이러한 정밀분석 분야에 대한 인식도가 낮아 누구나 분석이 가능한 것으로 취급되고 있으며 분석기관 간의 서로 다른 분석결과로 인하여 해마다 분쟁의 소지가 되고 있다. 뿐만 아니라 각 분석기관간의 연계된 분석망도 설정되지 않아 각 기관별 분석기술 수준의 차이가 크고 분석치의 정확성에 대한 판단기준도 전혀 설정되지 않은 실정이다.

또한 UR 협상의 타결시에 급증될 것으로 예상되는 농수축산물과 그 가공품의 안전성과 관련하여 잔류되는 유해물질의 정밀분석에 대해서도 체계적인 연구가 활발히 이루어지지 않고 있으며 현재도 많은 물량이 정밀분석을 거치지 않고 피상적인 관능검사에 의해 통관되고 있으며 이들 물질을 분석할 수 있는 장비와 기술 역시 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 일차적으로 각 유해물질의 분석방법을 비교검토하고 분석기술을 숙지하며 반복되는 실험을 통하여 식품의 안전성을 체계적으로 분석, 평가할 수 있는 역량을 습득하는데 그 목적과 중요성을 두었다. 차후 이와같은 역량이 확보된 후에는 수입 농수축산물과 가공품에 대한 유해 잔류물질의 감시체계를 구축하기위해서 관련 유관 연구소나 학계 및 산업계와의 연계된 분석망을 구성하고 분석기술의 정확도와 정밀도를 향상시키기 위해 정기적으로 실험실간의 비교분석결과에 대한 평가를 실시하는 종합 모니터링 시스템의 운영을 추구해야 될 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 잔류농약: malathion, parathion 외 5종의 유기인계 및 유기염소계 농약을 대상으로 Capillary Gas Chromatograph(GC)로써 분석하는 방법을 정립.
- 성장촉진물질: Diethylstilbestrol(DES) 외 2종에 대하여 Gas Chromatograph-Mass Selective Detector (GC-MSD)를 사용하여 Selected Ion Monitoring (SIM) mode로 분석하는 방법을 정립.
- aflatoxin: High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)로써 분석하는 방법을 정립.
- 항생물질: 아미노글리코사이드계 3종을 대상으로 생물학적 분석방법을 정립.

IV. 연구결과

식품에 잔류되는 여러 유해잔류물질에 관한 자료를 수집하고 그 자료를 토대로 하여 수입되는 농수축산물과 가공식품에 잔류되는 유해물질의 분석방법에 대하여 검토하였다. 분석방법으로서 GC-ECD, GC-MSD, HPLC, Bioassay 등의 방법을 이용하였다. 수입된 농수축산물 10종과 가공식품 25종을 수거하여 정립된 분석방법에 따라서 분석을 하였으며 그 결과 분석 대상이된 수입 농수축산물과 가공식품 중에서 대상 유해물질이 검출되지는 않았으며 각각의 유해물질에 대한 분석방법을 검토한 결과 다음과 같았다.

1) 잔류농약의 분석방법

곡류, 야채, 과일 등에 잔존 가능성이 있는 malathion, parathion, fenitrothion, fenthion, isopropyl carbamate (CIPC), carbaryl 등에 대한 분석방법을 정립하였다. 사용한 기기는 전자포획검출기(ECD)가 부착된 GC를 사용하였으며 충전칼럼과 모세관칼럼으로 분석한 결과 충전칼럼의 경우는 모세관칼럼에 비하여 분리능이 좋지 않아 시료중의 불순물의 방해에 의하여 정량 및 정성분석에 어려움이 있었다. 그러나 모세관칼럼을 사용한 경우는 분리능이 우수하여 정성이 용이하였으며 내부표준물질법으로서

정량이 가능하였다. 모세관칼럼을 사용하여 분석할 경우 칼럼은 극성이 비교적 높은 SPB608(0.32mm i.d. x 30m in length, Supelco Co.)을 사용하였으며 칼럼온도는 190°C에서 230°C까지 분당 2.5°C씩 승온하여 분석하였고 주입기와 검출기의 온도는 각각 235°C, 290°C로 조절하고 운반기체는 질소를 사용하였을 때 분석이 용이하였다.

2) 축산물중 합성성장촉진 홀몬제의 분석

소나 양의 성장을 촉진하기 위하여 사용되는 DES, hexestrol 및 β -estradiol의 잔존 여부를 분석할 수 있는 방법을 정립하였다. 기기는 MSD가 부착된 GC를 사용하였고 분석대상이 되는 성장촉진홀몬제를 시료에 주입한 다음 질량스펙트럼을 얻었다. 정량과 정성분석을 위해 selective ion monitoring법을 이용하였다. DES의 경우 m/z 412, 397, 383을 선택하였고 hexestrol의 경우 m/z 414, 399, 207를, β -estradiol의 경우 m/z 416, 401, 285을 선택하였다. 그 결과 5ppb 수준으로 육에 spiking을 하였을 때 검출이 가능하였으며 수입육 4종에 대하여 분석한 결과 대상 성분이 검출되지 않았다.

3) Aflatoxin의 검출과 분석

Aflatoxin을 분석하는 방법으로는 생물학적인 방법, TLC를 이용하는 방법, GC-MS나 HPLC 등과 같은 정밀기기를 사용하여 분석하는 방법이 있다. 본 연구에서는 HPLC로써 aflatoxin을 분석하는 방법에 대하여 연구하였다. HPLC를 사용하여 aflatoxin을 분석할 때 시료 전처리과정 중 Sep-Pak silica cartridge를 사용하여 방해물질을 제거하였고 칼럼은 μ -Bondapak C₁₈, 이동상은 H₂O/CH₃CN/MeOH(60/30/10, v/v/v)를 사용하였다. 이동상의 유속은 0.7ml/min, 검출기는 형광검출기(excitation 365nm, emission 425nm)를 사용하였다. 이와 같은 조건으로 곡류 중에 함유되어 있는 aflatoxin을 분석하였을 때 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂의 경우 5ng 까지 검출이 가능하였으며 수입육수수외 3종의 곡류에 대하여 분석한 결과 aflatoxin은 검출되지 않았다.

4) Bioassay에 의한 식육중 항생물질의 분석

식육중에 잔류되는 항생물질 중 아미노글리코사이드계인 streptomycin, kanamycin, neomycin에 대한 생물학적인 분석 방법에 대하여 검토하였다. 시험균으로서 streptomycin과 kanamycin의 경우 *Bacillus subtilis*를 사용하였고 neomycin의 경우 *Staphylococcus epidermidis*를 사용하였다. 대상 농약의 잔류 여부를 판정하기 위하여 배지에서 각각의 균주를 증식시켰을 때 12mm이상의 뚜렷한 발육 억제대가 나타난 것을 양성으로 판정하였다. 그 결과 대상시료에 있어 항생물질은 음성으로 나타났다.

V. 연구결과활용에 대한 건의

미량성분 분석기술에 관한 연구는 국내의 경우 장비의 부족과 전문인력의 부족으로 그 연구가 미미한 실정이다. 정밀분석 분야는 많은 경험과 충분한 정보의 교환, 최신 장비의 설치 등이 필수적인 분야이다. 고도 산업화 사회에 진입되는 과정에 있는 우리나라에 있어 이 분야에 대한 연구의 지원이 미약하여 고도정밀기기와 연구인력의 확충을 위한 정부의 지속적인 지원이 절실히 요구된다.

본 연구에서는 일차적으로 각 유해물질의 분석방법을 비교검토하고 분석기술을 숙지하여 반복되는 실험을 통한 식품의 안전성을 체계적으로 분석, 평가할 수 있는 역량을 습득하는데 그 목적을 두었다. 이 분석방법의 정립으로 UR협상의 타결로 많은 양의 수입이 예상되는 농수축산물과 가공식품에 잔류되는 유해잔류물질을 사전 검색할 수 있는 기술을 축적하였다.

앞으로 수입되는 모든 농수축산물과 가공식품에 대하여 철저한 검사를 실시해야하며 이들의 식품위생학적 검사는 현재와 같이 피상적인 관능검사에 의존하지말고 유해잔류물질의 감시체계를 구축하기위해 관련 유관 연구소나 학계 및 산업계와의 연계된 분석망을 구성하는 것을 강력히 추천한다. 또한 구성기관의 분석기술에 대한 정확도와 정밀도를 향상시키기 위해 정기적으로 실험실간의 비교 분석결과에 대한 평가를 실시해야할 것이다. 한편 본 연구과정에서 습득된 분석기술은 정밀기기분석 분야와 식품화학

의 기초적인 기술로 장차 신기능성이나 신소재에 관련된 식품연구분야에도 커다란 기여를 할수 있을 것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title

A Study on the Analytical Methods of Detrimental Residues in Imported Foodstuffs

II. Objective and Significance

The use of agricultural chemicals has been frequently found in agriculture to meet the requirement of mass production. The continuous use of synthetic chemicals in agricultural products may cause accumulation of residues in animal tissues by the contaminated feed for them. The major types of organic chemicals that contaminate the food include the pesticides, drugs, antibiotics as well as some micotoxins.

The level of residues in food are very low, however, the advanced analytical equipments such as a gas chromatograph and a mass spectrometer are necessarily required to identify and to determine the residue. In addition, the trained manpower with lots of experienced in the field of analytical chemistry are also required to execute the projects related to the food safety successfully.

The objectives of the present study lies on the establishment of analytical methods for the residues in the imported foodstuffs to determine the safety level. With the accumulation of data obtained from the study the networks of monitoring system for the detrimental residues level in the imported products should be established with the related organizations by exchange of various informations on the

imported products.

III. Scope

The following studies were carried to establish the analytical methods of detrimental residues in imported foodstuffs.

1. Analytical methods for the organophosphorus pesticides by the capillary GC equipped with electron capture detector.
2. Analytical methods for the hormones in the animal tissues by the selective ion monitoring mode with GC-MSD
3. Analytical methods for the aflatoxin by the HPLC
4. Analytical methods for the antibiotics by bioassay

IV. Results and Discussion

1. The optimum operating condition of GC to analyze the organophosphorus pesticides may vary with the target substances. In case of using capillary column the injector and detector ports were set at 235°C and 270°C. SPB 608 capillary column was used. Nitrogen was supplied 2ml/min as a carrier gas and 25ml/min for make-up gas. The initial oven temperature, 190°C, was held for 5min and then increased to 230°C at the rate of 2cc/min. With the condition established the residues in the imported foodstuffs were analyzed and no suspected substances were detected.

2. GC-MSD was used to analyze the hormones such as DES, β -estradiol, and hexestrol. m/z 412, 397, 383 were selected for DES, 414, 399, 207 for hexestrol, 416, 401, 285 for β -estradiol to produce total ion intensity chromatogram. Analytical condition of GC

were 280°C for injector, 300°C for interface. Initial oven temperature was 100°C increased to 300°C at the ratio of 20°C per minute. Hydrogen was used as a carrier gas, HP-1 as capillary column. With the analytical conditions no hormone suspected were detected.

3. As for antibiotics *Bacillus subtilis* was used as experimental microorganism for streptomycin and kanamycin and *Staphylococcus epidermidis* for neomycin. The samples broader than the 12mm in the restrict area of microorganism growth were determined to be positive. As the result of the bioassay no samples were positive.

4. The analytical methods of aflatoxin was established by using HPLC. Sep-Pak silica cartridge was used to remove impurities in crops and feeds and reverse phase column was used. Water/ acetonitrile/methanol(6:3:1,v/v/v) was used as the eluent, fluorescence (excitation 365nm, emission 425nm) to detect. Flow rate was adjusted to 7ml/min, 5ng of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in foodstuffs and feed could be detected with the conditions presented above. The analysis results showed that no samples analyzed contained the aflatoxins.

CONTENTS

1. The analytical methods of pesticides in the imported agricultural products	1
1) Analytical method of pesticides and their properties	2
2) Multianalytical method of pesticides	24
2. The analytical methods of hormone in meats	38
1) Materials	38
2) Reagents and Solvents	38
3) Methods	39
4) Analytical conditions of GC-MSD	39
5) Analysis of samples	40
3. The Analytical methods of antibiological substances in meats	46
1) Principles	46
2) Reagents	46
3) Preparation of buffer solution	47
4) Apparatus	48
5) Preparation of test microorganism and plate	49
6) Analysis of samples	49
4. The analytical methods of aflatoxins	52
1) Introduction	52
2) Structure and chemical properties	53
3) Biological activity	64
4) Detection and assay	64
5) Recommendation	72
References	75

목 차

제 1장 각종 농약의 분석	1
제 1절 각종농약의 성질과 분석방법	2
제 2절 유기염소계 및 유기인계 농약의 다중 분석법	24
제 2장 합성성장촉진 홀몬제의 분석	38
제 1절 재료	38
제 2절 시약 및 용매	38
제 3절 실험방법	39
제 4절 GC-MSD의 조작조건	39
제 5절 시료의 분석	40
제 3장 Bioassay 법에 의한 식육종의 항생물질의 분석	46
제 1절 원리	46
제 2절 시약	46
제 3절 완충용액의 제조	47
제 4절 기구	48
제 5절 사용균주, 배지 및 배양조건	49
제 6절 시료의 분석	49
제 4장 Aflatoxin의 분석	52
제 1절 Aflatoxin의 개요	52
제 2절 Aflatoxin의 구조와 화학적 성질	53
제 3절 생리적인 활성	64

제 4절 Aflatoxin의 검출과 분석방법	64
제 5절 Aflatoxin에 대한 대책	72
문헌	75

제 1장 각종 농약의 분석

병충해 및 잡초의 피해로부터 농작물을 보호하여 증산의 수단으로 사용되고 있는 농약은 그 효과를 발휘하기 위하여 생물학적인 활성이 있어야 하기 때문에 위험요소 또한 배제할 수 없다. 따라서 안전성의 확립이 무엇보다 중요하다. 농작물에 살포된 농약은 자연적인 증발, 빗물에 의한 수세, 햇빛에 의한 분해 등과 같은 환경적인 요인과 식물체내의 대사, 작물의 성장에 따른 희석 등으로 농약을 살포한 직후 급속히 감소된다. 그러나 일부 농약은 적은 양이지만 살포된 농작물에 잔류되어 이를 섭취한 사람에게 급성 또는 만성적인 중독 현상을 일으킨다.

수입 농수축산물의 경우 국내의 생산물과는 달리 그 생산지의 기후풍토, 생산상황, 가공보관, 수송의 상황이 명확하지 않은 점이 많다. 따라서 이들 수입식품에 대한 불안이 높고 수입자유화 조치에 따라 대량의 가공식품이 수입되고 있어 이들 수입농수축산물과 가공식품의 안전성에 대한 지속적인 감시가 요구된다.

살포된 농약은 여러 요인에 의하여 잔류되는 양에 급속히 감소되므로 원료 농수축산물과 가공품에 잔류되는 양은 극소량으로 이를 분석하는데는 고도의 정밀기와 기술이 요구된다. 따라서 본연구에서는 살포된 후 지속력이 비교적 강하며 안전성에 문제가 되는 몇 가지 농약에 대하여 이들이 잔류되는 정도를 분석할 수 있는 기술에 대하여 검토하였다.

제 1절 각종 농약의 성질과 분석 방법

1. Fenitrothion : O,O-Dimethyl-O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate $C_9H_{12}O_5NPS$ (Mol. wt. 277.2)

가. 생물학적 성질

Fenitrothion은 다목적용 살충제로 유럽, 동부파키스탄, 동아프리카, 중국, 뉴질랜드, 캐나다, 브라질, 일본 등에서 사용되고 있다. 이것은 피부에 접촉되거나 섭취하였을때 독성을 나타내며 과실, 곡류, 쌀, 면실 등과 같은 농작물의 구충제로서 광범위하게 사용된다. 이것은 모기, 파리, 바퀴벌레, 이, 빈대 등과 같은 해충에 대하여 매우 효과가 뛰어나다.

Methyl parathion과 구조가 비슷하지만 포유동물에 대하여 독성이 낮다. 쥐에 대한 경구 LD_{50} 은 약 1300mg/kg이다.

나. 물리적 성질

Fenitrothion은 옅은 황색이며 물에는 불용이고 알콜, 에텔, 케톤, 지방족 또는 방향족 탄수화물에 녹는다.

1)Melting point : $0.3^{\circ}C$

2)Boiling point : $140^{\circ}C$

3) d_4^{25} : 1.3227

4) n_D^{25} : 1.5528

다. 화학적 성질

Fenitrothion은 3-methyl-4-nitrophenol과 O,O-dimethylphosphorochlori-dothioate를 유기용매중에서 반응시키면 합성이 된다. 약산성 중에서는 안정하지만 알칼리 조건에서는 불안정하다.

라. 잔류량 분석

Fenitrothion은 색도계나 GC를 사용하여 분석한다. 색도계를 사용한 분석 방법은 Averell과 Norris¹⁾에 의하여 개발되었는데 알칼리 조건하에서

가수분해한 다음 3-methyl-4-nitrophenol을 측정한다. 이 방법의 측정한계는 0.05ppm이다. GC를 사용하는 경우 이 보다 간단하고 신뢰도가 좋은 결과를 얻을 수 있다. GC에 의한 방법은 0.01-0.001ppm까지 측정 가능하다.

마. GC에 의한 분석방법

1) 원리 : Fenitrothion은 flame photometric detector (FPD)가 장착된 GC를 사용하여 분석할 수 있다. 이 검출기는 분자형태의 인에 대하여 매우 고감도와 선택성을 나타내므로 매우 소량으로 분석이 가능하며 정제과정이 거의 필요가 없다.

2) 실험 방법

A. 시료의 처리

a. 수분을 함유한 시료

파쇄한 과실과 야채를 Waring blender에 50g취한다. 여기에 물 50ml를 가하고 균질화한다. 25ml의 methanol을 가하여 고속으로 갈아준다. 다음으로 100ml의 acetonitrile을 가하여 1분간 균질화 한다. Buchner funnel에 20g의 Hyflo Super-Cel 20g을 깔고 진공펌프로 여과한다. 여과 후 남은 잔사에 대하여 water/methanol/acetonitrile (2:1:4, v/v/v) 혼합용액 80ml로 재추출한 다음 여액을 합한다. 여액에 대하여 30g의 sodium chloride와 150ml의 chloroform을 가하고 5분간 흔들여 준다. 하층부에 있는 chloroform을 받고 수용액층에 100ml의 chloroform을 가하고 재추출한다. Chloroform층을 모은 다음 sodium sulfate를 가하여 탈수시키고 여과한 다음 40℃ 수조상에서 진공펌프로 용매를 제거한다.

b. 건조 시료

시료 50g을 취하여 파쇄한다. 이것을 500ml의 삼각 플라스크에 옮기고 150ml의 benzene과 40g의 sodium sulfate를 가하여 실온에서 하루 밤 방치시킨다. Buchner funnel에서 진공펌프를 사용하여 여과한다. 남은 잔사는 100ml의 benzene으로 재추출한다. 용매층을 모두 모아서 40℃의

수조상에서 감압농축한다. 쌀의 경우는 용매로서 benzene을 사용하지만 대두의 경우는 benzene 대신에 acetonitrile을 사용한다.

B. 정제 과정

신선한 과실이나 야채의 경우는 일반적으로 정제과정이 필요없다. 우유나 기름이 함유된 종실의 경우 benzene과 acetonitrile를 사용하여 분별한다. 분별하는 방법으로 농축물에 25ml의 benzene을 가하여 녹이고 25ml의 acetonitrile을 가하여 5분간 흔들여 준다. Acetonitrile층을 수거하고 남은 benzene층에 15ml의 acetonitrile을 가하여 재추출한다.

LC로서 정제하는 방법은 다음과 같다. 120°C에서 2시간 동안 예비활성화시킨 10g의 silica gel과 Hyflo Super-Cel을 benzene중에서 slurry로 만든 다음 이것을 칼람으로 옮긴다. 시료로부터 농축한 benzene 추출물 5ml을 흡착칼람의 상부에 가만히 붓는다. 농축물을 칼람에 통과시킨다. 110ml의 benzene을 1ml/min의 속도로 용출시키고 최초에 용출된 50ml은 버리고 40ml의 용출액을 받는다.

Florisil을 사용하여 LC로 정제할 수도 있다. 120°C에서 예비활성화시킨 Florisil을 benzene/ethylacetate (10:1)혼합액 중에서 slurry로 만든 다음 칼람으로 옮기고 1g의 sodium sulfate를 칼람의 상부를 채운다. 농축된 시료에 5ml의 benzene/ethylacetate 혼합액을 가하여 녹이고 칼람으로 옮긴다. 용매혼합액을 가하여 최초의 20ml은 버리고나 다음 50ml을 포집한다. 용출액은 40°C의 수조상에서 진공농축하고 30ml의 petroleum ether로 녹인다. 30ml과 10ml의 acetonitrile로 추출한 다음 acetonitrile을 모아 40°C 수조상에서 진공농축한다.

C. Gas chromatography

Column : 5% DC-200 (Chromosorb W)

10% DC QF-1 (Chromosorb W)

Carrier : Helium, 50ml/min

Hydrogen : 18ml/min

Air : 280ml/min

Temperature

Column oven : 210°C

Injection port : 210°C

Detector port : 210°C

Electrometer range setting : x 10²

Attenuation : 0.05 - 6.4

정제와 농축과정을 거친 분석대상 시료를 소량의 acetone에 녹인 다음 마이크로주사기를 사용하여 GC에 주입한다. 주입하는 양은 5 μ l이고 정성과 정량을 위하여 표준물질과 column내에서 머무름시간과 피크면적을 측정하여 시료중의 잔류량을 분석한다.

D. 계산

시료 중의 Fenitrothion 함량을 계산하기 위하여 시료에 함유된 잔류량과 비슷한 양의 표준물질을 GC에 주입한 다음 아래의 계산식으로 함량을 측정하였다.

$$\text{ppm} = \frac{\text{시료의 면적}}{\text{표준물질의 면적}} \times \frac{\text{시료의 희석배수}}{\text{표준물질의 희석배수}} \\ \times \frac{\text{표준물질의 주입량}(\mu\text{g})}{\text{시료의 무게}(\text{g})} \times \frac{\text{최종부피}(\mu\text{l})}{\text{주입한 시료의 부피}(\mu\text{l})}$$

E. 회수율

GC에서 얻어진 회수율은 Table 1과 같다.

Table 1. Recovery of fenitrothion by gas chromatography

농작물	Fenitrothion 첨가량(ppm)	회수율 평균치(%)
Moist sample		
사과	0.1 (7) ^a	80
배	0.1 (6)	96
감자	0.01 (3)	96
토마토	0.1 (5)	82
오이	0.2 (5)	97
딸기	0.2 (6)	97
파	0.1 (10)	97
쌀	0.5 (5)	98
Soy bean	0.2 (2)	98
	0.02 (3)	98
Green tea	0.5 (5)	92

^a : 시료수

Flame photometric detector(FPD)를 사용한 경우 fenitrothion에 대한 감도는 10-12ng의 양을 검출할 수 있다. GC를 사용하여 분석할 경우 감도는 시료의 양에 따라서 달라진다. 대체적으로 FPD를 사용하는 경우 약 0.001ppm 수준까지 검출이 가능하다.

시료 중에 함유된 fenitrothion의 양은 매우 적기 때문에 이것을 추출하는 과정은 매우 중요하다. 위의 방법에 언급된 용매 이외에 몇몇 다른 용매를 사용하여 fenitrothion을 추출할 수 있다. 수분 함량이 높은 수확물의 경우 acetone, acetonitrile, ethanol을 사용하여 추출할 수 있고

chloroform:methanol 혼합용매 (9:1, v/v)로 Soxhlet장치에서 추출하여도 회수율은 좋다. 우유나 육류의 경우는 극성용매와 비극성용매의 혼합용매인 acetonitrile-methylenechloride, ethanol-n-hexane, ethanol-benzene과 같은 것을 사용할 수도 있다. 수분함량이 낮고 유지를 함유하는 시료의 경우는 n-hexane, petroleum ether, chloroform 등을 사용하면 된다.

GC에서 고정상으로 DEGS, SE-30, DC-200, OV-17을 사용하면 된다. 그러나 위의 고정상을 사용하여 분석하는 경우는 fenitrothion 이외에 malathion, methyl parathion과 같은 유기인계 농약이 비슷한 머무름시간에 용출되기 때문에 분리에 어려움이 있을 수 있다. 그러나 ethyl parathion, diazinon, fenthion dimethoate, dichlorvos, trichlorfon, EPN 등은 머무름시간이 다르기 때문에 분리가 가능하다. Electron capture detector(ECD)를 사용하여 유기인계 농약을 분석하는 경우 fenitrothion을 분석할 수 있으나 감도가 낮기 때문에 충분한 정제과정을 거쳐야 한다.

2. Fenthion (ENTEX, LEBAYCID, TIGUVON, Baytex, Mercaptophos, Bayer 29493, S-1752) : O,O-Dimethyl O-[4-(methylthio)-m-tolyl] phosphorothioate, $C_{10}H_{15}O_3S_2P$ (Mol. wt. 278.3)

가. 생물학적 성질

Fenthion은 광범위 살충제이다. 잔류지속성이 길지만 포유류에 대한 독성이 낮다. 대상 해충은 파리, 모기, 벼룩, 빈대, 이 등이다.

쥐에 대한 경구 LD_{50} 은 수컷의 경우 310mg/kg, 암컷의 경우 190mg/kg이다. 쥐의 만성중독에 대한 실험결과 5ppm 까지는 영향이 없었다. Fenthion은 많은 양을 주었을때 천천히 중독 징후가 나타나고 그 중독현상은 며칠 간 계속된다고 한다.

나. 물리적 성질

Fenthion은 갈색의 액체로서 물에는 녹지않고 유기용매에 녹는다.

1)Melting point : -25°C

2)Boiling point : 105°C at 0.01mmHg

3)Specific gravity : 1.245

다. 화학적 성질

Fenthion은 O,O-dimethyl thiophosphoryl chloride와 4-methylthio-m-cresol를 반응시켜 합성한다. 이것은 알칼리에 의하여 가수분해된다.

라. 분석방법

Anderson 등(1966)²⁾은 식물과 동물의 조직에 함유되어 있는 fenthion과 그 유도체를 O-analog sulfone으로 산화시킨 다음 대응하는 phenol로 가수분해시켜 분석하였다. Phenol를 브롬화와 아세틸화시킨 다음 ECD-GC로 분석하였다. 이 방법으로 분석하는 경우 0.1ppm 수준의 감도를 지닌다. Suffet 등(1967)³⁾은 fenthion을 GC로 분석하는 방법에 대하여 기술하였다. 즉, fenthion의 O-analog와 페놀가수분해물을 FID와 ECD를 사용하여 분석하였다.

1) Termionic Emission Gas Chromatography에 의한 분석

A. 원리

시료에서 화합물을 추출하고 이것을 oxygen analog sulfone으로 산화시킨 다음 thermionic emission flame detector를 사용하여 분석한다. 이 방법으로 계란과 우유를 분석할 경우 0.005ppm 수준까지 검출할 수 있고 육조직과 쌀에서 0.05ppm 수준까지 검출할 수 있다.

B. 계란과 우유 중의 잔류량 분석

i. 초기 추출

100g의 우유 또는 계란 두개를 균질기에 취한다. 30g의 Super-Cel과 400ml의 acetone을 가하고 고속으로 3분간 균질화한다. Watman no. 42 여과지 위에 Hyflo Super-Cel 층을 1/8" 두께로 깔고 진공하에서 여과한다.

남은 잔사에 대하여 재추출을 실시하고 여액을 1000ml의 분액 여두에 옮긴다. 분액여두를 30초간 진탕하고 층이 분리되도록 한다. 10g의 Super-Cel이 들어있는 Watman no.12여과지로 여과하고 1000ml의 환저플라스크에 옮긴다. Super-Cel은 25ml의 chloroform으로 수세하고 용매층을 모아 40°C에서 농축한다.

ii. 유지제거(Acetonitrile-Skellysolve B 분획)

(a) 우유

초기추출한 시료를 100ml의 Skellysolve B가 들어있는 분액여두로 옮긴다. 분액여두를 30초간 진탕한 다음 층을 분리시키고 수층에 남은 잔류물은 Skellysolve B (200ml)로 재추출한다. Acetonitrile 층(300ml)을 모두 합하여 40°C에서 건조시킨 후 산화과정을 진행한다.

(b) 계란

초기추출한 시료를 200ml의 Skellysolve B가 들어있는 500ml의 분액여두에 옮긴다. 분액여두를 30초간 진탕한 다음 층을 분리시키고 수층에 남은 잔류물은 Skellysolve B(400ml)로 재추출한다. Acetonitrile 층(600ml)을 모두 합하여 40°C에서 건조시킨 후 산화과정을 진행한다.

iii. Oxygen Analog Sulfone 산화

Acetonitrile-Skellysolve B 분획에서 얻은 잔류물에 10ml의 m-chloroperbenzoic acid 시약 (10% w/v in isopropyl ether)을 가한다. 시료를 실온에서 30분간 방치시킨다. 이때 45분 이상 산화제와 접촉되지 않도록 한다. 10ml의 isopropyl ether를 가하고 시료를 125ml의 원심분리용 분액여두로 옮긴다. 플라스크는 80ml의 2.0N HCl로 수세하고 수세액을 분액여두에 합한다. 분액여두를 30초간 진탕하고 용매층을 취하여 20ml의 isopropyl ether가 들어있는 125ml의 분액여두로 옮긴다. 용매층을 원심분리하여 모은 다음 수층에 200ml의 chloroform으로 재추출하고 추출된 잔류물을 모아 건조시킨다.

iv. GC에 의한 시료의 분석

추출한 시료를 기류하에서 건조시킨 다음 2.0ml의 acetone으로 녹인다. 표준물질과 시료 8 μ l를 GC에 주입한다. Fenthion의 정성과 정량은 표준물질과 시료의 머무름시간과 피크의 면적을 비교하여 실시한다.

Column : 10% DC-200 and 0.2% QF-1 (16" x 3mm i.d. on 80-100 mesh Gas Chrom Q)

Carrier gas : Nitrogen, 35ml/min

Detector : Potassium chloride thermionin flame emission

Hydrogen flow : 35ml/min

Air flow : 425ml/min

Temperature

Column oven : 210°C

Injection port : 225°C

Detection port : 240°C

Electrometer range : 100

Attenuation : 1

v. 계산

시료중에 함유된 fenthion의 함량을 계산하는 방법은 아래와 같다.

$$\text{ppm} = \frac{\text{시료의 면적}}{\text{표준물질의 면적}} \times \frac{\text{시료의 희석배수}}{\text{표준물질의 희석배수}} \\ \times \frac{\text{표준물질의 주입량}(\mu\text{g})}{\text{시료의 무게}(\text{g})} \times \frac{\text{최종부피}(\mu\text{l})}{\text{주입한 시료의 부피}(\mu\text{l})}$$

이 방법으로 분석할 수 있는 것은 fenthion 뿐만 아니라 그 유도체들의 분석에도 이용된다. 산화과정을 거친 경우 감도와 특이성이 현저히 증가한

다. 검출기에 대한 response는 0.75ng에서 200ng까지 직선적이고 시료의 양과 회석배수를 적절히 조절한 경우 0.002ppm에서 0.500ppm 가지 직선적인 response를 보이고 0.500ppm 이상의 경우는 회석이 필요하다.

3. Malathion : S-(1,2-Dicarbethoxyethyl) O,O-dimethyl phosphorodithioate, C₁₀H₁₉O₆PS₂ (Mol. wt. 330.4)

가. 생물학적 성질

Malathion은 여러가지 종류의 벌레를 죽인다. 이것은 주로 접촉성살충제로써 작용한다. 쥐에 대한 급성경구독성은 LD₅₀이 약 2500mg/kg이다.

나. 물리적 성질

- 1) Melting point : 3.70°C
- 2) Boiling point : 156 - 157°C / 0.7 mm Hg
- 3) Solubility : 25°C의 물에 약 145ppm이 녹으며 대부분의 알콜, 에스터, 케톤 및 방향족용매에 완전히 녹는다.
- 4) Vapour pressure : 0.00004 mm Hg / 30°C
- 5) Refractive index : n_D25 1.4985
- 6) Specific gravity : 1.2315/25°C
- 7) Viscosity : 25°C, 36.78 cp; 40°C, 17.57 cp

다. 화학적 성질

Malathion은 산 보다는 알칼리 존재하에서 더 급속하게 가수분해된다. 적당한 조건하에서 알칼리가수분해를 하면 O,O-dimethyl phosphorodithioate 염을 정량적으로 생성한다.

라. 잔류량 분석

1) 원리

Malathion 잔류물을 chloroform을 사용하여 추출한다. 적절한 정제과

정을 거치고 selective phosphorus-sensitive detector가 부착된 GLC로써 분석한다.

2) Gas Chromatograph : Glass column 상에서 분석하며 on-column injection system 이 반드시 있어야 한다.

- Oven temperature : 165°C
- Injector : 280°C
- Detector : 210°C
- Helium : 92ml / min
- Hydrogen : 29ml / min
- Air : 215ml / min
- Range : 10
- Retention time : 2.4min
- Detector : 526nm phosphorus filter가 장착된 flame photometric detector 또는 alkali flame ionization detector
- Column : 60cm borosilicate glass tube (4mm i.d., 6mm o.d., 1% Reoplex 400 on Gas Chrom Q, 60-80 mesh)
- Stock solution : 50.0±0.5mg의 표준 malathion을 50ml의 정용플라스크에 정확히 취하여 acetone으로 표정한다. working solution은 이중 5ml을 50ml의 정용플라스크에 취하여 표정하여 사용한다.

3) Sample treatment

A. 수분이 많은 과실 야채 및 잎

(a) 시료를 잘 혼합한 후 드라이아이스와 함께 혼합하여 예냉한 세절기로써 세절하고 동결고에 보관한다.

(b) 세절한 시료 40g을 취하여 32온스의 narrow-mouth bottle에 옮기고 여기에 400ml의 chloroform을 가하여 두껍을 잘 닫고 하룻밤 세게 흔들어준다.

(c) 추출물을 600ml fritted funnel로 여과하고 약 10분간 정체시킨다.

(d) 100ml을 250ml의 pear-shape flask로 옮긴 후 농축건고한다.

(e) 아래의 (j)번 항과 같이 한다.

B.기름이 많은 종실, 견과류, 곡물, 건초 등

(a)-(d)는 위와 같음.

(e) hexane 50ml에 잔류물을 녹이고 여기에 100ml의 acetonitrile을 가한 다음 이 혼합물을 500ml의 분액여두로 옮긴다. 약 60초간 흔들어주고 층이 분리될 때 까지 기다린 다음 acetonitrile층(lower)을 취하여 500ml의 평저플라스크로 옮긴다. hexane층을 추가의 100ml acetonitrile로 추출하고 acetonitrile을 합하여 농축건고한다.

(f) acetone 25ml을 잔류물에 가하고 플라스크를 약 5분간 적당히 흔들어준다. 잔류물이 기벽에 붙어있지 않고 완전히 부유되도록 한다. 플라스크에 precipitating solution 50ml을 가하고 1분간 섞는다. 30분간 정치시키면서 때때로 섞어준다.

(g) 6-10mm 두께의 Celite로 예비도포된 60ml medium-porosity Buchner filter funnel에 흡입여과를 한다. 플라스크는 추가의 50ml의 침전용액으로 수세하고 수세한 용액을 Celite를 통하여 여과한다.

(h) 여액과 수세액을 합하여 250ml의 분액여두로 옮기고 50ml의 chloroform을 가한다. 60초간 흔들어 준다.

(i) chloroform층을 250ml의 pear-shape flask에 취하고 aqueous acid phase를 50ml의 chloroform으로 두번 재추출하고 동일한 flask에 모은다.

(j) rotary film evaporator를 사용하여 용액을 35°C이하의 수조에서 농축한다. 이 때 용매가 증발된 후에도 계속 농축을 하지 않도록 주의한다.

(k) GC에는 1ml의 acetone으로 녹인 후 주입한다.

4. Parathion (THIOPHOS, Niran, Alkron, Lethalaire Phoskil, Vapophos, Genithion, Penphos, Aphamite) : O,O-Diethyl-O-p-nitrophenyl phosphorothioate $C_{10}H_{14}O_5NPS$ (Mol. wt. 291.3)

가. 생물학적 성질

이 화합물은 여러종류의 해충에 활성을 지닌다. 급성경구독성 LD_{50} 은 약 4mg/kg이다.

나. 물리적 성질

1) Melting point : 6.0°C

2) Boiling point : 157 - 162°C at 0.6 mm Hg

3) Solubility : 25°C의 24ppm 정도 녹으며 방향족 용매, 저급알콜, 산, 에스터 및 염소화탄화수소에 녹고 제한적이지만 지방족 탄화수소에도 녹는다.

4) Vapour pressure : 0.03mm Hg at 24°C

5) Refractive index : n_{D25} 1.5367

6) Viscosity : 15.3 cp at 25°C

다. 화학적 성질

이 살충제는 중성과 산성에서는 매우 안정하고 알칼리에서는 가수분해된다. UV에 노출시키면 분해된다.

라. 분석방법

Parathion과 paraxon은 0.25% Epikote resin 1001 과 2.5% silicone elastomer E-301 (supported on 100-120 mesh Celite)로 된 칼람(125 x 0.4cm)에서 분석하며 질소는 시간당 6리터를 흘린다. 칼람오븐온도는 175°C로 하고 ECD를 사용한다(Dawson et al., 1964).

5. Carbaryl (Sevin, N-Methyl-1-naphthyl carbamate, N-methyl-1-naphthylurethane, "Experimental Insecticide 7744") :

1-Naphthyl N-Methylcarbamate, $C_{12}H_{11}O_2N$ (Mol. wt. 201.1)

가. 생물학적인 성질

Carbaryl은 잔류성이 좋고 신경계통에 활성을 약간 지니는 접촉성 살충제이다. 이것은 주로 면실벌레의 억제에 주로 사용하고 40종이상의 과실, 야채, 잎, 농산물에 사용할 수 있도록 등록되어 있다. 이것은 유기염소제나 유기인제에 저항성이 강한 벌레에 효과가 있고 식물의 성장이나 식품의 향에 영향을 미치지 않는다. 포유동물에게 먹이면 빠른 대사과정을 거쳐 우유로 분비된다. 이것의 사용은 동물먹이로 사용되는 농산물에 허용되고 가축이나 가금류의 구충제로 이용된다. 농산물에 대한 carbaryl의 잔류허용기준은 다소 높아서 약 10ppm정도이고 수확 직전에 살포가 허용된다.

carbaryl은 쥐에 대한 경구 급성 LD_{50} 이 560mg/kg이기 때문에 취급하기가 상대적으로 안전하다. 쥐에 대한 피부 LD_{50} 은 2000mg/kg이다. 쥐에게 200ppm의 수준으로 2년간 식이에 섞어 먹인 결과 해가 없었고 400ppm의 수준으로 먹었을 때도 거의 해가 없었다.

나. 물리적 성질

Carbaryl은 흰색의 결정성 고체이고 melting point가 $142^{\circ}C$ 이며 증기압은 $26^{\circ}C$ 에서 0.005 mm Hg이다. 이것은 분해되지 않고는 증류되지 않는다. Carbaryl은 물에 0.1% 이하가 녹는다. 그러나 극성이 높은 유기용매 dimethylformamide 과 dimethylsulfoxide 등에 녹고 일반적인 유기용매에 불용이다.

다. 화학적 성질

Carbaryl은 강하게 가열하면 1-naphthol 과 methyl isocyanate로 분해된다. 이것은 중성과 산성의 수용액 중에서 안정하다. 그러나 알칼리용액 조건에서 가수분해되어 1-naphthol, carbondioxide 및 methylamine을 형성

한다.

라. 분석방법

1) 원리

우유에서 pentene-ether로써 추출하고 acetonitrile로써 분배한다. 잔류물은 1-naphthol로 가수분해되고 이 중 일부를 trichloroacetylated시키고 다른 일부는 brominated 및 acetylated한다. 두가지 유도체는 ECD-GLC로써 분석하고 벌이나 벌의 꽃가루의 경우는 유도체를 만들기전에 정제를 한다.

2) 실험방법

⁹⁰Sr ECD가 장착된 GC로 분석하며 칼럼은 183cm x 0.4cm i.d. glass column packed with 7% DC-200 on 80-100mesh Gas Chrom Q을 사용한다.

Injector temperature	: 200°C
Detector	: 235°C
Column	: 190°C
Carrier	: N ₂ , 75-100ml/min

6. CIPC (Chloro-IPC, 3Cl-IPC) : Isopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate (C₁₀H₁₂O₂NCl, Mol.wt. 213.67)

가. 생물학적 성질

CIPC는 제초제로 피, 쇠비름 등과 같은 협엽식물에 대하여 뛰어난 효과가 있다. 이것은 감자를 저장하는 동안 발아를 억제하며 배의 경우 성장 초기에 이것을 살포하면 결실이 빈약해진다.

쥐에 대한 LD₅₀은 5 - 7.5ppm이며 만성독성은 비교적 낮다. 미국 FDA와 농무성에서는 감자에 대한 잔류허용량을 50ppm으로 정하고 있다.

나. 물리적 성질

- 1) Melting point : 38 - 40°C
- 2) Boiling point : 247°C (분해됨)
- 3) Specific gravity at 30°C : 1.180
- 4) Refractive index n_{20D} : 1.5395
- 5) Specific heat : 0.45 cal/g/°C
- 6) Flash point : 175°C
- 7) Fire point : 175°C
- 8) Vapor pressure, 25°C : 10^{-5} to 10^{-6} mmHg
- 9) Solubility in water at 25°C : 89ppm
- 10) Solubility in organic liquid : alcohol, hydrocarbons, chlorinated hydrocarbon, ketone, ester 무수암모니아 등에 녹는다.

다. 화학적 성질

CIPC를 합성하는 방법은 두가지가 있다. 그 하나는 isopropyl alcohol 에 m-chlorophenyl isocyanate와 반응시키는 것이고 다른 하나는 isopropyl chloroformate와 m-chloroaniline을 sodiumhydroxide배지에서 반응시키는 것이다.

CIPC는 ester형태이므로 산이나 알칼리 조건하에서 서서히 가수분해되어 m-chloroaniline, CO₂, isopropyl alcohol를 생성한다. 이 반응을 이용하여 CIPC의 잔류량 분석에 이용한다. CIPC는 강산화제의 존재하에서 분해되지만 유기중간체 또는 유기용매에 의하여 쉽게 작용을 받지 않는다. 250°C정도 가열하면 분해가 일어나고 chlorophenyl isocyanate와 isopropyl alcohol을 형성한다.

라. 분석 방법

CIPC를 처리한 농산물에 잔류되는 농도를 측정하는데는 두가지 방법이 있다. 즉, 가수분해를 한 다음 methylene chloride 또는 petroleum ether로

추출하는 방법과 가수분해를 거치지 않고 기기를 사용하여 직접 측정하는 방법이다.

가수분해를 하여 측정하는 방법의 원리는 가수분해에 의하여 생성되는 3-chloroaniline를 분광광도계를 사용하여 측정하는 것이다. 시료로부터 CIPC를 추출하는 방법은 시료의 종류와 시료의 상태에 따라서 변수가 많기 때문에 적절한 추출용매의 선택이 중요하다. 이 방법을 사용할 경우 시료에 함유되어 있는 방해물질에 의한 간섭이 크기 때문에 이를 적절히 제거할 수 있는 기술이 요구된다.

가수분해를 거치지 않고 IR를 사용하여 분석하는 방법은 가수분해 후 분광광도계로 측정하는 방법에 비하여 감도가 떨어지지만 200g의 시료 중에 0.1mg이 함유되어 있는 경우 분석이 가능하다.

1) 알칼리 가수분해 방법

a. 원리

파쇄된 시료에서 무수용매를 사용하여 CIPC를 추출한 다음 용매를 제거하고 CIPC를 농축하여 강알칼리 조건하에서 가수분해하여 3-chloroaniline을 생성시킨다. 3-chloroaniline을 알칼리 용액으로부터 증류하여 분광광도계로 측정한다. 3-chloroaniline을 분석하는 방법은 두가지 있는데 이것을 hydrochlorite와 phenol-ammonium hydroxide 시약으로 반응시켜 청색으로 발색시킨 다음 측정하는 방법과 3-chloroaniline을 N-1-naphthylethylenediamnedihydrochloride와 반응시켜 적색을 발색시켜 측정하는 방법이 있다.

b. 장치

실험에 사용되는 가수분해 및 증류장치는 그림 1과 같다. 냉각수를 공급하여 가수분해하는 동안 환류냉각이 되도록 한다. 가수분해가 되면 냉각수를 계속적으로 흘려 증류액이 응축되도록 한다. 실험이 시작되면 장치의 배치를 바꾸거나 움직일 필요가 없도록한다. 그림 1과 같은 장치외에 분광광도

계, 250ml의 플라스크를 사용할 수 있는 원심분리 및 시료를 마쇄할 수 있는 장치가 필요하다.

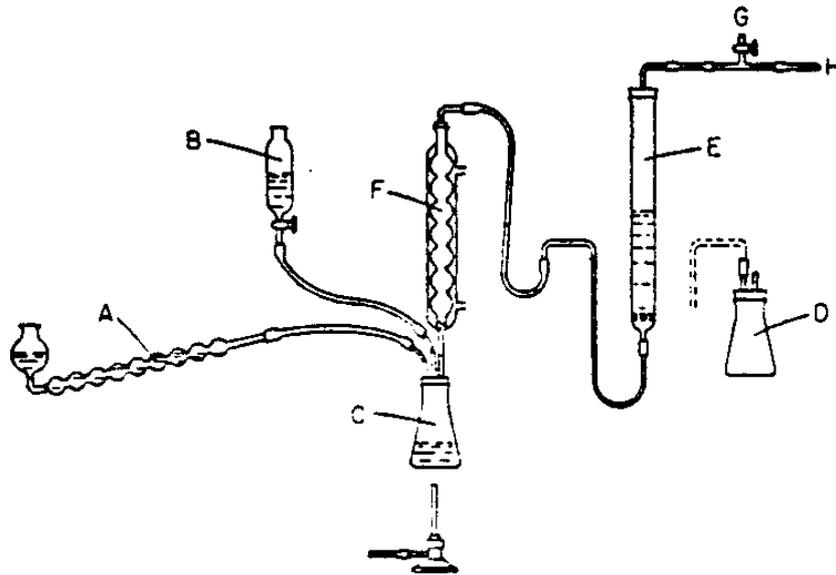


FIG. 1. Hydrolysis and carbon dioxide evolution assembly. A, Meyer sulfur bulb; B, acid reservoir; C, reaction flask; D, receiver flask; E, absorption tower; F, condenser; G, stopcock; and H, aspirator connection.

c. 실험방법

i. 시료의 조제

충분한 양의 시료를 마쇄한 다음 각각의 시료 200g을 취한다. 토마토나 배와 같이 수분함량이 높은 시료는 마쇄하였을 때 나오는 자체 수분을 균질화한다. 알파파나 쌀과 같이 수분함량이 낮은 시료는 건조한 상태로 분쇄한다. 시료를 취하는 양은 약 200g으로 하고 시료를 미세하게 균질화 시킨다.

ii. 추출과정 - 수분을 함유한 시료

시료를 균질화한 다음 200g을 500ml의 분획여두에 취한다. 150ml의 petroleum ether를 분획여두에 넣고 1분간 충분히 진탕하여 재초제인 CIPC가 ether층으로 추출되도록 한다. Slurry를 1800 rpm에서 10분간 원심분리하여 층을 분리시킨다. Ether층은 감압하에서 여과하고 남은 잔사에 ether

를 100ml가하여 재추출을 한다. 시료가 추출된 ether층을 모두 모은다.

약 75ml의 50% ethanol-water(v/v)을 분액여두에 넣고 진탕하면서 ether용액을 충분히 수세한다. 층을 분리한 다음 alcohol-water층은 버리고 ether층은 모은다.

iii. 추출과정 - 수분이 없는 시료

상대적으로 수분함량이 낮은 시료는 마쇄한 것 200g을 800ml의 비커에 넣고 충분한 양의 petroleum ether를 가하여 용매가 시료표면의 상층부까지 채우도록 한다. Slurry를 하룻밤 방치시키고 Watman No.41 여과지로 여과한다. 남은 잔사에 다시 petroleum ether를 가하여 재추출한 다음 여액을 모아 다음 단계인 가수분해시킨다.

iv. 가수분해

Ether 추출액을 모아 500ml의 가수분해용 플라스크에 넣고 40°C의 수조속에서 가온하면서 감압농축을 한다. Ether가 건고된 다음 증류수 100ml과 2-3방울의 anti-foam을 가하고 플라스크를 증류장치에 건다. 증류액 포집병에 5ml의 0.36M HCl (phenol-ammonia hypochlorite 처리인 경우) 또는 5ml의 6M HCl (diazotization dye-coupling 방법인 경우)을 미리 가한 다음 125ml을 받는다. 이때 증류액이 나오는 부위는 증류액을 받는 비이커에 담겨진 산용액과 접촉되어야 한다.

50ml의 50% NaOH 용액을 증류플라스크에 넣고 25ml의 증류수를 가한다. 용액은 가만히 가온하여 1.5시간 동안 환류시킨다. 가수분해가 끝나면 증류관에 부착된 냉각관에 냉수 공급을 중지하여 증류액의 측면에 붙은 냉각관에서 응축되어 증류액 포집비이커에 포집되도록 한다. 증류액을 포집한 다음 0.2g의 Celite filter를 가하여 증류액중에 함유된 여러 불순물을 제거한다. Celite처리가 끝나면 용액을 7cm의 Watman No.42여과지로 여과하고 여액은 깨끗이 건조된 150ml의 비커에 받는다. 이때 총부피가 40ml이상이 되지 않도록 소량의 증류수를 사용한다.

v. Phenol-Ammonia-Hypochlorite 분광광도 측정법

3-chloroaniline로 발색시키기 위하여 5% calcium hypochlorite를 두 방울 가하고 실온에서 5분간 소화시킨다. 반응이 완료되면 용액을 가열하여 전기난로 위에서 30분간 격렬하게 끓인다. 용액을 난로 위에서 제거한 다음 5ml의 phenol-ammonia 시약을 뜨거운 상태의 용액에 즉시 가한다. 이때 피펫을 사용하여 시약이 시료용액에 잠기게 하면서 저어준다. 급속한 냉각은 시키지 않고 약 15분간 발색이 되도록 가만히 둔다.

발색이 거의 완료되면 45ml의 증류수를 사용하여 희석시킨다. 적절한 양의 희석용액을 cell에 옮긴 다음 650nm에서 분광광도계로 투과도를 측정한다.

vi. 방해물질

분석에 적용되는 모든 곡류는 적은 양이지만 방해물질이 함유되어 있다. 방해물질이 어떤 것인지를 확인하는 시도는 이루어지지 않았으나 이 방해물질의 화학적 구조가 aniline과 유사하여 분석을 위한 시료처리 과정에서 시료와 유사한 반응을 일으키는 것으로 생각이 된다. 따라서 이러한 방해물질을 제거하기 위한 시료 전처리기술의 개발이 요구되고 있다.

vii. 감도

이 분석방법에 의하면 200g의 시료를 분석할 경우 약 0.01mg, 즉 0.05ppm을 검출할 수 있다. 분석 감도는 일정하지 않고 시료의 종류와 그 시료에 함유되어 있는 방해물질의 함량에 따라서 달라진다.

viii. 회수율

회수율을 구하기 위하여 분석대상 시료에 일정량의 CIPC를 가한 다음 분석하여 얻어지는 잔류량으로 부터 회수율을 구한다. 회수율에 대한 분석은 시료 중의 잔류량의 정확한 검정을 위하여 반드시 필요한데 일반적으로 회수율은 80-100%에 이른다.

7. Phenthoate (Cidial, Elsan) : Ethylmercaptophenyl acetate

(O,O-dimethyl phosphorodithioate), $C_{12}H_{17}O_4PS_2$ (Mol. wt. 320.3)

가. 생물학적 성질

Phenthoate는 피부에 접촉되거나 위에 섭취되었을때 작용한다. 이것은 목화, 쌀, 감귤, 과실, 채소 등의 해충인 나방류, 진디, 모기유충 또는 성충을 방제한다.

쥐에 대한 공업용 phenthoate의 급성경구 LD_{50} 은 300-400mg/kg이고 4800mg/kg을 4시간 동안 피부에 노출시킨 경우 중독현상을 나타내었다. 88주간 장기적인 만성독성을 실험한 결과 0.5mg/kh/day 이하의 수준에서는 독성을 나타내지 않았다.

나. 물리적 성질

순수한 phenthoate는 물에 약 10ppm이 녹고 공업용은 알콜, 방향족 탄수화물, 아세톤, cyclohexanone, acetonitrile, methylcellosolve, carbon disulfide 등에 녹는다. n-Hexane에는 12%, ligroin에 17%, diethylglycol에 20%, light petroleum에 10%가 녹는다.

다. 화학적 성질

Phenthoate는 산과 중성에 녹고 pH 9.7의 완충용액 중에서 20일간 두면 가수분해된다. 이것은 산화제에 의하여 산소동족체로 변환된다.

라. 분석 방법

농작물이나 동물의 조직내에 잔류되는 phenthoate를 분석하는 방법에는 여러가지가 있다. 활성을 지닌 잔류물을 phosphomolybdate와 molybdenum blue로 변환시킨 다음 색도를 측정하는 방법이 있다. 정제과정을 거치면 사과, 오렌지, 레몬 등에서 0.1-0.2ppm을 검출할 수 있다. 농작물 중의 잔류량을 분석하는데는 박층크로마토그래피기법을 사용한다.

ECD나 FPD를 부착한 GC를 사용하는 경우는 그 보다 낮은 수준의 잔류물을 측정할 수 있고 정제과정은 보통 Florisil column을 사용한다.

1) 원리

이 분석 방법으로 phenthoate와 산소동족체를 0.005ppm 수준 까지 검출할 수 있다. 농작물이나 근육조직내에 있는 잔류물을 acetone으로 추출한 다음 액체-액체간 분별시키고 Florex column으로 정제한 다음 인화합물에 민감한 검출기가 부착된 GC로 정량하는 것이다.

2) 실험 방법

A. 추출및 정제

a. 옥수수

시료 50g을 125ml의 acetone/water (90:10, v/v) 혼합용액으로 15분간 얼음물 내에서 균질화하면서 추출한다. Buchner funnel를 사용하여 미리 265ml의 benzene이 들어있는 500ml 플라스크로 감압여과한다. 남은 잔사는 25ml의 acetone으로 3회 수세한다. 이것을 전부 모아 3분간 진탕 후 정치시켜 층이 분리되도록 한다. 수층은 버리고 용매층을 취한 다음 무수황산나트륨으로 탈수하고 감압농축하여 용매를 제거한다.

b. 근육 조직

50g의 시료를 취하여 125ml의 acetone으로 얼음물내에서 균질화한다. 이후 조작은 옥수수와 동일하게 한다.

c. 지방 조직

시료 50g을 취하여 250ml의 n-hexane으로 얼음물내에서 15분간 균질화한 다음 -20°C 에서 1시간 동안 원심분리한다. 액상을 분액여두로 옮긴 다음 200ml의 acetonitrile로 2회 추출하고 용매층을 모아 감압농축한다.

B. Florex column chromatography

칼람에 glass wool을 채우고 chloroform/methanol 용액(98:2)을 3-4ml 붓는다. 용매 50ml과 Florex 15g으로 slurry를 만들어 칼람에 채운 다음 공기를 제거하여 고르게 충전한다. 용매를 용출시키고 난 다음 다시 100ml의 용매를 통과시킨다. 이때 용리액의 속도는 1.5 - 2ml/min으로 한

다. 전처리된 시료를 용매 1ml에 녹여 칼람에 주입한다. 용매 0.3ml로 3회 세척하여 칼람에 주입하고 100ml의 용매혼합액으로 화합물을 용출시킨다. 용출된 성분은 감압하에서 적절한 농도로 농축한다.

C. Gas chromatography

정제 과정을 거쳐 얻어진 시료용액을 GC로써 다음과 같은 조건하에서 분석을 한다.

Column temperature	225°C
Injection port	270°C
Detector port	225°C
Carrier gas	Nitrogen, 70-80ml/min
Detector	FPD
Record sensitivity	1 mV full scale
Injection volumn	1 μ l

D. 검출한계

각 시료에 대한 검출한계는 0.005ppm이었다.

E. 회수율

Penthoate와 그 산소동족체에 대한 회수율을 구하였다. 0.05ppm수준에서 회수율을 구한 결과 penthoate는 80-95%이었고 산소동족체의 경우는 75-90%이었다.

제 2절 유기염소계 및 유기인계 농약의 다중 분석법

1. 원리

충분히 혼합한 시료를 CH_3CN (수분이 많은 시료)이나 CH_3CN 에 물을 가한 혼합용액(수분의 함량이 낮은 시료 또는 高糖시료)으로 추출한다. 지방

이 풍부한 식품은 지방을 추출하고 petroleum ether(p.ether)와 CH₃CN로 분액여두 상에서 분배시킨다. CH₃CN의 수층 부분 (비지방 시료) 또는 전체 용액(지방 시료)을 물로 희석하고 잔류물을 p.ether로 추출시킨다. 잔류농약은 Florisil column으로 정제하고 p.ether와 ethyl ether(e.ether)의 혼합물로 용출시킨다. 농축된 용리액에 함유되어 있는 잔류물은 기체크로마토그래피, 박층크로마토그래피, 종이크로마토그래피로 정성과 정량을 실시한다. 실제 분석을 시작하기 전 잔류물에 대한 분석이 잘되었는지 확인할 필요가 있고 회수율은 80% 이상이어야 한다. 이때 실험실과 시약에서 연루되는 여러가지 불순물을 규칙적으로 조사하여야 하며 특히 용매의 경우는 농축이 되기 때문에 충분히 정제하지 않으면 분석을 방해하므로 주의를 요한다.

2. 재료

잔류농약을 분석하기 위하여 구입한 시료의 생산국 및 제조회사의 목록은 Table 2와 같다.

표 2. 분석용 수입식품 시료의 제조회사 목록

Items	Nationality	Manufacturers
1. Danish Pork Luncheon Meat	Denmark	Royal dane quality
2. Chopped Pork With Ham	Denmark	Danish Crown
3. Grape Jam	U. S. A	Welch's
4. Vienna sausage in beef stock	U. S. A	The Dial Corp.
5. Cherry Drink Mix	U. S. A	Liberty Gold
6. Shelled Walnuts	U. S. A	Diamond
7. Apple Sauce	U. S. A	Seneca Food Corp.
8. Jelly Rings	U. S. A	Ferrapa Pan candy Co.
9. Goober Grape (Peanut butter & Grape Jelly)	U. S. A	Smucker's
10. Goober strawberry (Peanut butter & strawberry Jelly)	U. S. A	Smucker's
11. Peanut Butter	U. S. A	Skippy
12. Red Raspberry	U. S. A	Smucker's

13. Strawberry Jam	U.S.A	Smucker's
14. Orange Marmalade	U.S.A	Top Flavor
15. Sweet Pickles(오이)	U.S.A	Nalley
16. V8 Vegetable Juice (100 %)	U.S.A	Campbell
17. Maraschino cherries	U.S.A	Royal Willamette
18. Choice Spanish Olives	Spain	Loreto
19. Corned Beef	Argentina	Libby's
20. Luncheon Meat	Denmark	Danish Crown
21. Cherry Kool-Drink Mix	U.S.A	Paradise Time Food Div.
22. Mixed Nuts	U.S.A	
23. Sliced Pineapple	Indonesia	Ligo
24. Grapefruit juice	U.S.A	Libby's
25. Roast Beef	U.S.A	Libby's
26. Clingpeach halves in Syrup	Australla	Ardmona

3. 일반 시약

용매는 반드시 정제시켜야하며 최종종류는 초자로 하여야 한다. 용매의 순도를 측정하기 위하여 전자포획검출기가 부착된 기체크로마토그래피 (ECD-GC)로 분석하고 이때 ECD-GC상에서 용매의 불순물에 의한 피크가 나와서는 안된다.

(1)Acetonitrile - 4L의 acetonitrile에 대하여 1mL의 H_3PO_4 , 30g P_2O_5 , boiling chip을 가한 다음 80-81°C에서 증류한다. 이때 82°C를 초과하여서는 안된다.

(2)Acetonitrile (p.ether으로 포화) - 재증류시킨 p.ether(13)로서 $CH_3CN(1)$ 을 포화시킨다.

(3)Alcohol - USP, reagent grade, or MeOH, ACS.

(4)Alcoholic alkali 용액, 2% - alcohol에 2g의 KOH를 가하여 녹인 후 100ml로 만든다.

(5)Eluting solvent, 6% - e.ether(8) 60mL을 p.ether(13)으로 1L가 되도록 만든다.

(6)Eluting solvent, 15% - 150mL의 e.ether로 (5)와 같이 만든다.

(7)Eluting solvent, 50% - 500mL의 e.ether로 (5)와 같이 만든다.

(8)Ethyl ether - 34 - 35°C에서 재증류하고 질소하에서 보관한다. 2%의 alcohol을 가하고 시험결과 peroxide가 없어야 한다.

(9)Florisil - 60/100 PR grade, 675°C에서 활성화시킨 Florisil을 500ml의 glass jar에 즉시 옮기고 암소에 보관한다.사용전에 130°C에서 5시간 가열한다. 보관은 130°C의 glass jar나 공기가 차단된 데시케이트 상에 보관하고 2일 이상 경과시는 다시 130°C에서 가열해 준다.

(10)Hexane - GR grade, 초자기구를 사용하여 재증류한다.

(11)Magnesium oxide - Adsorptive magnesia (Fisher Sci. Co.No. S-120)

약 500g을 물로써 slurry를 만들고 steam bath상에서 30분간 가열하여 흡입 여과한다. 105 - 130°C에서 밤새 건조하고 No.60 seive로 거른다. 보관은 밀폐용기에 한다.

(12)Magnesia-Celite mixture - MgO(11)와 Celite 545를 1:1(무게비)로 섞는다. p.ether로써 Celite를 추출한 액에서 전자포집물질이 검출되지 않아야 한다.

(13)P.ether - GR grade, 30-60°C에서 초자로써 재증류 후 사용한다.

(14)Sodium sulphate - 무수의 그레놀형을 사용한다.

4. 일반 초자기구

(1)고속 균질기 - Waring blender 또는 동등한 성능을 가진 것.

(2)크로마토그래피용 관 - 텡,론 콕크가 있고 fritted plate 또는 glass wool 을 칼람의 하단에 충전할 수 있는 것. 22mm i.d. x 300mm.

(3)stopcock가 없는 크로마토그래피용 관 - 22mm i.d. x 300mm 또는

400mm.

(4) Filter tubes - fritted plate나 glass wool 마개가 가능하며 짧은 관이 하부에 부착된 것. 약 22mm i.d. x 200mm.

(5) Kuderna-Danish 농축장치 - 증류관이 부착된 500 와 1000mL 눈금이 표시된 시료포집 플라스크.

(6) 분액여두 - 테프론코크가 달린 1000 및 125mL 용량의 것.

(g) Micro-Snyder column - 2-ball (Kontes Glass Co. No. K-569001 또는 동등한 것)

(h) Micro-Vigreux column - Kontes Glass Co. No. K-56925, 또는 동등한 것.

5. 시료의 조제 및 추출

(1) 비지방 식품

부드러운 과일의 경우는 씨를 제거하고 과실의 육질부분이 고르게 되도록 마쇄한다.

1) 수분을 75% 이상 함유하고 5% 이하의 당을 함유하는 경우

쇄절한 시료 100g을 고속균질기에 넣고 200mL의 CH_3CN 과 10g의 Celite를 가하고 고속으로 2분간 균질화시킨다. sharkskin paper가 들어있는 12 cm buchner를 통하여 500mL로 흡입여과하고 여액을 250mL의 메스실린더에 옮겨 부피를 측정한다. 부피를 측정한 여액을 1L의 분액여두에 옮긴 후 5)와 같이 처리한다.

2) 수분을 75% 이상 함유하고 당의 함량이 5-15%인 시료

100g의 시료에 대하여 CH_3CN 200mL과 50g의 물을 가하고 1)과 같은 처리를 한다. 여액 250mL을 1L의 분액여두에 취하고 5)와 같은 처리를 한다.

3) 75% 이상의 수분을 함유하고 15-30%의 당을 함유하는 시료

시료 100g을 취하여 200mL의 CH_3CN 과 50mL의 물을 혼합한 용액을

75°C까지 가열하고 1)과정을 신속히 처리한다. 여액이 냉각되기 전에 250mL 이하를 1L의 분액여두로 옮기고 냉각될 때 까지 기다린 후 5)와 같이 처리한다.

4)건조품 또는 저수분 식품 (예, 볏집)

35% H₂O-CH₃CN(350ml H₂O diluted to 1L with CH₃CN) 350mL을 20-50g의 시료에 가하고 균질화시킨다. 이때 시료량이 많으면 추가로 용매를 더 가한다. 고속으로 5분간 마쇄하고 1)과 같은 처리를 한다. 흡입여과를 한 후 다음 단계인 5)로 한다.

5)잔류물을 p.ether층으로 이행

p.ether를 정확하게 취하여 추출물이 들어 있는 분액여두에 가한다. 1-2분간 진탕하고 10ml의 포화 NaCl과 600ml의 물을 가한다. 분액여두를 수직으로 두고 30-45초간 심하게 흔들여 준다. 정치후 수층을 버리고 용매층을 100ml x 2회 물로 씻는다. 수세한 것은 버리고 용매층을 100ml의 glass stopped cylinder로 옮기고 부피를 기록한다. 15g의 무수황산나트륨을 가하고 세게 흔든다. 무수황산나트륨을 가하고 1시간 이상 방치하지 않는다. 1시간 이상 방치하면 흡착이 일어나 잔류량의 손실이 발생한다. 용액을 Florisil column에 직접 이행시키거나 Kuderna-Danish 농축기로써 5-10ml로 농축한다.

6)과일과 야채에 대한 계산

g sample은 $S \times (F/T) \times (P/100)$ 로 계산한다.

여기서 T = total volumn (mL H₂O in sample + mL CH₃CN added - correction in mL for vol contraction)

P = mL p.ether extract

100 = mL p.ether (잔류물을 추출하기 위하여 사용된 양)

고당식품에 있어 50 mL의 물을 CH₃CN에 가했을 때 총부피 T는 45 증가한다. 즉, 수분을 85% 함유하는 식품의 경우는 T = 280 대신에 T = 325

이다.

예) 100g의 시료가 85%의 수분을 함유하고 있다. 200mL의 acetonitrile을 가한 경우 부피수축은 5mL이다. 총부피는 280ml이다. 여과액의 부피가 235mL이면 p.ether추출액의 부피는 85mL이고 잔류물을 100mL의 p.ether에 옮기면 $100 \times (235/280) \times (85/100) = 71\text{g}$ 이다. 식품에 있어 수분의 함량은 각각 계산하여야 한다.

(2) 지방 함유식품

지방을 제거한 후에 acetonitrile로써 분배시킨다.

1) 동물 및 식물의 유지

고체이면 녹인 후에 건조 여과기로써 여과하여 사용

2) 버터

50°C까지 가온하고 여과하여 사용

(3) 시료 정제 기법

1) Acetonitrile Partitioning

3g의 지방시료를 125mL의 분액여두에 옮기고 p.ether를 가하여 p.ether와 지방의 총 부피가 15mL이 되도록 한다. p.ether로 포화된 acetonitrile 30mL를 가하여 1분간 흔들어주고 층을 분리시킨 다음 acetonitrile층을 취하여 650mL의 물, 40mL의 포화식염수, 100mL의 p.ether가 들어있는 1L의 분액여두에 넣는다. 125mL의 분액여두 속에 있는 p.ether에 30mL의 acetonitrile (p.ether로 포화시킨 것)을 3회 가하여 1분간 진탕하여 추출하고 추출액을 1L의 분액여두속의 추출물과 합한다.

만약 실험결과 충분한 정제가 되지 않았다고 판단되면 다음과 같은 처리를 한다. 첫번째 분획된 acetonitrile를 취하여 15mL의 p.ether가 들어있는 두번째 분액여두 (125mL)에 넣은 후 1분간 진탕하여 층분리를 하고 acetonitrile층을 650mL의 물, 40mL의 포화식염수, 100mL의 p.ether가 들어있는 1L 분액여두에 넣는다. 125mL 분액여두 속의 잔여물은 3회의

15mL p.ether를 가하여 추출한 다음 이것들을 1L의 분액여두에 합한다.

분액여두를 수직으로 세운 다음 30-45초간 충분히 섞는다. 층이 분리 되도록 하고 수용액층을 두번째의 1L 분액여두에 옮긴다. 100mL의 p.ether를 두번째 분액여두에 가하여 15초간 충분히 진탕하고 층을 분리시킨다. 수용액층을 버리고 p.ether층을 모아 원래의 분액여두에 옮긴 다음 100mL의 물로써 2회 씻는다. 수세한 물은 버리고 p.ether층을 50 x 25mm o.d. 무수황산나트륨 칼람에 통과시키고 500mL의 Kuderna-Danish 농축장치에 받는다. 분액여두는 10mL의 p.ether로써 3회 수세하여 추출액을 합하여 농축하고 이것을 약 10mL로 씻어 Florisil 칼람으로 옮긴다.

2) Florisil Cleanup

내경 22mm의 칼람(10cm의 activated Florisil, 상층부에 1cm의 무수황산나트륨을 충전)을 준비한다. 칼람에 미리 40-50mL의 p.ether를 가한다. 칼람의 하단에 Kuderna-Danish 농축기 (하단에 눈금이 표시된 시료포집 플라스크를 부착)를 대고 용출액을 받는다. 추출액을 분당 5mL의 속도로 칼람에 통과시키고 용기와 Na_2SO_4 는 5mL의 p.ether로써 2회 수세하여 Florisil column에 넣는다. 용출은 6% 용출액(5) 200mL로서 분당 5mL의 속도로 용출하고, 포집용기를 바꾸어 15% 용출액(6) 200mL로써 용출하고, 다시 용기를 바꾸어 50% 용출액(7) 200mL로써 용출시킨다.

각각의 용출액은 Kuderna-Danish 농축장치로서 적당히 농축하고 5mL이하로 농축할 경우는 2-ball micro-Snyder 또는 micro-Vigreux column을 사용한다.

1st elution (6%) 에 함유된 농약은 다음과 같으며 처리된 시료는 직접 GC에 주입하는 것이 가능하다.

A. 유기염소계 농약

aldrin, BHC, DDE, DDD(TDE), o,p'- and p,p'-DDT, heptachlor, heptachlor epoxide, lindane, methoxychlor, mirex 및 ethylene

B. 산업 폐기물

polychlorinated biphenyls (PCB)

C. 유기인계 농약

ethion, ronnel

2nd elution (15%) 에 함유된 농약은 다음과 같다.

A. 유기염소계 농약

dieldrin, endrin

B. 유기인계 농약

diazinon, Methyl parathion, parathion

-재정제가 필요하면 GC로써 정량분석한 후 Magnesia cleanup and/or

Saponification을 실시한다.

3rd elution (50%) 에 함유된 농약은 다음과 같다.

유기염소계 농약 - malathion

3)Magnesia Cleanup

15% eluate의 organopesticides가 재정제를 필요할 경우에 실시한다. 10g의 Celite Mix(12)을 stopcock가 있는 chromatographic tube에 옮기고 진공을 걸어 충전한다. 40mL의 p.ether로써 미리 수세하고 column 하단에 Kuderna-Danish 농축기를 부착한다. 15% Florisil 용리액을 5mL로 농축한 뒤 칼람에 넣고 소량의 p.ether로써 수세하여 준다. 진공을 약간 걸어서 p.ether가 칼람을 통과하게 한 다음 100mL의 p.ether를 사용하여 용출하고 적절한 부피로 농축한다. 이때 필요하면 saponification을 실시한다.

4)Saponification

고온의 알칼리 처리에 파괴되지 않고 안정한 농약을 정제할 때 사용되는 방법이며 15% elute가 충분히 정제되지 않은 경우에 실시한다. 15% elute를 2mL로 농축하고 여기에 2% alcoholic KOH를 1mL가한다. Micro-Snyder column을 부착하고 steam bath상에서 조심하면서 1ml이하

로 농축한다. 시료를 15분간 환류시키고 냉각한다. 여기에 2mL의 alcohol-H₂O(1 + 1)과 5mL의 hexane을 가하고 1분간 진탕한다. 층을 분리시키기 위하여 원심분리하고 pasteur pipette을 사용하여 hexane층을 가능한 많이 두번째 tube에 옮기고 5mL의 hexane으로 반복추출한 다음 hexane층을 농축하여 GC에 주입한다.

6. 기체크로마토그래피

(1)GC - 기기는 on-column injection이 가능하게 되어있어야 하며 오븐 온도는 0.1°C이내에서 조절이 가능하여야 한다.

(2) Packed column - Glass, 1.85m(6') x 4mm i.d. 충전물질은 10% DC-200(w/w)을 사용하며 액상물질로서 OV-101을 사용하여도 무방하다. 지지체로서는 80-100mesh의 chromosorb W HP, 80-100 mesh Gas-Chrom Q, 80-90 mesh Anakrom ABS를 사용한다. 칼럼충전물질을 만들기 위하여 2g의 DC-200 (Doe Corning 200 silicone fluid)나 OV-101을 비이커에 취하고 여기에 적당량의 클로로포름을 가하여 녹인다. 이것은 300ml의 Morton type flask로 옮기고 18g의 지지체를 플라스크에 넣는다. 잘 저어준 다음 10분간 방치시키고 플라스크를 감압농축기로 용매를 제거한다. 이때 50°C의 water bath 상에서 약간 감압시키면서 용매를 제거한다.

(3) Capillary column

Capillary column으로는 SPB608 (Fused silica capillary column 30m x 0.25mm i.d., 0.25 μ m film thickness)을 사용하였다. 칼럼오븐온도는 190°C에서 230°C 까지 분당 2.5°C씩 승온하였고 주입기와 검출기의 온도는 각각 235°C, 290°C로 조절하였다. 이때 운반기체와 보충기체는 질소로 하였고 유속은 각각 1.5ml/min 및 25ml/min으로 하였다. 각각의 농약을 확인하기 위하여 표준 농약의 칼럼내에서 머무름시간을 비교하였다. 정량분석을 위하여 분석시료 중에 존재하지 않는 성분 중 하나를 선택하여 내부표준 물질로 선정하여 다음 분석하였다.

(4)ECD - ^3H 또는 ^{63}Ni 을 사용한다.

7. 시료의 분석

Packed column을 사용하여 잔류농약을 분석할 경우는 시료중에 함유된 여러가지 유기물질에 의하여 잔류농약 성분과 완전한 분리가 일어나지 않기 때문에 극미량의 잔류 농약을 분석하는데는 문제가 있었다. 따라서 GC에서 분리능을 높이기 위하여 비교적 최근에 개발되어 정밀분석에 광범위하게 이용하고 있는 capillary column을 사용하여 농약의 표준품을 분석한 결과 그림 2와 같았다. 또한 apple sauce와 orange marmalade로 부터 잔류농약을 추출하여 분석한 결과를 그림 3과 그림4에 나타내었는데 대상 잔류농약의 표준품과 비교하여 볼때 동일한 성분은 검출되지 않음을 볼수 있었다. 이와 같은 방법으로 여러 종류의 시료로 부터 잔류 농약을 분석한 결과 대상 농약은 검출이 되지 않았다.

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

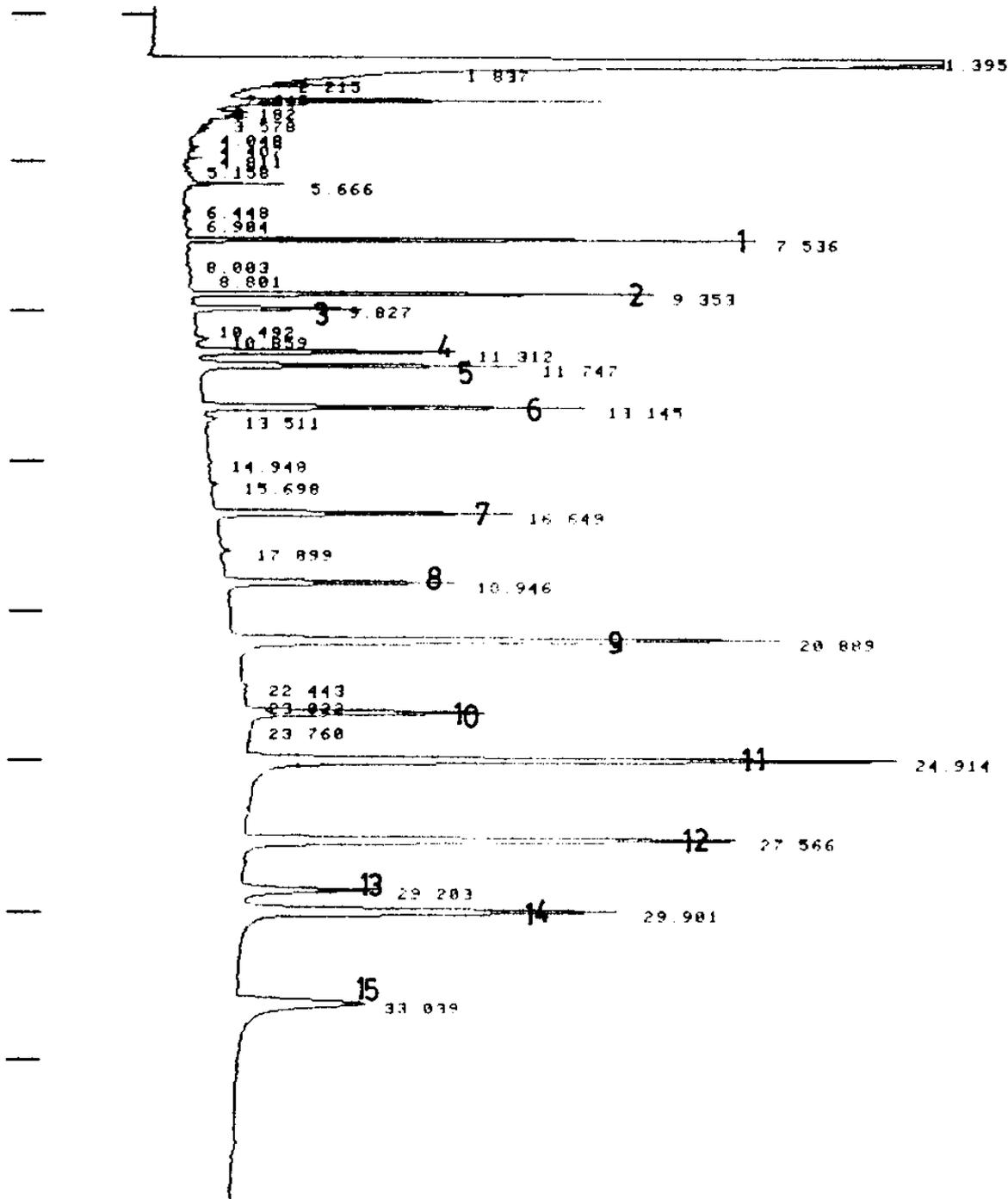


Fig. 2. Chromatogram of standard pesticides by GC.

1. α -BHC, 2. γ -BHC, 3. β -BHC, 4. Heptachlor, 4. δ -BHC
5. Aldrin, 6. Heptachlor epoxide, 7. Endosulfan I
8. 4,4'-DDE, 9. Dieldrin, 10. Endrin, 11. 4,4'-DDD
12. Endosulfan II, 13. 4,4'-DDT, 14. Endrin aldehyde
15. Endosulfan sulfate.

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

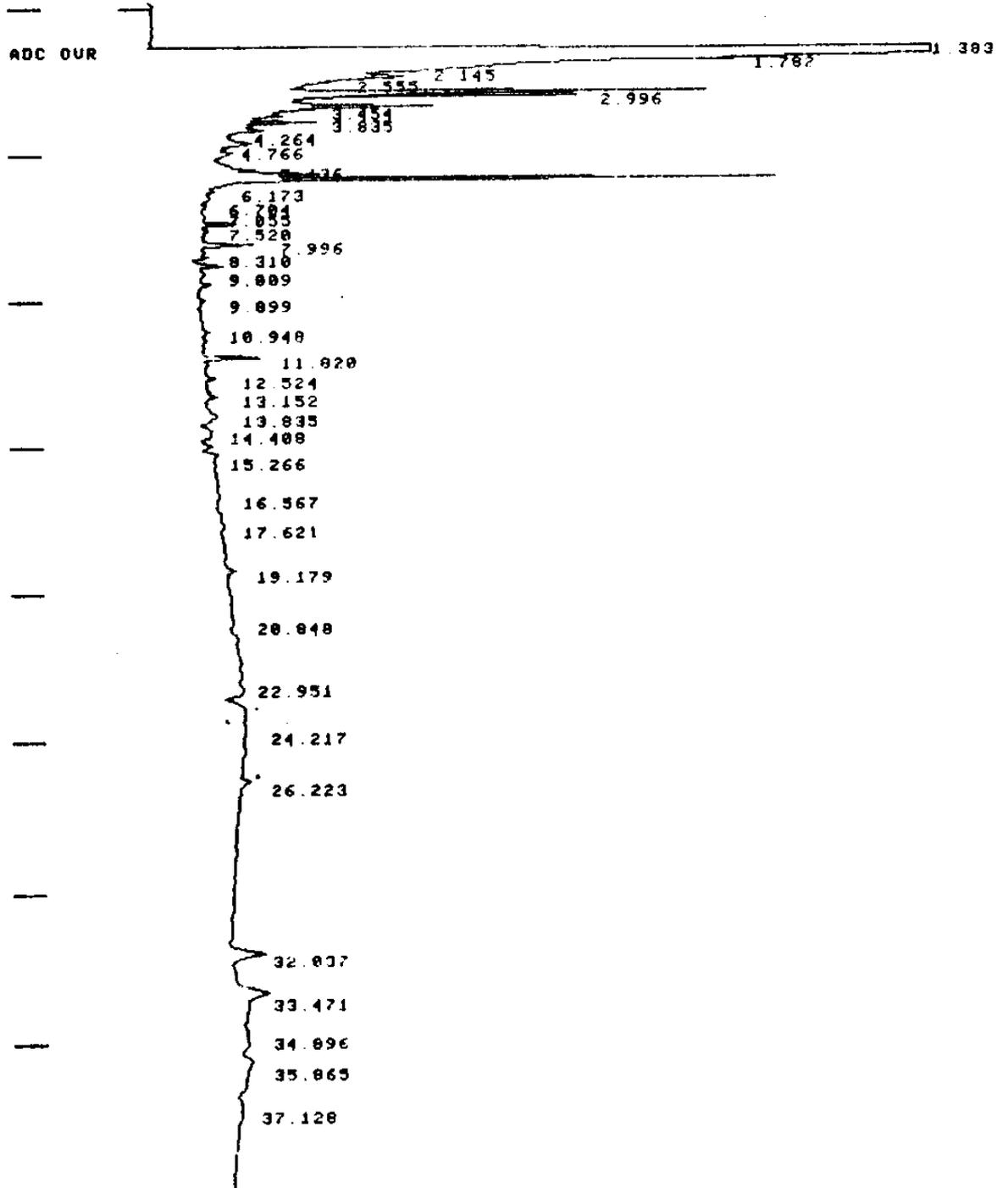
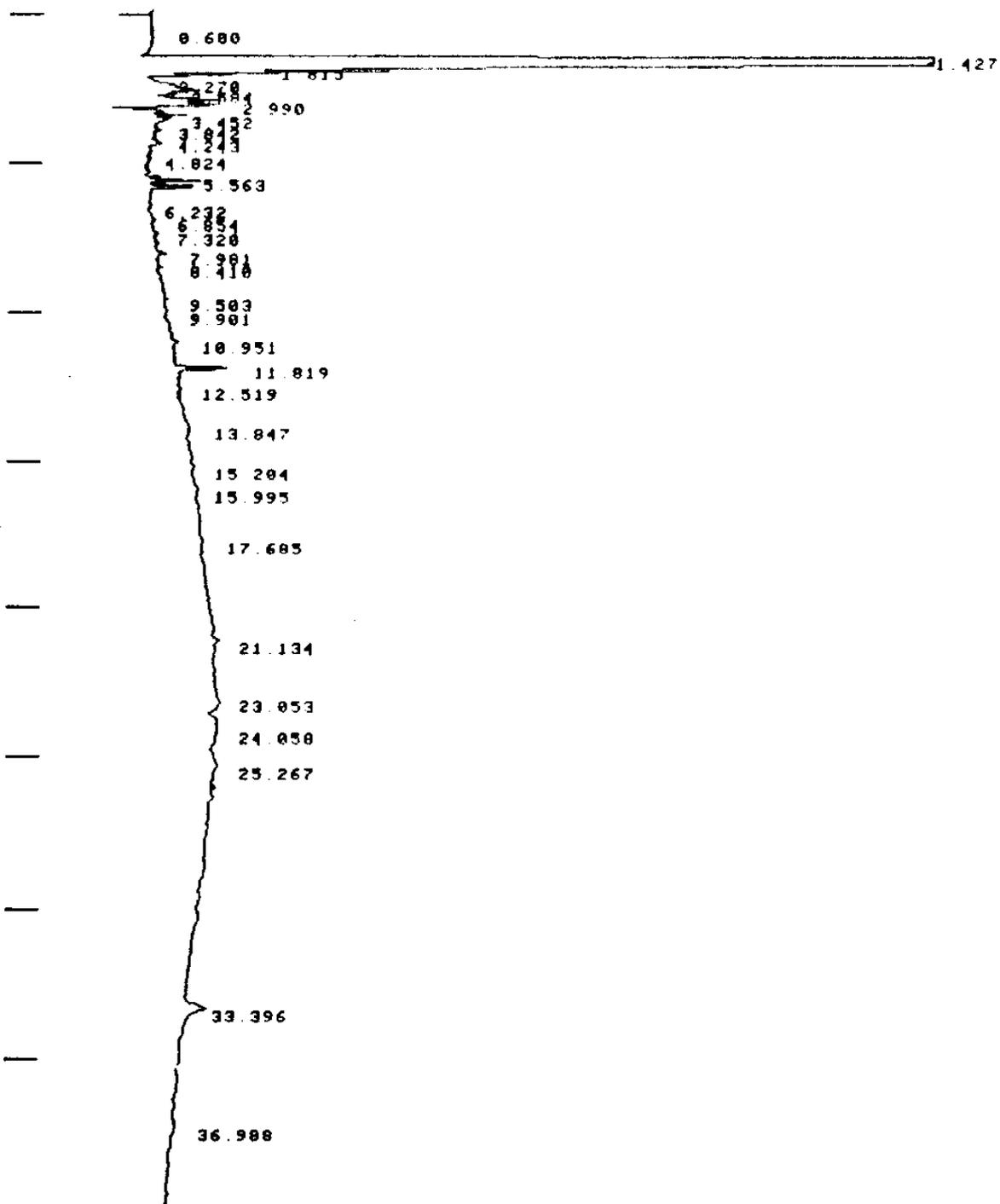


Fig. 3. Chromatogram of apple sauce by GC.

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



제 2 장 합성성장촉진 홀몬제의 분석

제 1절 재료

성장촉진 홀몬제를 분석하기 위한 시료는 수원 동신아파트의 수입육 판매점에서 구입하였다.

제 2절 시약 및 용매

- 1) 표준 시약 : Hormone 표준품으로는 diethylstilbesterol(DES), hexesterol, β -estradiol을 sigma사 (USA)로 부터 구입하여 사용하였다.
- 2) Methanol : HPLC용, Merck
- 3) Dichloromethane : AR, Fluka
- 4) Ethylacetate : HPLC, Fluka
- 5) Isopropylalcohol : HPLC, Burdick and Jackson
- 6) Hexane : HPLC, Burdick and Jackson
- 7) Acetonitrile : HPLC, Merck
- 8) Acetic acid gracial : AR, Baker analyzed
- 9) Sodium hydroxide : Merck
- 10) Sodium acetate : AR, Baker analyzed
- 11) Buffer (pH 5.2, 0.2M) : Acetic acid 6ml, diluted to 500ml
NaAc 13.608g
- 12) Anion exchange resin : strong basic, 8% cross-linked
Dowex-2, 200-400mesh (Dow Chemical)
- 13) Enzyme : Helix Pomatia, Serva 5unit/ml
- 14) Eluting column : 플라스틱 칼럼(0.6cm x5ml)에 1.2cm높이로 수지를 충전하였다. 시료를 주입하기전 4ml의 증류수와 2ml의 5%초산용액, 2ml의

메타놀 및 2ml의 hexane을 흘려 활성화 시킨다.

15) N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) : Sigma

16) Trimethylchlorosilane (TMSCI) : Sigma

제 3절 실험방법

시료육 약 5g에 대하여 10ml의 acetate buffer와 100 μ l의 효소를 가하고 약 5분간 교반시킨 후 37 °C에서 12시간 반응시킨다. 여기에 16ml의 acetonitrile을 가하여 5분간 진탕시키고 2500rpm에서 5분간 원심분리한다. Acetonitrile 층을 취하고 남은 여액에 2ml의 dichloromethane과 8ml의 hexane을 가하여 진탕후 추출하는 작업을 2회 더 실시한다. Acetonitrile 층을 전부 합하여 40°C에서 농축하였다. 농축된 시료에 1.5ml의 alcohol 혼합액(methanol : isopropyl alcohol, 1:1, v/v)을 가하여 용해시킨 후 2ml의 2N NaOH를 가하여 vortex mixer로써 10초간 혼합시켰다. 혼합액을 anion exchange column (5x50mm)에 흡착시킨 다음 1.4ml의 증류수 2.75ml의 5% acetic acid, 1.75ml의 25% methanol 순으로 수세하고 3ml의 methanol로 용출시켰다. 용출액은 40°C에서 감압건조하고 여기에 MSTFA/TMSCI(100:1)을 25 μ l 가한 다음 60°C에서 5분간 반응시킨다. Trimethylsilyl유도체를 제조하여 gas chromatography-mass spectroscopy detector (GC-MSD)로써 분석하였다.

제 4절 GC-MSD의 조작 조건

본 실험에서 사용된 기기로써는 Hewlett-Packard 5970B GC-MSD를 사용하였다. 주입기 온도는 280°C, 오븐온도는 100°C에서 300°C 까지 분당 20 °C씩 상승시켰고, interface 온도는 300°C로 하였다. 운반기체는 수소 (분당 1.4ml)를 사용하였고 칼럼은 HP-1 (cross linked dimethylsilicone, 0.2mm x 17m, 0.11 μ m film thickness), 70eV에서 분석하였다.

제 5절 시료의 분석

1. GC-MSD에 의한 각 성장촉진 홀몬제의 이온의 선택

분석대상인 4종의 홀몬제에 대한 구조식은 그림 5와 같고 각각의 mass spectrum은 그림 6과 같다. Diethylstilbistrol(DES)의 경우 두개의 hydroxy group이 존재하므로 두개의 입체 이성체가 존재하고 이 hydroxy group에 trimethylsilyl 유도체를 만든다. Mass spectrum을 보면 m/z가 412, 397, 383인 이온이 상대적으로 많은 양을 차지하고 있을 뿐만 아니라 다른 홀몬의 mass spectrum의 주요 peak와 겹치지 않음을 알수 있었다. M/z 397의 경우는 M⁺로부터 methyl group이 한개 떨어진 것이고 m/z 383은 ethyl group이 떨어져 나갔을 때 생기는 이온이다. 이들 이온이 차지하는 상대적 인 intensity가 높아 정량분석을 위한 peak로 선택하였고 3peak의 total ion intensity를 구한 후 표준물질에서 얻어진 peak 면적과 시료에서 얻어진 peak 면적을 비교하여 정량하였다.

한편, hexestrol의 경우 m/z 414, 399, 207를 선택하였고 β -estradiol의 경우 m/z 416, 401, 285를 선택하였다.

2. 시료의 분석

시료의 분석에 앞서 각각의 표준품에 대한 회수율을 검토하기 위하여 5ppb수준으로 spiking한 후 total ion intensity를 구한 결과 그림 7,8,9와 같았다. 5ppb수준으로 spiking하였을 때 4종의 홀몬에 대하여 확인이 가능하였고 수입 육에 대하여 분석한 결과 전 시료에 있어 홀몬은 검출되지 않았다.

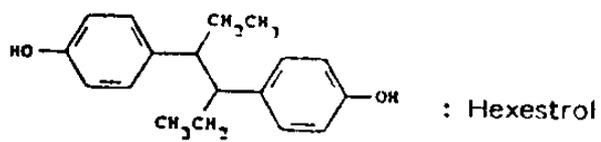
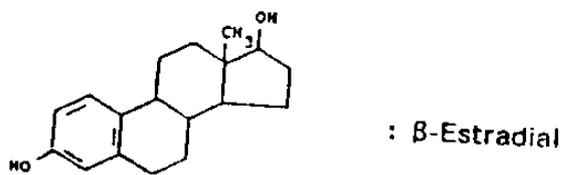
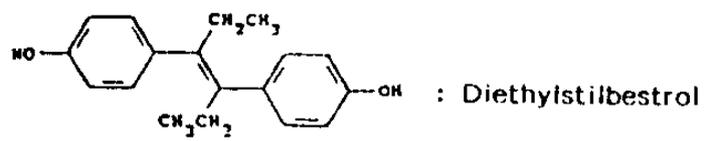


Fig. 5. Structures of hormones interested.

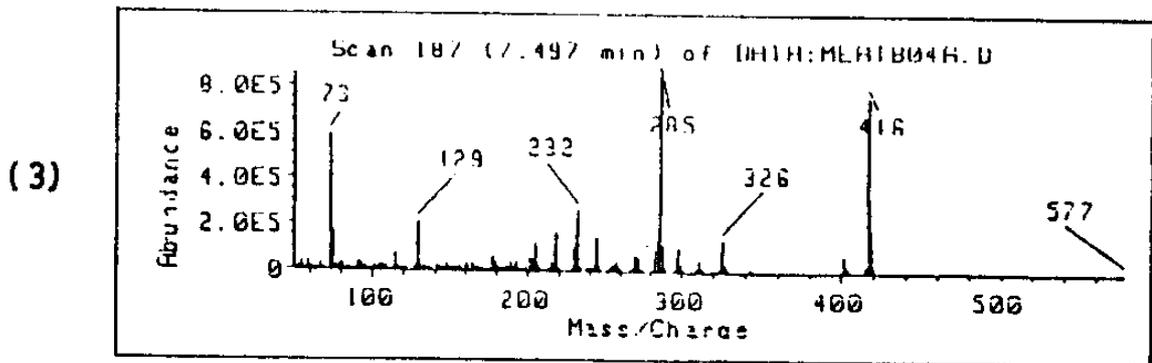
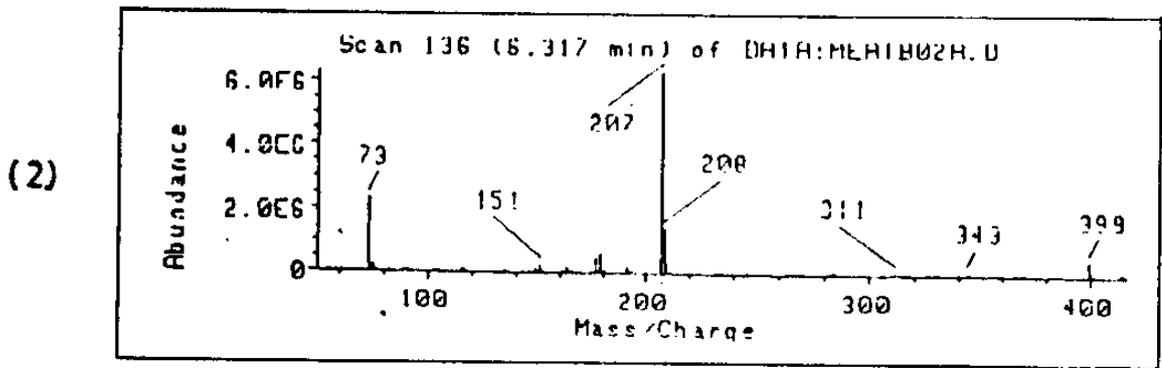
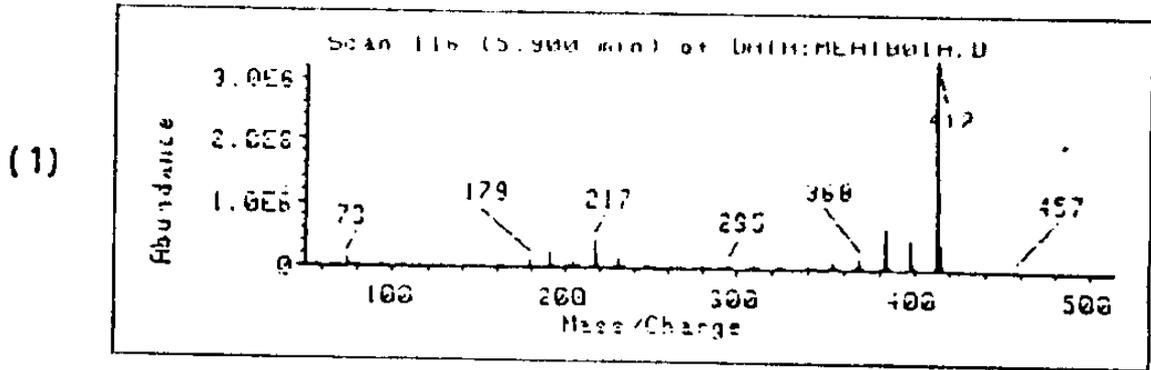


Fig. 6. Mass spectrum of each hormone.

(1) Diethylstilbestrol

(2) Hexestrol

(3) β -Estradiol

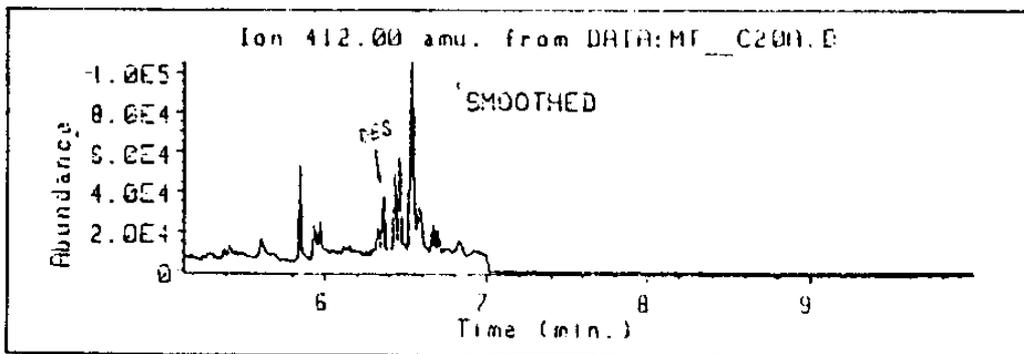


Fig. 7. Total ion chromatogram of DES spiked in 5ppm.

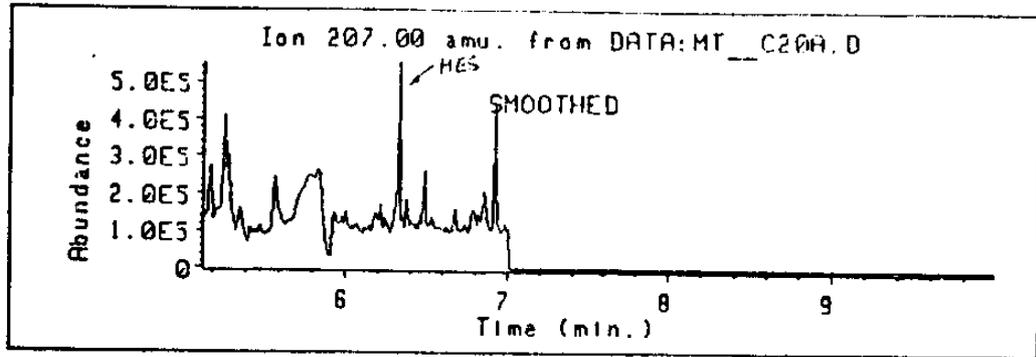


Fig. 8. Total ion chromatogram of Hexestrol.

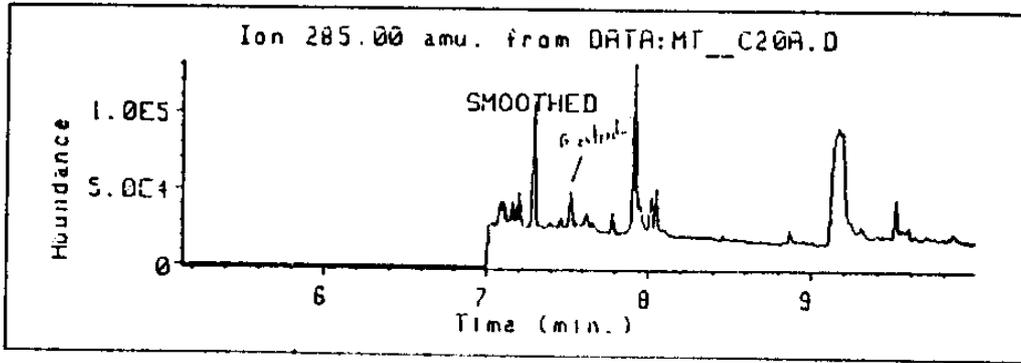


Fig. 9. Total ion chromatogram of β -estradiol.

제 3장 Bioassay에 의한 식육중 항생물질의 분석

항생물질을 검출하는 생물학적 분석방법은 특이성에 있어 이화학적인 분석과는 비교하기 어려우나 신속성, 간편성 및 특수성분에 대한 감도를 비교하여 보면 상당한 이점이 있다. 이 방법은 특이성이 낮기 때문에 한가지 분석법으로 다른 구조를 지닌 여러 종류의 화합물을 분석할 수 있다. 뿐만 아니라 다량의 시료를 간단한 조작으로 일시에 처리할 수 있다. 이 방법으로 잔류가 확인된 경우 다른 여러 방법으로 정량적인 분석을 하면된다.

항생물질의 잔류량을 생물학적 방법으로 분석하는 원리는 두가지가 있다. 이것은 1) 미생물의 colony형성을 저해하는 것을 이용하는 방법과 2) 대사 산물의 생성을 억제하는 정도, 즉 산의 생산이나 기체의 발생을 저해하는 것을 이용하는 방법이 있다.

제 1절 원리

식육을 제단백하고 탈지한 후 pH 8.5로 조정하여 클로로포름으로 지용성물질을 제거한 다음 수층을 pH 4.0으로 조정하여 XAD-2 칼럼크로마토그래피로 아미노글리코사이드계 화합물을 분리한다. 칼럼을 통과시킨 수층은 다시 IRC-50 및 IRA-68 이온교환 크로마토그래피에 의해 정제하여 얻어진 용액을 농축건조후 완충액에 용해하여 아미노글리코사이드계 검액으로 한다.

제 2절 시약

카나마이신, 하이그로마이신, 네스토마이신, 네오마이신, 카스가마이신, 스트렙토마이신은 상용 표준항생물질을 사용하였다. 희석액 농도는 1-10 μ g/ml로 조절하였다.

제 3절 완충액의 제조

1. 0.05M 구연산 완충액 : 구연산 1수염 10.5g을 물 1000ml에 용해하여 이것에 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g을 물 1000ml에 용해한 것을 가하여 염산으로 pH4.2로 조정하여 120°C에서 15분간 멸균한다.

2. 추출액 : 인산칼륨 13.6g을 증류수에 용해하여 1000ml로 만든 다음 이용액과 아세톤을 7:3으로 혼합한다.

3. 칼람크로마토그래피용 흡착제 및 이온교환수지

1) XAD-2 : 500g을 2l flask중에서 methanol 1l에 20분간 침적하고 기울여 미립자를 제거하고 수세를 수회 반복하여 메탄올을 완전 제거한후 물에 침적하여 보존한다.

2) Amberlite IRC-50 (H⁺형) 및 IRA-68 (유리염기형) : 500g을 2l flask중에서 수세를 반복하고 기울여서 미립자를 제거하고 물에 침적하여 보존한다.

4. 실리카겔 박층판 및 여과지

1) 실리카겔 60F₂₅₄, TLC 알루미늄판

2) 실리카겔 60F₂₅₄, TLC 플라스틱판

3) 테트라사이클린계 분리용 실리카겔 60F₂₅₄, TLC 플라스틱판 : 실리카겔 60F₂₅₄ TLC플라스틱판을 5% NaH_2PO_4 100ml에 구연산 1수염 1.2g, 80% 개미산 20ml 및 EDTA 2Na·2H₂O 3.72g을 용해한 액에 침적한 후 상온에서 24시간 건조시킨것

4) 박층 및 여지크로마토그래피용 전개용매

A. pH4.0 마킬루벤 완충액 (0.1M 구연산 용액, 구연산 1수염 21.01g/l) 12.29ml에 0.2M 인산 1수소나트륨 용액 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.62g/l) 7.71ml을 가한 것을 포화시킨 메틸에틸케톤

B. n-butanol : acetic acid : water = 4:1:5

C. n-butanol : methanol : water = 4:1:2

D. chloroform : methanol = 9:1

E. chloroform : methanol = 3:1

F. chloroform : methanol = 1:3

G. methanol

H. benzene : acetone = 2:1

I. pH 7.0, 0.5M 인산 완충액

J. pH 9.0, 0.5M 인산 완충액

K. 7% 염화암모늄 용액

L. butanol : acetic acid : water = 2:1:1

M. propanol : acetic acid : water : pyridine = 15:3:10:10

제 4절 기 구

1. 원통컵

2. pH meter : 소수점 두자리까지 측정 가능한 것

3. 페트리디시

4. 플라스틱제 각형 페트리디시 : 14cm x 10cm, 높이 2cm (또는 23cm x 8cm, 높이 2cm)로 밑면이 평활한 것

5. 칼람크로마토그래피용 칼람

1) XAD-2칼람 : 직경 1cm, 길이 약 30cm의 칼람용 유리관의 하부에 유리솜 소량을 채우고 이것에 XAD-2를 기포가 생기지 않도록 15ml 충전한다. 이것을 약 200ml의 물로 세척하고 칼람 상에 약 1cm의 수층을 남겨둔다.

2) IRC-50 칼람 : 직경 1.5cm, 길이 약 30cm의 콕크부 칼람용 유리관의 하부에 유리솜 소량을 채우고 이것에 IRC-50을 기포가 생기지 않게 30ml 충전하여 이것을 약 100ml의 물로 세정하고 칼람상에 약 1cm의 수층을 남겨둔다.

3) IRA-68칼람 : 직경 1cm, 길이 약 30cm의 칼람용 유리관의 하부에 유리솜 소량을 채우고 이것에 IRA-68을 기포가 생기지 않도록 10ml 충전하여 이것을 약 100ml의 물로 수세하고 칼람 상에서 약 1cm의 수층을 남겨둔다.

제 5절 사용균주, 배지 및 배양조건

시험균 : S-4 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)

배지 : 펩톤 5.0g, 육엑스 3.0g, 한천 15.0g, 멸균후의 pH 8.0

제 6절 시료의 분석

1. 검액의 제조

육세절기로 수회 세절한 식육 100g에 추출액 300ml을 가하여 완전히 균질화한 후 이것을 다시 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 추출하고 침전물에 다시 물 100ml를 가하여 추출을 반복하고 똑 같이 원심분리한다. 상층액을 합하여 필요에 따라 여과한다. 이곳에서 얻어진 추출액에 동량의 메타놀을 가하여 냉장고에서 1시간 이상 방치후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 가지형 flask중에 옮기고, 원심분리관 중의 침전물에 동량의 메타놀을 가하고 잘 교반하여 다시 원심분리한다. 이와 같은 조작을 2회 반복하여 침전물을 충분히 세정한다. 세액을 합한 상층액에 1N NaOH 용액을 가하여 pH 7.0로 조정하여 40°C이하에서 감압농축하여 100ml로 하고 다시 동량의 에타놀을 가하여 상기와 똑 같이 처리하여 단백질 등을 제거한다. 상층액과 세액을 합한 것을 농축하여 90ml로 하고 이것을 30ml의 n-hexane으로 2회 추출하여 지방을 제거한다. 에멀존이 생긴 경우는 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 두 층으로 분리하여 그 상층액은 버린다. 여기서 얻어진 용액을 1N NaOH를 사용하여 pH 8.5로 조정하여 30ml의 클로로포름으로 2회 추출한다.

클로로포름으로 추출후 수층에 인산(85%)을 가하여 pH 4.0로 조정하여 이것을 XAD-2칼람에 옮겨 100ml/hr의 속도로 흘려 테트라사이클린을 흡착시킨다. 칼람을 물 100ml을 사용하여 동일속도로 세정하여 앞의 유출액에 합하여 pH8.0로 조정하여 아미노글리코사이드계의 검액조제용 용액으로 한다.

용출액을 먼저 IRC-50칼람에 240ml/hr의 속도로 흘려서 아미노글리코사이드계를 흡착시킨다. 칼람은 물 100ml을 사용하여 상기와 동일 속도로 세척한다. 이어서 IRC-50칼람의 밑에 그 유출액이 그대로 IRA-68칼람을 통과하도록 칼람을 정착한 뒤 IRC-50칼람에 0.1N HCl 100ml을 150ml/hr의 속도로 흘린다. IRA-68 칼람으로 부터 유출액을 가지형 플라스크에 모으고 칼람은 다시 물 20-30ml로 세정하여 세액을 완전히 유출시킨다. 이 유출액을 모두 합하여 40°C이하의 수욕상에서 건조하여 얻어진 잔사를 메타놀 0.5ml에 가온 용해시켜 이것에 인산칼륨완충액 4.5ml를 가하여 필요에 따라 여과하여 아미노글리코사이드계 분획검액으로 한다.

2. 박층크로마토그래피

실리카겔 60F₂₅₄, TLC 알루미늄판 또는 실리카겔 60F₂₅₄, TLC 플라스틱판 3매에 대하여 상법에 따라 아미노글리코사이드계 분획 검액 20 μ l를 점적하고 그 옆에 동일한 방법으로 만든 대조구 용액을 20 μ l를 점적한다. 건조후 전개용매로 약 10cm 전개하여 박층크로마토그램을 만든다.

3. 마이크로 바이오오토그래피

각형의 페트리디시 평판배지 상에 각 박층크로마토그램 박층면 및 여지크로마토그램을 공기가 생기지 않도록 펴서 붙여 때때로 누르면서 30-60분간 방치후 박층판또는 여지를 떼어내고 배양하여 여기서 얻어진 마이크로 바이오오토그램의 저지원의 Rf치로 부터 아미노글리코사이드계 항생물질의 잔존 여부를 확인한다.

4. 시료의 분석

수입육 판매점으로 부터 구입한 호주산 우유및 미국산 우유를 분석한
결과 대상 항생물질은 검출되지 않았다.

제 4장 수입농산물중 Aflatoxin의 분석

제 1절 Aflatoxin의 개요

식품은 여러 유기물질과 풍부한 영양성분을 함유하고 있기 때문에 근본적으로 곰팡이의 성장에 적합한 조건을 갖추고 있다. 곰팡이가 번식하고 있는 식품을 섭취하는 경우에 사람뿐 아니라 동물에 있어 독성을 일으키기 쉬우므로 식품에 기생하는 곰팡이는 식품독성학적으로 매우 중요하다. 더우기 어떤 곰팡이독은 잠정적으로 발암성물질이므로 매우 중요하다. 이러한 곰팡이독 가운데 aflatoxin은 heterocyclic 구조로 산소를 포함하고 bisdifurano환을 가지는 mycotoxin group 중 하나이다. 이것은 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus* 중 일부 strain이 생산한다고 알려져 있다. Aflatoxin은 그 분포가 매우 광범위하며 미량으로도 생물학적인 활성을 나타내기 때문에 여러분야에서 그 연구가 이루어져 왔다.

Aflatoxin이 발견된 역사적인 배경을 보면 1960년과 1961년 영국에서 브라질산 땅콩을 사료로 먹인 가금류 수천마리가 폐죽음을 일으킨 turkey X disease라고 하는 병이 발생되면서 연구가 시작되었다. 이 병은 여러 과학자들에 의하여 그 원인이 곰팡이류가 생성하는 독성물질에 의한 것으로 밝혀졌고 이를 aflatoxin이라고 명명하였다. 개개의 aflatoxin은 포유동물에 대하여 급성중독증세 뿐만 아니라 만성적인 중독현상을 일으키며 그중 일부 aflatoxin은 많은 종류의 유기체에 대하여 변이를 일으키고 발암성을 나타낸다. 또한 이들은 인간에게 간암을 일으킬 가능성이 매우 높고 치사율도 매우 높은것으로 알려져 있다.

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus* 종의 일부가 생성하는 것으로 알려져 있으며 이중 현저한 것은 *Aspergillus flavus*인데 이것은 *Aspergillus parasiticus*와 동일한 것으로 간주되고 있다. A.

flavus 종의 많은 strain이 aflatoxin을 생산하는 것은 아니지만 이 집단의 곰팡이는 탄소함량이 높은 기질이 제공되면 여러 온도범위에서 성장이 가능하므로 자연계에 치명적인 오염을 일으킨다. 생물학적인 활성을 지니는 수준의 aflatoxin을 지니고 있는 식품을 보면 보리, 콩, 옥수수, 면실, 쌀, 밀과 땅콩류 등이다. 또한 aflatoxin은 브라질호두, 피스타키오, 아몬드, 호두, 피칸, 등에도 함유되어 있고 심지어는 우유속에도 aflatoxin이 들어있다고 한다. 자연계에서 aflatoxin을 생성시키게 하는 가장 중요한 요인은 고습도에서 고온으로 오래동안 방치하면 발생하고 경작지에서 곤충에 의한 병해도 원인이 될수 있다. 그러나 때로는 다른 종류의 곰팡이에 의하여 aflatoxin이 억제되기도 한다.

제 2절 Aflatoxin의 구조와 화학적성질

Aflatoxin은 화학적인 구조에 의하여 크게 두개의 군으로 나누어 지는데 그 하나는 difurocoumarocyclopentenone series이고 다른 하나는 difurocoumarolactone 이다. 이 들의 이화학적인 성질은 표 3과 같다.

1. Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂

Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ (Fig. 10)는 toxin을 추출할 경우 다른 aflatoxin류 보다 훨씬 많은 양이 존재하며 Nesbitt 등(3)에 의하여 최초로 분리되었다. 이들은 chloroform-methanol(98:2)을 전개용매로 사용하여 silica gel plate상에서 thin layer chromatograph(TLC)로 분리하였다. 이 조건에 의하면 B₁과 B₂는 UV하에서 푸른색(blue)의 형광을 나타내고 R_f치는 각각 0.4, 0.35이었다. Aflatoxin G₁과 G₂는 녹색(green)을 띠는 푸른색형광을 나타내었고 R_f치는 B₁, B₂ 보다 낮아 0.34, 0.31을 각각 나타내었다. 이들 aflatoxin들간의 상호관련성은 UV와 IR spectra에서 서로 비슷하게 나타났다. 원소분석과 질량분광기를 사용하여 분자식을 추정

Table 3. Some physico-chemical properties of the aflatoxins

Aflatoxin	Formula	Mol. wt.	Crystals	M.p. (°C)	Fluorescence under UV light	Rf(x100)*
Difurocoumarocyclopentenone series:						
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	Pale yellow	267 (d)	Blue	56
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	White needles	303-306 (d)	Blue	53
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Yellow plates	240 (d)	Blue	13
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	Colourless rectangular plates:	299 (d)	Blue	40
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Colourless rectangular plates	293 (d)	Blue	30
M _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	Yellow rectangular plates	248 (d)	Turquoise	
Aflatoxicol (R ₀)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	Colourless	1,224-226 II, 233 (d)	Blue	
Difurocoumarolactone series:						
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	Colourless needles	257-259	Turquoise	48
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Colourless needles	237-240	Turquoise	46
G _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	Pale yellow	190 (d)	Turquoise	11
GM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	344	Pale yellow plates	276	Turquoise	12
GM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	Colourless rectangular plates	270-272	Turquoise	
GM _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₉	362	White	195 (d)	Turquoise	
B ₃	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302	White	217	Blue	42

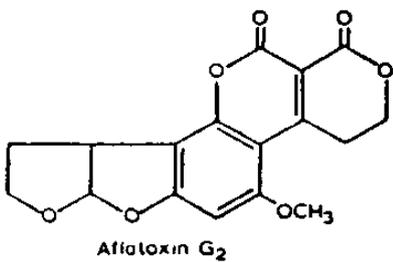
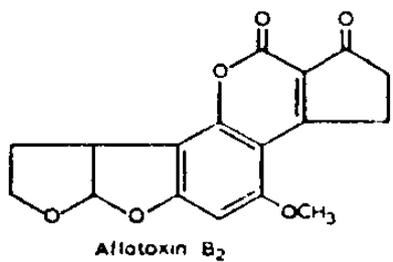
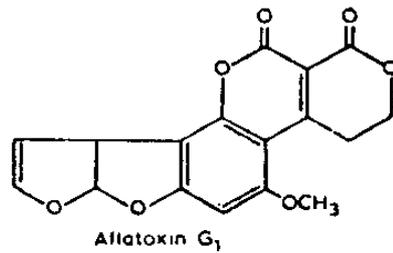
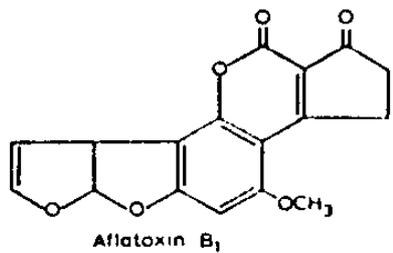


Fig. 10. Structures of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂.

한 결과 B₁은 C₁₇H₁₂O₆, G₁은 C₁₇H₁₂O₇로 각각 나타났다. Merwe 등⁴⁾에 따르면 B₂는 hydrogenation에 의한 B₁의 dihydro 유도체이고 G₂는 G₁의 dihydro 유도체 이었다. 완전한 분자구조는 Asao 등⁵⁾이 spectroscopic 방법을 주로 사용하여 밝혔다. 이 구조는 X-ray 회절에 의하여 확인되었고 aflatoxin B₁에는 두개의 dihydrofuran환의 cis-mode의 융합으로 이루어졌음을 알았다. 이들 구조는 Brechühler 등⁶⁾에 의하여 확인되어 이들의 기하학적인 배열이 확립되었다. Aflatoxin B₂는 aflatoxin B₁을 환원시켜 제조할 수 있는데 이를 근거로하여 그 구조를 밝혔다. Brechbüler 등은 aflatoxin B₁과 G₁의 원편광이색성 (circular dichroism)이 총적가능하다는 것과 Aflatoxin G₂가 G₁으로 부터 hydrogenation에 의해 만들어진다는 사실로 부터 G계열은 aflatoxin B계열과 같은 hydrofuran ring system의 기하학적 구조를 지님을 추론하였다. 또한 aflatoxin B₁과 G₁은 hemiacetal를 형성하며 이들 hemiacetal은 천연의 대사산물인 aflatoxin B_{2a}, G_{2a}와 동일하다.

2. Aflatoxin B_{2a}, G_{2a}

Aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}(Fig. 11)는 *A. flavus*을 배양하면 천연 대사산물로서 생긴다. 이들은 1966년 처음으로 분리되었고^{7,8)} 주요 aflatoxin보다 극성이 높은 chloroform-methanol(98:2)를 사용하여 silica gel의 thin-layer plate상에서 chromatography로써 각각의 hydroxyaflatoxin인 B_{2a}와 G_{2a}를 분리하였다. B_{2a}는 UV하에서 푸른색의 형광을 띠었고 녹색의 형광을 띠는 G_{2a}보다 R_f치가 약간 빨랐다. chloroform을 사용하여 thin-layer plate상에서 순수한 것을 분리하였는데 이들 hydroxyaflatoxin은 공기, 빛, 알칼리 등의 존재하에서 황색의 물질로 분해되었다.

B_{2a}와 G_{2a}는 IR spectra가 B₁, G₂와 다른데 3620cm⁻¹에서 추가된 띠

가 있어 이는 hydroxy group이 존재함을 보여준다. B₁, G₁에 있는 vinyl group에서 부터 나오는 3100, 1067, 722cm⁻¹ 띠가 없는데 이는 이들 화합물이 B₂, G₂의 hydroxy 유도체임을 보여준다. Proton magnetic resonance spectra의 결과 말단의 dihydrofuran ring의 C-2 위치에 hydroxy group이 있음을 보여주었다. Mass spectra data는 B_{2a}와 G_{2a}의 분자식이 C₁₇H₁₄O₇과 C₁₇H₁₄O₈이며 -CHO의 loss를 의미하는 m/e 29의 loss가 관찰되었는데 이는 다른 모든 aflatoxin에서 나타나는 공통된 것이다.

Aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}는 B₁과 G₁의 2-acetoxy-3-hydro 부가물과 동일한 acetyl 유도체를 형성한다. Aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}는 액체배지의 산도를 증가시키면서 *A. flavus*를 배양하면 생성된다. 배지의 산도를 증가시키고 중성의 pH를 유지하면 검출되지 않는다. Aflatoxin B₁과 G₁의 hemiacetal인 B_{2a}와 G_{2a}는 aflatoxin B₁, G₂를 차고 묶은 무기산 용액을 처리하면 만들어진다. B_{2a}의 수율은 10% 황산을 가한 B₁의 아세톤용액을 환류시켰을 때 90% 까지 증가하는데 이를 이용하여 B₁을 확인한다.

Aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}는 적당한 알코올의 존재하의 산용액에서 O-alkyl 유도체를 형성한다. 이러한 O-alkyl 유도체는 aflatoxin의 자연대사산물에 존재하는 외에 알코올이 완전히 제거되지 않은 상태로 chloroform으로서 추출해내는 동안 B_{2a}와 G_{2a}로 부터 생성된다. Methanol에서는 aflatoxin B₁과 B_{2a}는 362nm에서 최대로 흡수된다. Methanol-concentrated ammonia 용액 (14:1)에서는 B₁의 spectrum이 변하지 않지만 B_{2a}는 362nm에서 완전히 흡수띠가 상실되고 404nm에서 강한 흡수띠가 새롭게 형성된다. 이 spectrum의 천이는 용액을 중화시키면 가역적으로 일어난다. 이러한 변화는 phenolate ion이 형성된다는 가정에 의하여 설명되는데 이렇게 형성된 phenolate ion은 공명에 의하여 안정하게 된다.

3. Aflatoxin M₁, M₂

1963년, Allcroft와 Carnaghan⁹⁾은 aflatoxin이 오염된 땅콩으로 사육한 소로부터 얻어진 우유를 오리새끼에게 먹인결과 오리새끼의 간에서 aflatoxin B₁에 의한 간의 손상과 동일한 간의 손상이 일어났다. 이들은 후에 aflatoxin이 함유된 것을 먹인 양에게서도 동일한 우유 toxin이 나타났는데 이를 "aflatoxin M"이라고 명명하였다.

이상의 실험은 Holzapfel 등¹⁰⁾에 의하여 반복되었는데 이들은 혼합된 aflatoxin(B₁, B₂, G₁, G₂)을 양에게 내복약(1mg/kg)으로 먹였다. 내복약을 먹인후 48시간 후에 오줌을 모아 chloroform으로 추출하였다. 추출물을 Merck Kieselgel G chromatoplate 상에서 chloroform-methanol용액으로 전개시켜 새로운 toxin을 분리하였다.

Paper chromatography로써 정제한 결과 자색의 형광을 내는 두개의 성분으로 나타났다. 우유와 오줌에서 분리된 것이 동일하다는 가정하에서 이들을 aflatoxin M₁, M₂(Fig. 12)라고 명명되었다. Holzapfel 등은 미량분석과 질량분광기를 사용하여 aflatoxin M₁의 분자식을 C₁₇H₁₂O₇으로 결정하였다. 따라서 aflatoxin M은 B₁보다 산소량이 더 많다. UV와 IR spectra는 B₁의 것과 유사하였으나 3425cm⁻¹에서 흡수띠를 나타내어 hydroxy group이 있음을 보여준다. Aflatoxin M₂는 dihydroaflatoxin M₁과 동일하며 aflatoxin M₁을 hydrogenation 하면 얻을수 있다. Aflatoxin M₂는 B_{2a}의 천연의 이성체이며 화학적 구조에 있어 말단 furan ring의 C-2위치 대신 C-4위치에 hydroxy group이 있다.

4. Aflatoxin GM₁, GM₂

1967년, Nabney 등¹¹⁾은 aflatoxin G를 먹인 양의 오줌으로부터 푸른색의 형광을 내는 화합물을 분리하였는데 이들은 hydroxylated aflatoxin G로 생각되었다. 같은 해에 Purchase 등¹²⁾은 쥐의 오줌으로

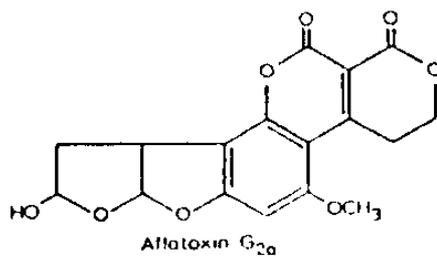
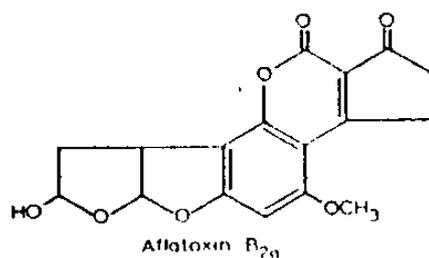


Fig. 11. Structures of aflatoxin B_{2a}, G_{2a}.

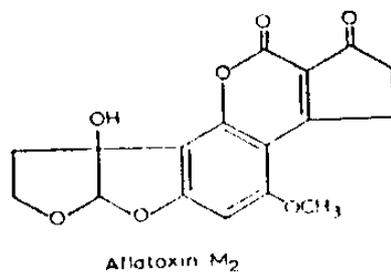
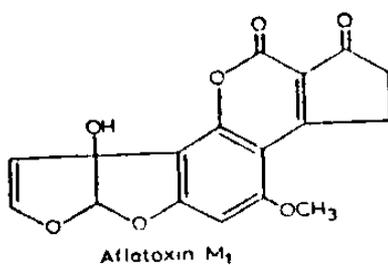


Fig. 12. Structures of aflatoxin M₁, M₂.

부터 동일한 물질이 분리됨을 보고하였고 "GM"이라고 명명하였다. Heathcote 등⁸⁾은 *A. flavus* 배양유체로 부터 얻은 추출물을 TLC 상에서 분리한 결과 M₁ 바로 다음에 녹색의 형광을 내는 물질을 검출하였다. 이 물질을 분리하여 UV와 mass spectra 성질을 관찰한 결과 분자식이 C₁₇H₁₁O₈임을 알았고 GM₁(Fig. 13)이라고 명명하였다. Aflatoxin G₁의 이중결합에 수소를 1mol 부가된 것이 aflatoxin GM₂(Fig. 13)이다.

5. Aflatoxin M_{2a}, GM_{2a}

1973년, Heathcote 등⁸⁾은 *A. flavus* 배양액의 추출물로 부터 두개의 다른 hydroxyaflatoxin을 분리하여 그 특성을 분석하였다. 이 두개의 물질은 분명한 dihydroxyaflatoxin이었는데 이는 각분자의 말단 furan ring에는 C-4위치에 hydroxy group이 있기 때문으로 aflatoxin M에 속한 것이었다. 이 dihydroxyaflatoxin은 aflatoxin 혼합물중 극성분획을 TLC로 분리하여 얻었다. TLC 상에서 빨리 움직이며 UV하에서 푸른색의 형광을 나타내는 분획은 M_{2a}(Fig. 14)라고 부르고 느리게 움직이며 청록색의 형광을 나타내는 분획은 GM_{2a}(Fig. 14)라고 명명하였다. 두 화합물 모두 sulfuric acid를 처리하였을때 aflatoxin이 전형적으로 나타내는 황녹색을 띠었다. 이 화합물의 UV spectra는 aflatoxin B계열 보다는 M 계열임을 보여 주었다. Mass spectra 역시 aflatoxin의 전형적인 mass spectra 특성인 m/e 29의 loss가 있었고 물분자의 loss를 나타내는 m/e 18 과 m/e 36의 loss가 있었다. M_{2a}와 GM_{2a}의 분자량은 346과 362이었으며 IR분석에 의하여 hydroxy group의 존재가 3620cm⁻¹로써 확인되었고 3030과 1060cm⁻¹ 띠의 부재가 있어 vinyl ether system의 부재를 보였다. 분자량은 각각 C₁₇H₁₄O₈과 C₁₇H₁₄O₉이었다.

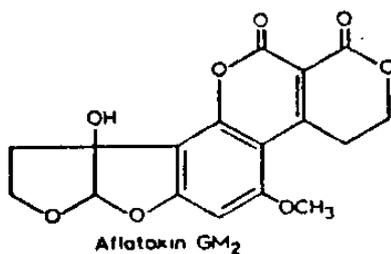
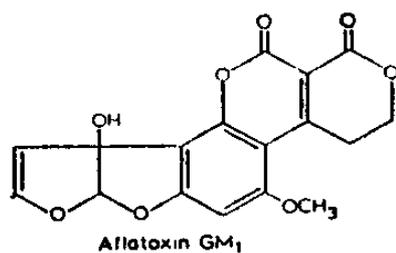


Fig. 13. Structures of aflatoxin GM₂, GM_{2a}.

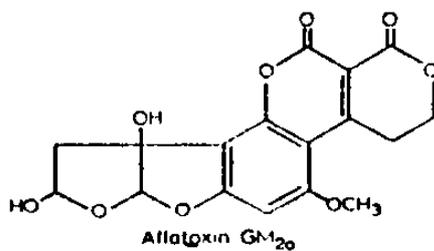
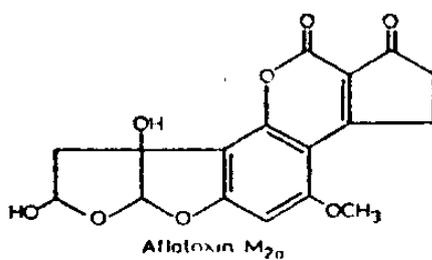


Fig. 14. Structures of aflatoxin M_{2a}, GM_{2a}.

6. Aflatoxin B₃(parasiticol)

이것은 푸른색의 형광을 나타내며 Kieselgel상에서 methanol-chloroform(1:49)를 전개용매로 사용하여 전개하였을 때 aflatoxin G₁과 M₁ 사이의 R_f를 나타내었다. 분자식은 C₁₆H₁₄O₆이고 aflatoxin G₁의 δ-lactone을 가수분해하고 탈탄산시키면 형성된다(Fig. 15).

7. Aflatoxicol

이화합물은 aflatoxin B₁를 여러 미생물이 분해하면 생성된다. 이것은 UV하에서 aflatoxin B₁과 같은 푸른색의 형광을 나타내며 분자식은 C₁₇H₁₄O₆이다. Aflatoxicol과 dihydro 유도체는 닭이나 오리의 간에 있는 효소의 대사작용에 의하여 aflatoxin B₁으로 부터 생산된다. Aflatoxicol(Fig. 16)은 두가지의 기하학적인 모양을 지니며 TLC로써 이 둘을 분리할 수 있다.

8. Aflatoxin P₁

이것은 동물의 대사과정에서 aflatoxin B₁의 O-demethylation에 의하여 미량이 생긴다. 따라서 이것은 phenol이고 주로 glucuronide나 sulphate, phenol의 유리형태로 몇몇 동물의 오줌으로 부터 검출된다. 이것의 구조는 화학적으로 합성하여 구명되었다(Fig. 16).

9. Aflatoxin Q₁

이것은 원숭이의 microsome과 인간의 간의 in vitro상태에서 aflatoxin B₁의 대사산물이다. Aflatoxin Q₁(Fig. 16)은 aflatoxin B₁에 있는 cyclopeteno ring의 carbonyl group의 β 위치에 hydroxy group이 있다. 이것은 aflatoxin B₁ 보다 산소가 하나 더 있으며 pyridine 용매 중에서 acetic anhydride와 acetylation하면 Aflatoxin B₁이 변화되지

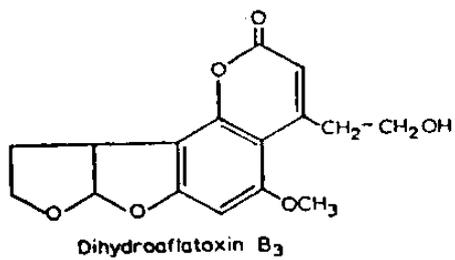
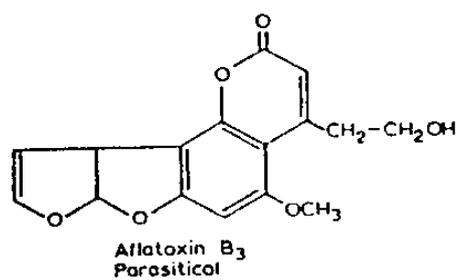


Fig. 15. Structures of aflatoxin B₃.

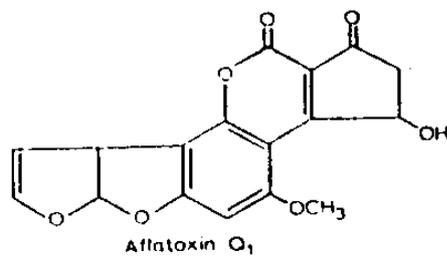
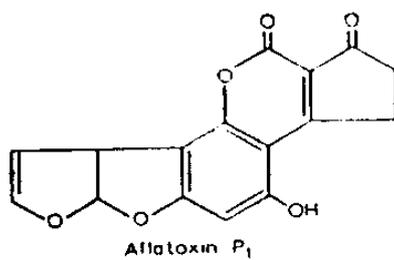
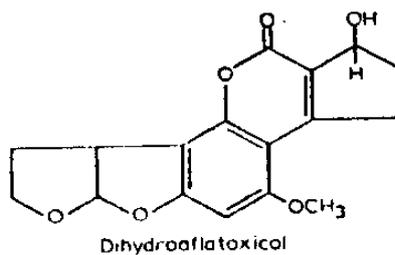
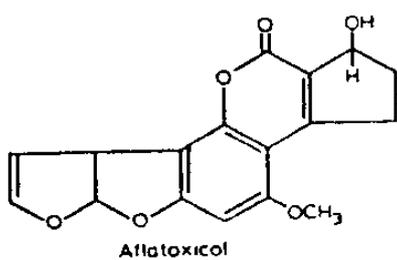


Fig. 16. Structures of aflatoxicol, aflatoxin P₁, aflatoxin Q₁

않은 상태에서 monoacetate를 생성한다.

제 3절 생리적인 활성

Aflatoxin의 화학적인 구조는 이들물질의 생리적인 활성과 매우 상관관계가 있다. 예를들어 aflatoxin B_{2a}와 G_{2a}는 B₁, G₁과 화학적인 구조가 매우 유사하지만 상대적으로 독성이 매우 낮다. 가장 많은 양(1200 μ g of B_{2a}, 1600 μ g of G_{2a})을 새에게 먹였지만 성장하는데 있어 큰차이가 없었고 aflatoxin에 의한 신체적인 손상은 없었다고 한다. 여러가지 실험에 따른 증거에 의하면 화학적인 구조가 조금 달라져도 그활성이 매우 변함을 알 수 있었다. Aflatoxin M₁은 여러동물에 있어 급성 독성을 나타낸다. 생후 1일이 경과된 병아리에 대한 Aflatoxin B₁, M₁, M₂의 LD₅₀은 각각 23 μ g, 16.6 μ g, 62 μ g이다. 쥐에 있어서는 M₁은 B₁과 비슷한 값을 나타내었다. 그러나 aflatoxin M₁에 대한 독성을 보면 발암성은 동물의 종류에 따라서 각기 다르며 B₁ 보다는 상당히 낮음을 알 수 있었다. 이와 같이 aflatoxin은 그 종류와 화학적인 구조, 대상 동물에 따라서 그독성이 매우 다른기 때문에 치사량이나 독성의 한계를 규정하는 것은 그리 쉬운일이 아니며 여러가지 실험을 거쳐 독성의 한계를 설정함이 바람직하다고 하겠다.

제 4절 Aflatoxin의 검출과 분석방법

1. Thin layer chromatography에 의한 방법

1) Aflatoxin의 추출

지방함량이 낮은 시료는 그대로 사용하고 지방함량이 높은 시료는 Soxhlet 장치를 사용하여 petroleum ether나 hexane으로 지방을 제거한 다음 10g을 취하여 250ml의 round flask에 넣어 100ml의 chloroform을 가하고 마개를 한다. 이것을 교반기에서 30분간 교반하고 Whatman No.1 여

과지로써 여과하여 분석에 사용한다.

2) Clean-up

Chromatography 용 칼람(22 x 300mm)의 바닥에 glass wool을 깔고 여기에 5g의 무수 sodium sulfate를 5g 가한다. chloroform이 칼람의 반 가량 차도록 부은 다음 여기에 chloroform에 들어있는 silica-gel을 10g 가한다. silica-gel을 가만히 정체시키고 난 다음 여기에 15g의 무수 sodium sulfate를 가하고 chloroform을 용출시킨다. Chloroform이 충전물의 상부면에 접할때 추출한 시료를 가한다. 추출물은 질소하에서 농축건고하여 가능한 소량의 chloroform을 사용하여 녹인 다음 pasteur pipette으로 시료를 칼람상단에 가한다. Flask 내에 남아있는 추출물에 다시 소량의 chloroform을 가하여 완전히 칼람에 주입한다. 시료를 칼람에 충전한 다음 150ml의 hexane으로 씻어준 다음 150ml의 무수 diethyl ether로써 다시 씻어준다. Aflatoxin은 최종적으로 chloroform-methanol용액 (93:7 v/v) 150ml로 용출한다. 용리액을 미온의 수조중에서 제거한 다음 일정량의 chloroform을 사용하여 녹이고 TLC에서 전개한다.

3) Aflatoxin의 thin-layer chromatography(HPLC)

시료를 20x20cm TLC 판 (silica gel G-HR, Merck)에 입인후 전개용매로 chloroform-acetone(9:1)를 사용하여 전개한다. 시료용액을 chromatoplate에 입인할 경우는 micro syringe를 사용하고 chromatoplate의 하단부에서 2cm 높이에 소량씩 spotting한다. 이때 시료가 입인된 면적은 5mm를 넘지않도록 주의를 요하며 전개조내에서 용매와 평행에 도달하도록 일정시간 동안 방치한 다음 전개를 시작한다.

2. High Performance Liquid Chromatography에 의한 방법

1) 시약 및 사용기기

가) 시약

Acetonitrile : HPLC grade, Merck
Water : HPLC grade, Merck
Chloroform : GR, Junsei Chem. Co.
Sodium sulfate : GR, Merck
Benzene : GR, Junsei Chem. Co.
Methanol : HPLC grade, Merck
Diethyl ether : GR, Aldrich
Sep-pak Silica Cartridge : Waters Asso. Inc.
Aflatoxin standards : Sigma Chem.
Trifluoroacetic acid : GR, Fluka

나) 사용기기

Instrument	Waters Asso. 6000A pump with U6K universal injector
Detector	Fluorescence detector Model 420 excitation 365nm, emission 425nm
Column	μ -Bondapak C ₁₈ (3.9x300mm)
Mobile phase	Water/Acetonitrile/MeOH (6:3:1, v/v/v)
Flow rate	0.7ml/min
Chart speed	0.5cm/min

2) 시료의 처리

가) 추출

시료 50g에 대하여 Methanol/water(80:20)용액 200 ml을 가하여 균질화시키고 이것을 Watman No.2 여과지로 여과한다. 여액을 75ml 취하

고 여기에 증류수 60ml과 포화 ammonium sulfate 15ml, celite 545AR 5g을 가한 후 2분간 교반한다. 이것을 다시 watman No.2 여과지로 여과하고 여액을 100ml이하에 separating funnel로 옮기고 여기에 chloroform 25ml을 3회에 나누어 가하여 aflatoxins을 chloroform으로 추출한다. chloroform층을 모두 모아서 35°C에서 완전농축건고하고 여기에 0.5ml의 hexane을 가하여 녹인다.

나) Clean-up

Sep-pak Silica cartridge를 10ml의 benzene으로 활성화시킨 다음 여기에 시료를 가한다. 먼저 5ml의 hexane으로 씻고, 다음으로 diethyl ether를 5ml가하여 지방분으로 제거하고 chloroform/methanol(90:10) 용액을 20ml가하여 용출한다. 용출액을 모두 모아 감압건고시키고 여기에 50 μ l의 trifluoro acetic acid를 가하여 vortex mixer로써 약 1분간 반응시켜 hemiacetal 유도체를 만든다. 여기에 이동상용매인 Water/Acetonitrile/Methanol (6:3:1)을 0.5ml가하여 HPLC로써 분석한다.

3) HPLC에 의한 분석

HPLC system에서는 순상칼럼(normal phase)이나 역상칼럼(reverse phase)을 사용하며 검출기로써는 UV, fluorescence, mass spectroscopy detector를 사용하여 분석한다. 순상칼럼을 사용하여 분석할 경우에는 대부분 5-10 μ m silica gel column을 사용한다. 그러나 순상칼럼을 사용하여 분석할 경우에는 이동상으로써 포화 chloroform이 사용되는데 이 경우 물로 포화시키기가 용이하지 않고 또한 계속적으로 사용할 경우 silica gel column이 수분을 흡착하기 때문에 분리능이 떨어진다. 따라서 역상칼럼을 사용하는 방법이 여러가지 연구되었는데 이 경우 용출용매의 재현성이 좋다. 역상칼럼을 사용하는 경우는 대부분 5-10 μ m의 octadecyl(C₁₈) column을 사용하며 이동상으로써 water, methanol, acetonitrile을 혼합하여 사용한다.

Aflatoxin은 methanol인 함유된 용액에서는 약 360nm에서 강한 UV 흡수를 일으키고 다른 흡수대는 B₁의 경우 223nm, G₁은 257nm과 243nm, B₂는 220nm, G₂는 245nm와 217nm에서 흡수가 일어난다. 대부분의 UV검출기는 360-365nm의 파장을 이용하는데 그 이유로서 짧은 파장에서는 다른 성분에 의하여 방해받기 때문이다. UV 검출기를 사용하면 1ng의 aflatoxin을 365nm에서 water-acetonitrile-acetic acid(45:55:2,v/v/v)를 이동상으로 사용하여 검출할 수 있다.

한편, aflatoxin은 UV조사하에서 강한 형광을 방출하는데 형광을 내는 강도와 excitation/emission 최대치는 이동상의 조성에 따라서 달라진다. 예를들어 aflatoxin B는 chloroform용액 중에서 aflatoxin G 보다 약한 형광을 내며 aflatoxin B₁과 G₁은 수용액이나 알콜용액 중에서 B₂나 G₂ 보다 훨씬 약한 형광을 낸다. B₁에 대한 excitation 최대치는 acetonitrile과 water 중에서 355-363nm 범위이고 chloroform에서는 415nm, 순수한 물의 경우는 450nm이다. G₁에 대한 excitation 최대치는 B₁과 비슷하지만 emission 최대치는 더 긴 파장에서 나타난다. 이동상과 검출기를 잘 선택하게 되면 picogram까지 소량의 aflatoxin을 검출할 수 있다.

검출기의 감도를 높일 수 있는 방법은 a)형광을 더 많이 내는 물질로 유도체화 시키거나, b)silica gel-packed flow cell을 사용하거나, c)MS 검출기를 사용하는 방법 등이 있다. 또한 laser fluorometric 검출기를 사용하여 감도를 높일 수 있다.

A. 유도체의 제조

Trifluoroacetic acid를 처리하여 precolumn으로 aflatoxin B₁과 G₁의 hemiacetal 유도체인 B_{2a}, G_{2a}로 만든다. 이 유도체들은 물의 함량이 높은 용매속에서 원래의 화합물 처럼 형광이 포접되지 않는다. 이 방법을 사용하면 건조한 시료를 실온에서 동시적이고 정량적인 유도체를 만들수 있

다. 그러나 주의해야할 점은 이들 유도체들은 시간이 경과하면 서서히 분해가 일어나므로 가능한 유도체를 제조한 즉시 분석을 실시하는 것이 바람직하다. Aflatoxin M₁의 hemiacetal은 M₁ 자체 보다 3-4배의 강한 형광을 방출한다.

Fig. 17에는 aflatoxin의 TFA유도체를 만든후 형광검출기를 사용하여 분석한 chromatogram을 나타내었다. 칼람은 역상칼람을 사용하였고 이동상으로는 water/acetonitrile/methanol(6:3:1, v/v/v)을 사용하였다. 분리가 비교적 잘 일어났음을 볼 수가 있었고 0.5ng수준에서 검출과 정량이 가능하였다.

최근에는 aflatoxin과 iodine과의 post-column 반응을 이용하여 분석을 실시하는 방법이 개발되었다. Aflatoxin B₁, G₁은 수용액 상태에서 강한 형광을 나타내는데 이것은 B₂와 비슷한 강도를 나타낸다. Thorpe 등¹³⁾은 60°C에서 5 μ m의 C₁₈ 역상칼람에 post-column iodination을 한후 이동상은 0.01M potassium dihydrogen phosphate(KH₂PO₄)-acetonitrile-methanol (60:20.5:17.5, v/v/v)을 사용하여 분석하였다. Iodination 반응은 3050x0.25mm 코일에서 60°C로 하였고 iodine용액의 유속은 0.11ml/min으로 하였다. 이 때 B₁, G₁의 형광강도는 50배 증가하였고 B₂, G₂의 강도는 변하지 않아 0.2ng의 aflatoxin을 검출할 수 있었다. 이 방법은 동물사료 중의 aflatoxin의 함량을 측정하는데 이용할 수 있었다. 역상칼람을 사용한 HPLC분석은 보통 C₁₈칼람과 acetonitrile/water(3:7, v/v)을 이동상으로 하여 분석한다. Iodine-water 시약의 유속은 0.4ml/min으로 하고 3000x0.5mm의 PTFE 반응코일을 사용한다. 칼람과 반응코일은 60°C를 유지한다. 이러한 방법으로 0.05ng의 aflatoxin B₁을 검출할 수 있으며 옥수수가루에서 약 1 μ g/kg의 수준 까지 검출할 수 있다. Thiel 등¹⁴⁾은 post-column iodination기법과 역상칼람을 사용하여 옥수수, 땅콩 등에서 aflatoxin을 검출하였다. 이들은 3 μ m C₁₈ column과 0.01M

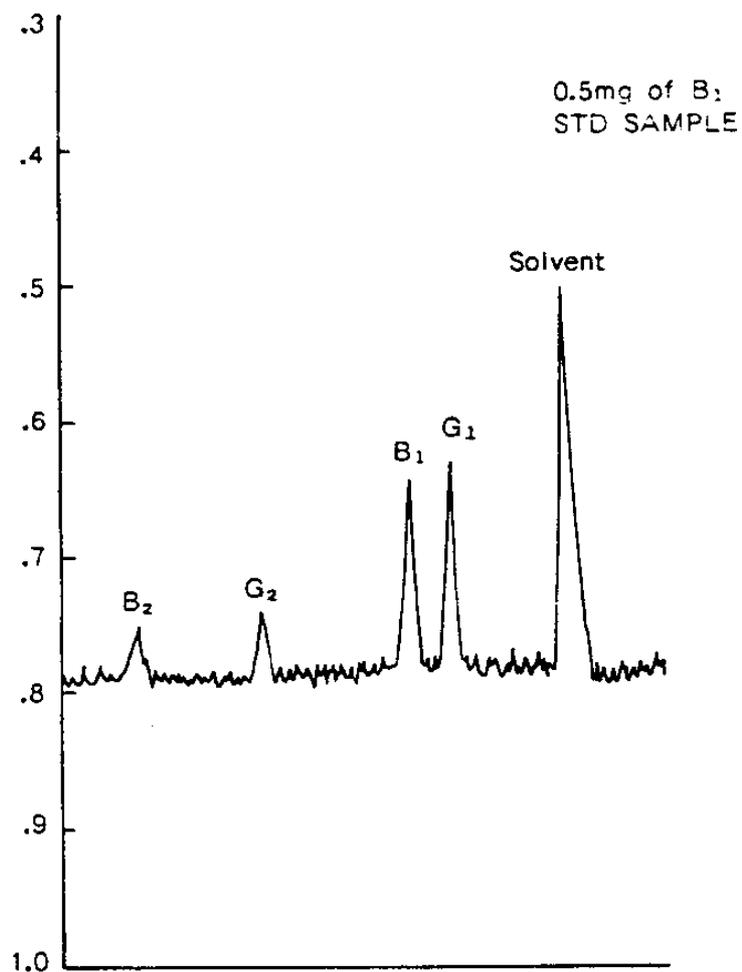


Fig. 17. HPLC chromatogram of aflatoxin mixture. G₁, B₁: 0.5ng, G₂, B₂: 0.15ng, Column : μ Bondapak C₁₈, Flow rate: 0.7ml/min, Mobile phase : H₂O : CH₃CN : CH₃OH C6: 3 : 1, v/v), Detector : Fluorescence, ex: 365nm, em : 425nm.

KH₂PO₄-acetonitrile-methanol (39:9:7, v/v/v)을 이동상으로 10670x 0.34mm 반응코일을 사용하여 분석하였다. 칼럼과 코일은 60℃를 유지하였는데 최적 유속은 이동상의 경우 0.6ml/min, 반응시약은 0.3ml/min 이었다. 유속을 증가시켜 이동상의 유속을 1.0ml/min, 시약의 유속을 0.4ml/min으로 하였을 때 분석시간은 7분 가량 빨라졌으나 형광물질의 강도는 거의 변하지 않았다. 형광검출기의 excitation과 emission을 365, 440nm로 하였을때 aflatoxin B₁을 약 6pg 까지 검출할 수 있었다.

B. Silica gel-packed flow cell

형광을 이용한 검출방법에 silica gel이 충전된 flow cell을 사용하면 감도를 높일 수 있다. 이 방법은 특히 역상칼럼을 사용하여 분석할 때 좋은 결과를 나타내며 이 기법을 이용하여 옥수수, 땅콩, peanut butter, 소간(B₁, M₁), 우유제품(M₁) 등에 들어 있는 aflatoxin을 검출하는데 매우 유용하다. Panalaks 등¹⁵⁾은 5cm x 2mm 크기의 borosilicate를 사용하여 silica gel-packed flow cell을 만들었으며 5μm의 silica gel column과 이동상으로써chloroform(water-saturated)-cyclohexane-acetonitrile-ethanol (250:75:10:2.5, v/v/v/v)을 사용하였다. Venting valve를 형광검출기 앞에 설치하여 칼럼에서 분리가 한번 일어난 것은 flow cell로 지나가도록 하였다. 땅콩버터에 일정량의 aflatoxin을 가한 후 그 함량을 측정하였을 때 ng 이하의 양도 검출 가능하였다. 충전한 flow cell의 감도는 이동상 중에 있는 protone-donator인 ethanol을 제거함으로써 높일 수가 있다. Flow cell의 수명은 시료를 20회 정도 주입할 수 있다. Cell은 극성용매를 사용하여서는 다시 회복시킬 수 없다. Aflatoxin을 역상칼럼으로써 분석하는 기법중 flow cell을 이용하는 방법은 post-column 유도체를 만드는 효율적인 기법을 많이 사용하기 때문에 현재는 그 관심이 줄고 있다.

C. Mass spectrometry(MS)

MS를 사용하여 여러가지 종류의 aflatoxin을 확인하는 기법이 시도되고 있다. 이 기법에는 electron impact(EI), field desorption(FD), negative ion chemical ionization(NICI), 사중극자 MS-MS 등을 이용한다. 이 방법은 실험실에서도 행해지고 있는데 예를들어 구운 땅콩, 면실, 생강뿌리 등에 있는 aflatoxin B₁을 확인하는데 이용된다. 추출한 시료를 acidic alumina column, preparative TLC, 또는 TLC상에서 이차원 전개를 하여 clean-up을 행한다. NICI mode에서는 2-methylpropane 시약기체를 사용하여 MS에 직접 주입한다. 이러한 방법은 성분의 확인 뿐만 아니라 그 함량을 측정할 수 있기 때문에 현재 여러가지 각도에서 연구되고 있어 좋은 결과가 기대된다. MS를 이용한 분석 방법 이외에 비교적 최근에 이용되고 있는 방법으로서 Laser fluorometry 방법이 있는데 이것은 325nm He-Cd ion laser beam으로 형광검출기내를 조사하여 시료중의 aflatoxin을 검출해낸다.

제 5절 Aflatoxin에 대한 대책

Aflatoxin에 대한 우려는 우리나라를 비롯한 미국산 옥수수를 수입하는 모든 나라에서 공통된 것이다. 멕시코나 아프리카와 같은 후진국에 있어서는 자체검사능력과 시설이 되어 있지 않은 관계로 aflatoxin에 대하여 쉽게 노출이 된다. 일본의 경우는 이미 식품용으로 수입되는 미국산옥수수에 있어서 aflatoxin함량이 10ppb를 넘을 경우는 수입을 금지하고 있다. 허용치가 이와 같이 낮은 이유는 수송도중에 곰팡이 등에 의하여 2차적인 오염이 발생하여 확산할 가능성이 있기 때문이다.

Aflatoxin에 대한 이와같은 여러가지 문제가 사회적인 관심으로 대두되자 최근 보건사회부에서는 1989년 5월 식품중의 aflatoxin의 함량에 대한 기준과 규격을 정하여 발표한바 있다. 이에 따르면 곡류, 두류, 땅콩 및 단순가공품에 있어 aflatoxin B₁이 10 μ g/1kg 이하로 허용하였는데 이 기준은 WHO/FAO에서 정한 30 μ g/1kg 보다는 낮으나 각국에 있어 aflatoxin

의 허용 기준인 오스트리아($15\mu\text{g}/1\text{kg}$), 일본($10\mu\text{g}/1\text{kg}$) 보다는 허용한계가 높은 실정이다. 뿐만 아니라 aflatoxin B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ 등도 발암성이 상당히 문제가 됨에도 불구하고 이에 대한 규제가 없는 것은 앞으로 적지않은 논란의 대상이 되리라고 사료된다.

Aflatoxin에 대한 최근의 관심은 수입개방정책에 따른 외국농산물의 다량 수입과 국내농산물의 과잉생산 등의 정책적인 요인과, 적절하지 못한 기후 조건이나 보관운반상태의 불량 등 환경적인 요인, 국민소득의 증가에 따른 식품의 위생적인 처리에 대한 요구과 더불어 여러가지 복합적인 요인에 의하여 생기게 되었다. 식품중의 aflatoxin은 일단 한번 발생하게 되면 그것을 제거하는 것이 매우 힘들 뿐만 아니라 경제적인 손실이 막대하기 때문에 원료가 되는 곡류에서 곰팡이가 발생하지 않도록 조치하는 것이 무엇보다도 중요하다. 그러나 기후의 영향에 의하여 인위적으로 조치를 취하기가 어려운 경우에는 오염된 원료를 수거하여 이것을 폐기 처분하는 것이 필요하며 이를 위하여 원료에 오염된 정도를 정확히 분석 그 위험정도를 평가하는 것이 무엇보다도 중요하다고 하겠다. 이러한 기술적인 면 이외에 독성물질이 곰팡이 등에 의하여 원료에 생기는 것을 방지하기 위하여 수확된 원료에 대한 적절한 조치를 하여야 한다. 즉 식품중에서 곰팡이가 생육하는데는 무엇보다도 적절한 수분활성도가 유지되어야 하기 때문에 수확된 곡류의 수분활성도를 먼저 낮추어야 한다. 따라서 곡류는 수확후 가능한 빨리 건조하여 보관하는 것이 aflatoxin을 생성하는 곰팡이를 방지할 수 있는 방법중 한가지이다. 식품의 경우는 가능한 낮은 온도에서 대기의 상대습도가 낮은 상태로 저장하는 것이 좋으며 곡물수확기에 장마, 일광부족등 이상기후를 만나면 곰팡이의 침해를 방지하기 위하여 유효한 농약을 살포하던가 훈증을 하여 농작물의 변질을 적극적으로 방지할 필요가 있다. 일반적으로 상식하고 있는 된장이나 간장, 치즈, 버터 등의 가공식품에서도 곰팡이의 발생이 용이하므로 이와같은 식품도 가능하면 저온에서 보관하거나 직사광

선을 쪼여 곰팡이의 번식을 억제하는 것이 좋다¹⁶⁾.

또한 국내에서 소비되고 있는 여러가지 가공식품에 대한 aflatoxin의 연구가 일부 이루어져 있으나^{17, 18, 19)} 아직 충분하다고 볼수는 없다. 이는 우리나라의 기후조건이 농산물에 곰팡이가 쉽게 발생할 정도로 악조건이 아니기 때문으로 생각되지만 외국에서 수입되고 있는 여러가지의 곡류에 대한 aflatoxin 함량의 정확한 분석으로 수입곡류에 대한 안전성을 확보하여야 하겠다. 특히 사료에 함유되어 있는 aflatoxin은 동물의 섭취에 의하여 그 독성이 그대로 유지된채 배출되므로 우유나 그 가공품에 대한 정밀한 조사가 이루어져야 하겠다. 뿐만 아니라 동물의 간이나 계란 등에도 오염될 가능성이 충분하므로 이에 대한 엄격한 관리가 요구된다. 이를 위하여 국내에서도 aflatoxin의 발생여부를 엄격히 조사할 수 있도록 분석기법의 습득과 분석을 위한 필요한 장비의 적절한 보완책이 절실하다고 하겠다.

문헌

1. Averall, P.R., and M.V. Norris : *Analytical Chemistry*, 20, 753 (1948)
2. Anderson R.J., J.S. Thorton, C.A. Anderson, and D.B. Katague : *J. Agric. Food Chem.*, 14, 619(1966)
3. Suffet, I.M., S.D. Faust, and W.F. Carey : *Eviron. Sci. Techol.*, 1, 639 (1963)
4. van der Merwe K.G., L. Fourie and B. de Scott : *Chem. Ind.* (London), 1660(1963)
5. Asao T., G. Büchi, M.M. Abdel-Kader, S.B. Chang, E.L. Wick and G.N. Wogan: *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 882(1965)
6. Brechühler G., G. Büchi and G. Milne: *J. Org. Chem.*, 32, 2641(1967)
7. Dutton M.F., and J.G. Heathcote: *Biochem. Soc. Proc.*, 101, p21(1966)
8. Dutton M.F., and J.G. Heathcote: *Chem. Ind.* (London), 418(1968)
9. Allcroft R., and R.B.A. Carnaghan: *Vet. Rec.*, 75, 259(1963)
10. Holzapfel G.W., P.S. Steyn and I.F.H. Purchase: *Tetraheron Lett.*, 25, 2799(1966)
11. Nabney J., M.B. Burbage, R. Allcroft and G. Lewes: *Food Cosmet. Toxicol.*, 5, 11(1967)
12. Purchase I.F.H., M. Steyn and T.C. Gilfillan: *Chem. Biol. Interact.*, 7, 283(1973)
13. Torpe, C.W., G.M. Ware, and A.E. Pohland : In Proceedings of

the Vth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (W. Pfannhauser and P.B. Czedic-Eysenberg, eds.), Vienna Technical University, Vienna, p52(1982)

14. Thiel, P.G. S. Stockenstrom, and P.S. Gathercole : *J. Liquid Chromat.* 9, 103(1986)
15. Panalaks, T. and P.M. Scott : *J. Ass. Off. Analyt. Chem.*, 60, 583(1977)
16. 한국경제신문 : 제7888호 1983년, 3월, 4일자.
17. 이태녕, 이상규 : 식품중 유독성 대사산물에 관하여(제 1보). 수종의 한국대두발효식품중 Aflatoxin유무의 검색에 관하여, 1(1), 78(1969).
18. 이관영, 김영배, 이서래 : *Aspergillus flavus*로 오염된 저장곡류에서 의 Aflatoxin 생성, 7(1), 7(1975).
19. 이철준, 김영배 : *Aspergillus flavus*에 의한 쌀에서의 Aflatoxin생성에 미치는 고오지 곰팡이의 영향, 21(5), 721(1989).

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정 연구개발 사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.