

High Performance Liquid Chromatography를 이용한 국내 시판 사과 주스의 Patulin 분석

조완일 · 최영봉 · 문태화
서울대학교 식품공학과

Determination of Patulin in Commercial Apple Juice in Korea by High Performance Liquid Chromatography

Wan Il Cho, Young Boong Choi and Tae Wha Moon

Department of Food Science and Technology, Seoul National University

Abstract

Seven brands of commercial apple juice in Korea obtained from local stores were analyzed for patulin. Sep-Pak silica cartridge purification of the extract by ethyl acetate offered a good separation of patulin from other components. Patulin was determined by reverse phase liquid chromatography using a J'sphere 4 μm ODS-H80 column with an ultraviolet detector set at 274 nm. Patulin concentrations in four samples ranged from 4 to 20 $\mu\text{g/L}$ and the other three samples from 30 to 45 $\mu\text{g/L}$. The limit of detection was 3 $\mu\text{g/L}$, and the recovery was 80~90% at the contamination level of 3.78~125.9 $\mu\text{g/L}$.

Key words: patulin, apple juice, high performance liquid chromatography

서 론

생활수준이 향상됨에 따라 식품의 안전성에 대한 관심이 높아졌으며 각종 유해물질의 최대잔류허용량 확립을 위한 정부의 노력이 계속되고 있다. Patulin은 사과 부패균인 *Penicillium expansum*을 포함한 30속 60여 종의 곰팡이들이 생산하는 미생물독소^(1,2)로서 쥐에 피하 주사시 중앙을 유발시키며⁽³⁾ 또한 *Saccharomyces cerevisiae*의 돌연변이 유발⁽⁴⁾, 닭의 기형발생 등도 보고되었다^(5,6). 그러나 patulin이 인간에 유해한지에 대한 독성학적 자료는 보고된 바 없다⁽⁷⁾. Patulin은 주로 사과 주스를 포함한 사과 제품에서 발견되어^(1,8) 유럽 각국의 보건당국⁽⁹⁾ 및 세계보건기구⁽¹⁰⁾는 50 ppb를 사과 주스에 대한 patulin의 최대허용농도로 정하여 사과 주스 가공에 사용되는 사과의 품질평가 기준으로 삼고 있다. 우리 나라에서 최근 천연 과즙음료의 소비가 증가하는 추세를 고려할 때⁽¹¹⁾, 사과 주스에 함유된 patulin의 허용기준 및 분석방법의 확립이 필요한 시점으로 생각된다. 사과 주스의 patulin 분석에 대해서는 thin

layer chromatography⁽¹²⁾, gas chromatography⁽¹³⁾, high performance liquid chromatography^(14,15) 등을 이용하여 검출한계 향상 및 분석시간을 단축시키기 위한 연구가 보고되어 있으나, 이에 대한 국내 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 이 연구에서는 국내에서 시판되는 사과 주스 7가지 제품에 대해 high performance liquid chromatography를 이용하여 patulin의 함량을 조사하고, 사용한 분석방법의 patulin 검출한계를 측정하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 사과 주스는 제품 명이 다른 7개 제품으로 과즙 함량 30% 1종, 80% 1종, 100% 4종의 국산제품 6종과 과즙 함량 75% 이상의 외국제품 1종을 96년 1월부터 3월에 걸쳐 인천광역시와 수원시내의 백화점 및 가게에서 구입하였다.

Patulin 표준물질 및 시약

Patulin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 10 mg을 acetonitrile 10 mL에 녹여 1,000

ppm patulin 표준용액을 제조하였고, acetonitrile로 희석한 100 ppm, 10 ppm 표준용액과 함께 -20°C에서 보관하였다. HPLC 분석시 water-tetrahydrofuran (THF) (99+1)용액으로 희석하여 10, 1, 0.1 ppm patulin용액을 만들어 사용하였고, 사용 직전에 각 patulin 용액의 농도를 AOAC 방법⁽¹⁶⁾으로 계산하여 보정하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$\mu\text{g patulin/mL} = (\text{A} \times \text{MW} \times 1,000 \times \text{CF}) / \epsilon$$

여기서 $\text{A}=274 \text{ nm}$ 에서의 흡광도

$\text{CF}=\text{보정상수}$

$\text{MW}=\text{patulin의 분자량 (154 Da)}$

$\epsilon=\text{patulin의 몰 흡광계수 (14,600)}$

추출용매 ethyl acetate와 HPLC분석 전개용매 acetonitrile (HPLC grade)은 Tedia Company, Inc. (Fairfield, OH, USA)에서, tetrahydrofuran (THF)은 덕산 SCIENCE (서울특별시)에서 구입하였다.

사과 주스에서 patulin 추출 및 정제

30 mL 시험판에 사과 주스 5 mL를 넣고 ethyl acetate를 한 번에 5 mL씩 3회 첨가하여 추출하였다. 매 회 추출시 vortex stirrer로 1분 동안 강하게 섞은 후 정 치시켜 두 개의 층으로 분리되면 상층액을 20 mL vial에 옮겼다. 20 mL aliquot vial을 직접 rotary evaporator에 연결하여 45°C에서 건조시킨 후 chloroform 2 mL에 다시 용해시켰다. Chloroform 5 mL로 활성화 시킨 Sep-Pak® Plus Silica Cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA)에 추출액 2 mL를 유속 4 mL/min로 통과시키고 chloroform, chloroform-ethyl acetate (8+2), chloroform-ethyl acetate (5+5)를 각각 1 mL씩 같은 유속으로 흘려 셋은 후, chloroform-ethyl acetate (2+8) 2 mL에 용리되는 부분을 7 mL vial에 취하였다. 45°C water bath에서 vial에 질소가스를 약하게 불어넣어 주면서 건조시켰다. 건조물에 water-THF (99+1)용액을 500 μL 첨가하여 완전히 용해시킨 후, 0.45 μm filter를 통과시켜 HPLC 분석시료로 하였다. 시료 및 표준용액의 1회 분석시 50 μL씩 주입하였다.

HPLC 분석

Samsung HPLC SLC 100 pump, SLC 200 UV-VIS Detector와 J'sphere ODS-H80 (250×4.6 mm I.D., 4 μm, 80 Å, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) column을 사용하여 water-THF (99+1) 용액을 1.0 mL/min 유속으로 흘렸다. 274 nm에서 흡광도를 측정하였고 patulin peak의 면적 대 patulin 농도의 표준곡선을 이용하여

시료의 patulin 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 patulin의 분리 확인

J'sphere ODS-H80 column에서 patulin이 사과 주스의 다른 성분과 분리가 가능한지를 알아보기 위해 patulin을 50 μg/L 농도로 첨가한 사과 주스와 첨가하지 않은 사과 주스 5 mL씩을 동일한 추출과정을 거쳐 분석하였다. Fig. 1은 두 시료의 HPLC chromatogram이다. Patulin은 Sep-Pak 처리에 의해 제거되지 않은 주스 성분의 주요 peak와 다른 retention time에서 peak를 보여 분석이 가능하였다. 유럽 각국과 세계보건기구에서 정한 최대허용 농도가 50 μg/L이고 시료중의 patulin은 본 추출과정을 거쳐 최종적으로 10배 농축되므로 시판되는 사과주스의 patulin 분석에 적합한 것으로 판단되었다.

Sep-Pak cartridge를 이용한 추출물의 정제

Rovira 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 ethyl acetate 추출물을 Sep-Pak 처리하였다. Patulin 추출과정에서 Sep-Pak 처

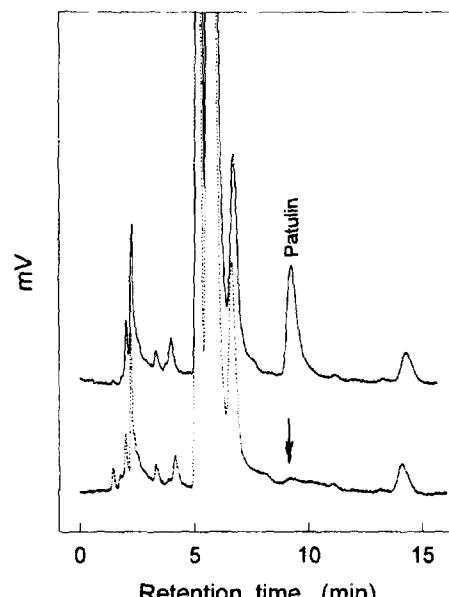


Fig. 1. High performance liquid chromatogram of apple juice sample without addition of patulin (---) and with addition of 50 μg patulin/L (—). The arrow indicates the retention time of patulin. Conditions: column, J'sphere ODS-H80 (250×4.6 mm I.D., 4 μm, 80 Å); mobile phase, 1% (v/v) THF solution at 1 mL/min; detector, 274 nm at 0.001 AUFS.

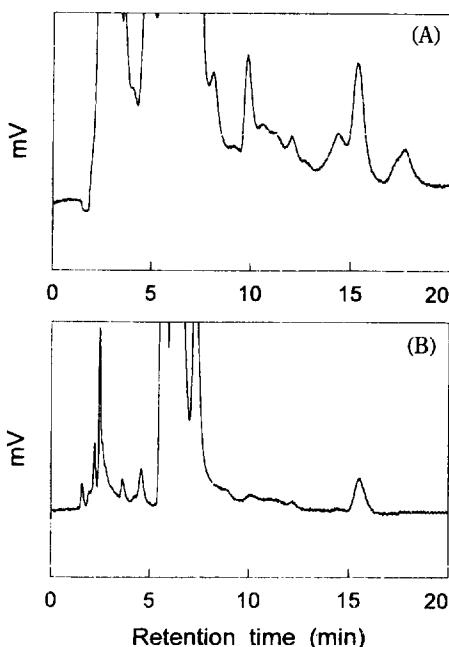


Fig. 2. Effect of Sep-Pak silica cartridge purification.
(A) not treated, (B) treated.

리의 필요성을 검토하기 위해 같은 시료를 Sep-Pak 처리를 한 경우와 하지 않은 경우를 HPLC로 분석하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 정제과정을 거치지 않은 경우(A)는 patulin peak가 검출되는 9~10분 사이에 여러 peak가 존재하여 일정농도 이상의 patulin이 포함되지 않은 경우는 주스 성분과의 분리가 용이하지 않을 것으로 판단되었다.

Patulin 검출한계 및 회수율

Patulin의 농도를 달리하면서 HPLC 분석에서 peak로 인식할 수 있는 한계농도를 측정하였다(Fig. 3). 3 ppb 미만 농도의 patulin 용액은 chromatogram에서 peak의 위치는 확인할 수 있지만 base line의 noise와 차이가 없어 peak로 감지하지는 못했다. 시판 사과 주스의 patulin 분석에서 4.80 ppb의 patulin을 함유한 주스 시료에 검출한계 3 ppb이상의 농도로 네 가지 수준에서 인위적으로 patulin을 첨가한 후, 동일한 추출과정을 거쳐 HPLC 분석을 통해 회수율을 측정하였다. 네 가지 수준에서 80% 이상의 회수율을 보였으며 낮은 수준으로 오염된 경우가 높은 수준의 오염 경우보다 회수율이 높게 나타났다(Table 1). 이상의 결과는 Möller 등⁽¹⁷⁾과 Forbito 등⁽¹⁸⁾의 결과와는 일치하지만 Rovira 등⁽¹⁹⁾의 결과와는 상반되는데, 추출용액의 건조와 용해과정의 반복에서 patulin 함량이 높을수록 손실량

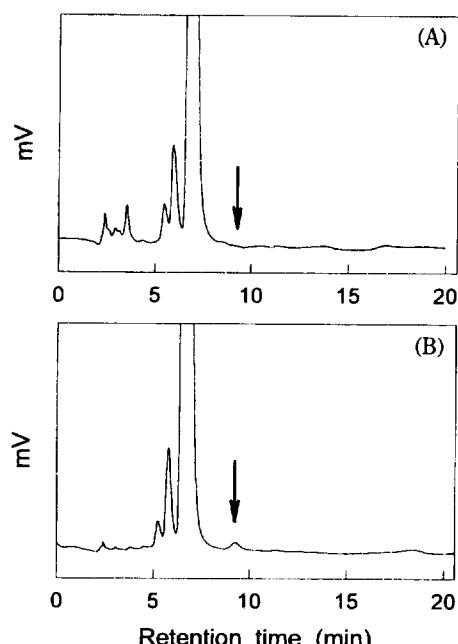


Fig. 3. Chromatogram of apple juice without patulin
(A) and with contamination level of 3 ppb patulin (B).
The arrows indicate the retention time of patulin.

Table 1. Recovery of patulin from spiked apple juice

Sample ¹⁾	Mean (ppb)	SD (n=3)	Recovery (%)
125.90	100.79	5.01	80.06
62.95	51.06	2.44	81.11
25.18	21.56	2.87	85.62
3.78	3.42	0.30	90.48

¹⁾Concentration in spiked apple juice (ppb).

이 클 것으로 보이며 Sep-Pak 처리시 추출액 중의 patulin 농도에 따른 정제효율도 관계가 있다고 생각된다.

식품내 잔류유해물질 검출에는 검출한계 농도, 회수율, 분석 소요시간, 분석과정의 단순성 등이 중요하다. 사과 주스내의 patulin 검출은 사과 주스 50 mL 또는 5 mL를 시료로 하여 3배 부피의 ethyl acetate로 추출하는데 시료를 5 mL 사용하는 경우, 추출용매의 사용량은 10배 감소하지만 회수율이 80%를 넘지 못하는 분석방법이 대부분이다. 회수율에 영향을 주는 요인의 하나로 추출액을 HPLC 분석 시료로 제조할 때 건조와 용해를 반복하면서 각 단계에 알맞은 용기로 추출액을 옮기는 과정에서의 손실을 들 수 있다. 또한 HPLC detector의 안정성과 감도 수준도 간접적으로 회수율에 영향을 끼친다. 이 실험에서는 시료를 5 mL 사용하였

Table 2. Patulin contamination in apple juice from local stores

Sample	Mean (ppb)	SD (n=3)	Sample	Mean (ppb)	SD (n=3)
A	35.85	2.95	E	10.65	0.70
B	19.84	0.41	F	41.90	1.03
C	16.36	0.20	G	43.58	3.56
D	4.80	0.02			

으며 높은 회수율로 patulin을 검출하기 위해 초기 단계에서 Sep-Pak에 의한 정제과정까지 20 mL vial내에서 추출액을 처리함으로써 용기 이동에 따른 patulin의 손실을 최소화하였고, 0.001AUFS (absorbance unit full scale)에서도 base line이 안정한 detector를 사용함으로써 낮은 농도의 검출을 가능하게 했다. Detector의 감도가 떨어지면 낮은 농도의 peak에 대해서는 base line의 noise와 구별할 수 없었다.

시판 사과 주스의 patulin 함량

사과 과즙 74.92%와 당근 25%의 혼합주스인 F 제품(수입제품)과 사과 79.9%, 배 19.97%의 혼합주스인 G 제품(국산제품)의 경우 다른 제품에 비해 높은 patulin 함량을 보였다. 그러나 분석에 사용된 7개의 제품 모두 미량의 patulin을 함유하고 있으며 오염수준의 범위는 4.80~43.58 ppb로 50 µg/L (ppb)이하였다 (Table 2).

Australia, UK, Sweden, USA, New Zealand 등에서 조사한 각국의 시판 사과 주스에 대한 patulin 오염 실태를 보면 50 µg/L을 넘는 제품이 상당수 있는 것으로 보고되어⁽¹⁸⁾ 국내에서 판매되는 국산 및 수입 사과 주스에 대한 폭 넓은 분석이 필요하다고 생각된다.

요 약

7개의 국내 시판 사과 주스제품에 대해 patulin 오염 수준을 분석하였다. Sep-Pak silica cartridge를 이용한 ethyl acetate 추출물의 정제과정은 HPLC 분석시 추출물내의 다른 성분으로부터 patulin의 분리를 용이하게 하였다. Patulin 검출은 J'sphere 4 µm ODS-H80 column을 사용하여 reverse phase HPLC로 274 nm에서 분석하였다. 분석결과 4개의 제품은 4~20 µg/L 수준으로, 나머지 3개 제품은 30~45 µg/L 수준으로 patulin에 오염되어 있었다. 이 분석방법에서의 검출 한계농도는 3 µg/L이며 3.78~125.9 µg/L 오염수준에 대해 80~90%의 회수율을 보였다.

감사의 글

이 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(농 95-8, 식물환경과학분야 거점연구소)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Harrison, M.A.: Presence and stability of patulin in apple products. A review. *J. Food Safety*, **9**, 147 (1989)
- Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Sage, L. and Krivobok, S.: Production of patulin by micromycetes. *Mycopathologia*, **105**, 129 (1989)
- Mayer, V.W.: Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 454 (1969)
- Dickens, F. and Jones, H.E.H.: Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Br. J. Cancer*, **15**, 85 (1961)
- Ciegler, A., Beckwith, A.C. and Jackson, L.K.: Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 664 (1976)
- Matthiaschek, G. and Korte, A.: Studies on the embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins. *Mycotoxin Res.*, **2**, 89 (1986)
- IARC.: Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. In *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, IARC, Lyon, France, Vol. 40, p.83 (1986)
- Stott, W.T. and Bullerman, L.B.: Patulin: a mycotoxin of potential concern in foods. *J. Milk Food Technol.*, **38**, 695 (1975)
- Watkins, K.L., Fazekas, G. and Palmer, M.V.: Patulin in Australian apple juice. *Food Aust.*, **42**, 438 (1990)
- Goto, T.: Mycotoxins: current situation. *Food Rev. Int.*, **6**, 265 (1990)
- 강신수 : 93한국식품연감. 농수축산신문, 서울, p.429 (1993)
- Prieta, J., Moreno, M.A., Blanco, J.L. Suárez, G. and Domínguez, L.: Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin-layer chromatography. *J. Food Prot.*, **55**, 1001 (1992)
- Tarter, E.J. and Scott, P.M.: Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative. *J. Chromatogr.*, **538**, 441 (1991)
- Forbito, P.R. and Babsky, N.E.: Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 950 (1985)
- Rovira, R., Ribera, F. Sanchis, V. and Canela, R.: Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 214 (1993)
- AOAC: *Official Methods of Analysis*, 16th ed., AOAC International, Method 974.18C(d), 970.44A(a), Arlington, VA (1995)

17. Möller, T.E. and Josefsson, E.: Rapid high pressure liquid chromatography of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1055 (1980)
18. Burda, K.: Incidence of patulin in apple, pear, and mix-
ed fruit products marketed in New South Wales. *J. Food Prot.*, **55**, 796 (1992)

(1996년 12월 27일 접수)