

## 밀에서 HPLC에 의한 데옥시니발레놀 분석의 측정불확도 산정

옥현이 · 장현주 · 안장혁<sup>1</sup> · 조재용<sup>2</sup> · 전향숙\*

한국식품연구원 안전성연구단, <sup>1</sup>남양유업(주) 중앙연구소, <sup>2</sup>식품의약품안전청 오염물질팀

### Estimation of Measurement Uncertainty for the HPLC Analysis of Deoxynivalenol in Wheat

Hyun Ee Ok, Hyun-Joo Chang, Jang-Hyuk Ahn<sup>1</sup>, Jae-Young Cho<sup>2</sup>, and Hyang Sook Chun\*

Food Safety Research Center, Korea Food Research Institute

<sup>1</sup>Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation

<sup>2</sup>Food Contaminants Team, Korea Food and Drug Administration

**Abstract** The principal objective of this study was to estimate the measurement uncertainty associated with determination of deoxynivalenol (DON), a mycotoxin generated by *Fusarium* strain, in food. In service of this goal, wheat as a food matrix was analyzed via high performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV) detection using an immunoaffinity column for clean-up. The uncertainty sources in the measurement process were identified by sample weight, final volume, and sample concentration in extraction volume with components including standard stock solution, working standard solution, 5 standard solutions, calibration curve, matrix, and instrument. The expanded uncertainty for DON at a concentration of 300 µg/kg was estimated as 71.62 µg/kg using a coverage factor of two, which provides a confidence level of approximately 95%. The most influential component in the uncertainty sources was the recovery of the wheat matrix, followed by the calibration curve. These results indicate that all efforts may be directed toward reducing the uncertainties of the recovery of the wheat matrix and the calibration curve to obtain a reliable HPLC-UV method for DON analysis in wheat.

**Key words:** deoxynivalenol, wheat, HPLC, uncertainty, immunoaffinity column

## 서 론

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

빈번하게 발생하는 독소로 알려져 있다.

데옥시니발레놀은 국제암연구소(IARC)에 의해 Group 3(인체에 대해 발암성이 있다고 분류할 수 없음)로 분류되어 있으나(2), 데옥시니발레놀이 오염된 곡물을 사람과 동물이 섭취하게 되면 구토, 설사, 체중감소를 일으키고 면역계에 독성을 나타내는 등의 건강상 위해를 나타내는 것으로 보고되고 있다(1,2). FAO/WHO 합동 식품첨가물전문가위원회(JECFA: FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives)는 2001년에 데옥시니발레놀에 대한 위해평가를 실시하여 데옥시니발레놀의 잠정 일일최대섭취허용량(provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI)을 체중(kg) 당 1 µg으로 설정하였다(3). 외국에서는 식품 중 데옥시니발레놀의 안전관리를 위하여 오염실태 조사가 활발하게 이루어지고 있을 뿐만 아니라(4) 일본을 포함한 18개국에서 100-2,000 µg/kg 수준으로 허용한계치를 설정하여 규제하고 있다(5). 그러나 국내에서 식품 중 데옥시니발레놀의 오염실태에 관한 연구는 소수에 불과한 실정이며(6,7), 기준 또한 설정되어 있지 않다.

식품 중 데옥시니발레놀을 분석하는 공인방법에는 밀 중 함량을 측정하는 박층크로마토그래피법(AOAC official method 986.17)(8)과 기체크로마토그래피법(AOAC official method 986.18)(9)이 있고 밀, 엇기름, 보리, 귀리, 옥수수에서 면역친화결합(IAC)을 이용한 액체크로마토그래피법(USDA-FGIS)(10)이 있다. 그러나 이러한 공인된 방법에 의해 식품 중 데옥시니발레놀을 분석할 경우에도 시료 기질(matrix), 시료 전처리 과정, 분석자 또는 분석 기기의 오차로 인하여 결과의 차이가 발생하는 것은 불가피하다.

\*Corresponding author: Chun, Hyang Sook, Food Safety Research Center, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9273

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: hschun@kfri.re.kr

Received April 6, 2009; revised May 20, 2009;

accepted May 24, 2009

최근 곡물을 포함한 식품의 국제무역이 급증함에 따라 식품 중 데옥시니발레놀의 기준치 초과 여부는 매우 중요한 문제로 대두 될 것으로 예상되므로 신뢰성 있는 분석방법이 요구된다.

측정 불확도란 측정 결과의 신뢰도를 나타내는 정량적인 지표로서, 측정 결과에 관련하여 측정량을 합리적으로 추정한 값의 분산 상태를 나타내는 파라미터로 정의할 수 있다. 따라서 높은 정확도가 요구되는 측정일수록 측정 불확도가 표시되지 않으면 측정의 의미를 상실할 수밖에 없다고 할 수 있다. 불확도는 평가 방법이나 표현 방법이 제각기 달라서 모든 나라에서 동일적으로 적용할 수 있는 표현 지침서가 요구되었다. 이에 1993년 국제표준화기구(ISO)에서 시험분석 및 교정결과의 품질에 대한 척도로서 측정 불확도 표현지침(GUM: guide to the expression of uncertainty in measurement)(11)이 제시되었고, 1995년에는 EURACHEM/CITAC Guide가 발간되어 측정 불확도에 대한 수학적, 통계적 이론 및 화학실험에 있어서의 예시가 제시되었다(12). 2000년에는 European Commission에 의해 설정된 허용한계치를 충족시키고 실험결과의 정량적인 평가를 위해 EURACHEM/CITAC Guide가 개정되었다(13). 한편, 우리나라에서도 1998년 한국표준과학연구원에서 측정불확도 표현지침을 발간하였고(14), 2000년에는 한국인정기구(Korea Laboratory Accreditation Scheme)에서 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침서를 발간하였다(15). GUM에 의한 불확도 계산 절차는 측정량(measurand)의 합수 표현, 입력량의 표준불확도(standard uncertainty)의 계산(표준편차, 평균의 표준편차), 합성표준불확도(combined uncertainty)의 계산, 확장불확도(expanded uncertainty)의 계산을 통한 통계적 추정을 하는 것이다.

본 연구에서는 데옥시니발레놀 분석 시 오차요인의 영향을 감소시킨 분석법 확립에 도움이 되게 하고자, 분석에 영향을 미치는 여러 가지 불확도 요인들을 평가하였다. 즉, 밀에 오염된 데옥시니발레놀을 면역친화컬럼으로 정제한 다음 HPLC-자외선검출기로 검출하는 분석법에 있어 각 단계마다 실험오차에 영향을 미치는 요인들을 알아보고, 관계식을 설정한 다음 요인별 측정값으로부터 표준불확도, 합성불확도 및 확장불확도를 산정하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기구

데옥시니발레놀의 표준품은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 acetonitrile, methanol 및 water는 Burdick & Jackson(Muskegon, MI, USA)사에서 구입하였다. 실험결과 검증을 위한 인증표준물질(CRM: Certified Reference Material) BCR-379(Community Bureau for Reference, the Former reference materials programme of the European Commission)은 Institute for Reference Materials and Measurements로부터 구입하여 사용하였다. Immunoaffinity column DONtest WB와 유리섬유여과지 GF/B는 각각 VICAM사(Watertown, MA, USA)와 Whatman사(Maidstone, UK)에서 구입하였다. 데옥시니발레놀의 보관표준용액은 표준물질 5 mg에 acetonitrile 4 mL를 넣어 1.25 mg/mL 용액으로 만든 후 800 µL를 취하여 acetonitrile 4 mL를 가하여 250 µg/mL 농도로 만들었다. 이 용액을 다시 200 µL 취하여 1.8 mL acetonitrile에 녹여 25 µg/mL로 만든 용액의 흡광도(220 nm)를 측정하여 보정함으로써 250 µg/mL 용액의 농도를 보정하였다. 표준용액은 보관표준용액 25 µg/mL를 최종농도가 25, 50, 100, 500, 1,000 ng/mL가 되도록 희석하여 제조하였다.

$$\text{Conc. } (\mu\text{g/mL}) = \frac{1,000 \times \text{abs} \times 296.3 \times 10}{6,400 \times \delta}$$

abs: is the absorbance of the 25 µg/mL solution (220 nm)  
 δ: path length of quartz cell (cm)  
 6,400: molar absorptivity

### 시료 전처리

데옥시니발레놀 분석법은 영국 식품기준청(FSA)의 방법을 다소 변형하여 사용하였다(16). 즉, 구입한 시료 2-2.5 kg을 잘 혼합한 다음 시료 1 kg을 취하여 표준체 No. 20에 60-70%가 통과할 정도로 분쇄하였다. 비이커에 분쇄된 시료 20±0.002 g을 취한 다음 증류수 100±2 mL를 붓고 진탕배양기에서 220 rpm으로 30분 동안 추출하였다. 추출액은 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리시킨 후 유리섬유여과지 GF/B로 여과하였다. 여과액 1 mL를 immunoaffinity column에 넣고 초당 한 방울의 속도로 유출시킨 다음 증류수 5 mL로 컬럼을 세척한 후 주사기로 공기 10 mL를 주입하여 컬럼에 남아있는 증류수를 제거하였다. 그런 다음, 2 mL acetonitrile로 데옥시니발레놀을 천천히 용출시키고 건조한 잔류물을 이동상 0.5 mL에 녹여 0.22 µm membrane filter로 여과하였다.

### HPLC 분석조건

HPLC는 JASCO HPLC system을 이용하였다. 컬럼은 C<sub>18</sub> reverse phase Synergi Hydro RP(250 mm×4.6 mm, 4 µm)를 이용하였고 오븐온도는 40°C로 설정하였다. 이동상은 acetonitrile/water 17/83 (v/v) 혼합액이고 유속은 0.7 mL/min, 검출기는 JASCO UV-975 detector를 이용하여 220 nm 파장에서 분석하였다.

### 회수율 실험

보관표준용액 25 µg/mL를 시료 20 g에 240 µL를 첨가하여 시료에서 데옥시니발레놀 오염농도가 300 µg/kg이 되도록 처리하여 10회 반복 측정하였다.

### 모델 관계식 설정

검량선을 작성하여 시료 중의 데옥시니발레놀 함량을 구하기 위한 식은 (1)과 같이 설정하였다. 전체적인 불확도 요인 및 인자들에 대한 세부내용을 Fig. 1과 같이 도식화하였다.

$$C_s = C_c \times \frac{V_f}{W_s} \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000 \quad (1)$$

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

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

C<sub>s</sub>: Concentration of sample (µg/kg)

C<sub>c</sub>: Concentration of sample in extraction solution (ng/mL)

V<sub>f</sub>: Final volume of sample (mL)

W<sub>s</sub>: Weight of sample (g)

W<sub>Rs</sub>: Resolution of weight of sample

W<sub>Rp</sub>: Repeatability of sample weight

W<sub>c</sub>: Calibration of sample weight

P<sub>ReA</sub>: Purity of deoxynivalenol

F<sub>ReA</sub>: Formula weight of deoxynivalenol

STD: Standard stock solution

STD<sub>25,50,100,500,1000</sub>: Standard 25 ng/mL solution, 50 ng/mL solution,

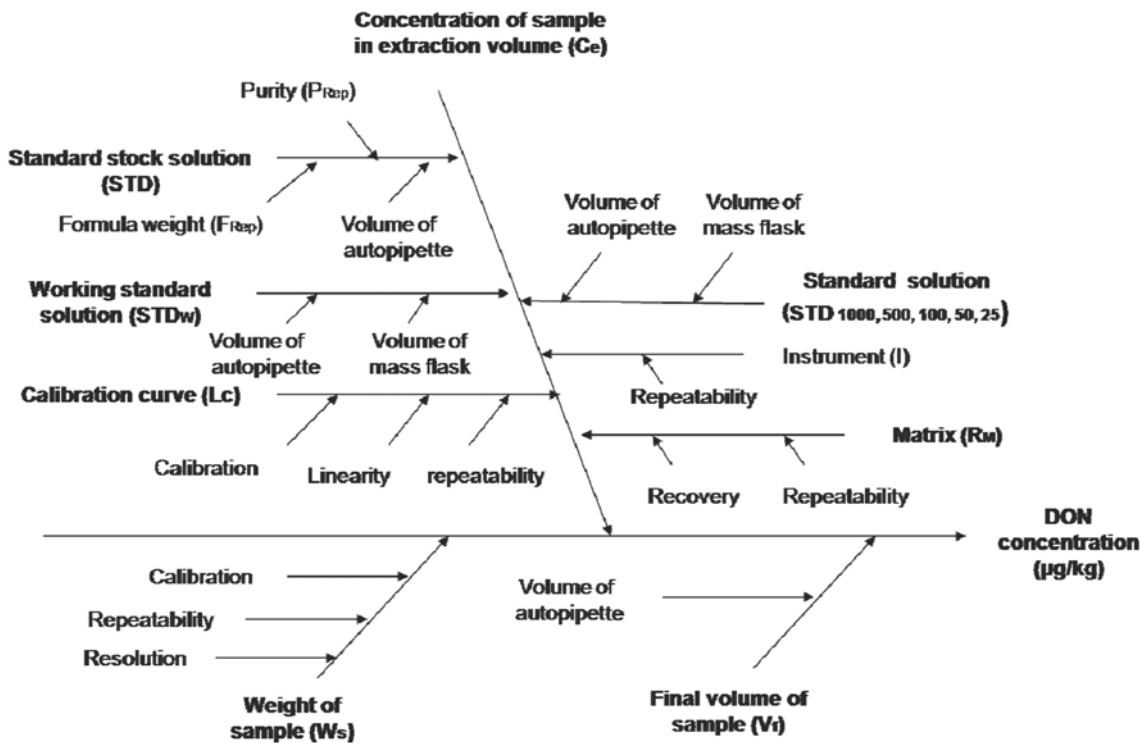


Fig. 1. Fish born diagram of uncertainty factors associated with measurement of deoxynivalenol in food.

100 ng/mL solution, 500 ng/mL solution and, 1,000 ng/mL solution  
 Lc: Linearity of calibration curve  
 I<sub>R</sub>: Reproducibility of instrument  
 R<sub>M</sub>: Recovery of matrix

**요인별 측정값과 표준불확도**

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

$$u(x_i) = \frac{s}{\sqrt{n}} \tag{4}$$

$$u(x_i) = \frac{s_p}{\sqrt{n}} \tag{5}$$

$$s_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^m v_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^m v_i}} \tag{6}$$

**합성표준불확도**

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

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

**확장불확도**

확장불확도는 포함인자 k와 계산된 합성표준불확도를 곱하여 식 (8)을 이용하여 구하였다. 이 때, 포함인자 k의 값은 EURACHEM/CITAC Guide(10)의 방법에 따라 95% 신뢰수준에서 포함인자 k값을 2로 기준하여 확장불확도를 계산하였다.

$$U(y) = k_{uc}(y) \tag{8}$$

**결과 및 고찰**

**시료의 무게 측정 시 불확도**

데옥시니발레놀의 농도 값에는 시료 무게를 측정하는 과정에서 발생하는 불확도 요인이 포함되어 있다. 시료의 측정 과정에서 발생하는 불확도는 저울 자체의 불확도와 반복 측정에서 오는 불확도로 나눌 수 있다. 저울 자체의 불확도는 교정성적서 상의 불확도, 저울의 안정성과 분해능 등의 불확도 요인이 고려되었다(Table 1). 교정성적서 상의 불확도는 95% 신뢰수준(k=2)에서 0.00027g이므로 표준불확도( $U_{certificate}$ ,  $u(W_c)$ )는 0.000135g이 된다. 무게를 반복 측정할 때 발생하는 불확도는 시료의 무게에 해당하는 20g의 분동을 저울로 5일에 걸쳐 5회 반복 측정하여 얻은 값을 식 (5)와 (6)을 적용하여 얻었으며 표준불확도( $U_{repeatability}$ ,  $u(W_{Rp})$ ) 0.000110g을 구하였다. 또한, 저울의 분해능은 0.001g이며 분해능에 대한 표준불확도( $U_{resolution}$ ,  $u(W_{Rr})$ )는 0.000289g이었다. 저울의 합성표준불확도( $u(W_s)$ )는 각 표준불확도에 대한 제곱근의 제곱근으로 0.000497g이며, 상대표준불확도( $u(W_s)/W_s$ )는 0.000017g이었다.

**표준품 순도와 분자량의 불확도**

보관표준용액 조제과정의 불확도는 표준품의 순도, 분자량, 용

**Table 1. Uncertainty sources for the determination of sample weight**

Parameter	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty
( $x_i$ )	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$u(x_i)/ x_i $
$W_c$	-	-	0.000135	-
$W_{Rp}$	2.0	20	0.000110	-
$W_{Rs}$	-	-	0.000289	-
$W_s$	20.0024	20	0.000497	0.000017

액제조에 사용되는 피펫의 요인이 포함된다. 표준품의 순도( $U_{\text{purity}}$ )에 대한 불확도를 산출하기 위해 제품의 규격에서 데옥시니발레롤은 순도에 대한 언급이 되어있지 않으므로 표준불확도( $u(P_{\text{Rep}})$ )와 상대합성표준불확도( $u(P_{\text{Rep}})/P_{\text{Rep}}$ )는 0이다. 한편, 표준품의 분자량은 296.3이고 분자구조식은  $C_{15}H_{20}O_6$ 이다. IUPAC에서 발표된 C, H, O 원자 1개의 불확도는  $\pm 0.008$ ,  $\pm 0.00007$ ,  $\pm 0.0003(12)$ 이고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여  $\sqrt{3}$ 으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.00004 g/mol, 0.00017 g/mol이며, 여기에 원자개수를 각각 곱하면 0.069282, 0.000808, 0.001039 g/mol이다. 원자에 대한 합성표준불확도( $u(F_{\text{Rep}})$ )를 제공합의 제공근으로 계산하면 0.069295이었고 상대합성표준불확도( $u(F_{\text{Rep}})/F_{\text{Rep}}$ )는 0.000234 g/mol이었다.

**표준용액 제조과정의 불확도**

보관표준용액(STD)은 표준물질 5 mg에 acetonitrile 4 mL를 넣어 약 1.25 mg/mL 용액으로 만든 후 800  $\mu$ L를 취하여 acetonitrile 4 mL로 약 250  $\mu$ g/mL로 제조하였다. 이 용액을 다시 0.2 mL 취하여 1.8 mL acetonitrile에 녹여 약 25  $\mu$ g/mL로 제조하고 이 용액의 흡광도를 측정하여 250  $\mu$ g/mL 용액의 농도를 보정하였다. 이 과정에 포함되는 각 마이크로피펫(0.2, 1, 5 mL)의 교정성적서 상의 불확도와 각 부피의 반복 측정 시 불확도, 표준품의 분자량 불확도를 고려하여 보관표준용액의 불확도를 구하였다(Table 2). 0.2와 1 mL 마이크로피펫의 교정성적서 불확도는 각각 0.008, 5 mL 마이크로피펫의 교정성적서 불확도는 0.006 mL이었다. 이 피펫을 이용하여 0.2와 0.8 mL의 표준불확도는 포함인자  $k=2(95\%$  신뢰수준)로 나누면 각각 0.004 mL이고 상대표준불확도는 각각 0.002와 0.005 mL이었다. 1.8, 3.2와 4 mL의 표준불확도는 0.003 mL이고 상대표준불확도는 각각 0.00167, 0.00094, 0.00075 mL이었다. 피펫의 상대표준불확도들과 표준품의 분자량 불확도의 제공합의 제공근인 보관표준용액의 합성상대표준불확도는 0.020718이었다.

$STD_w$ 는 보관표준용액 1 mL를 10 mL 정용플라스크에 취하고 희석하여 조제하였다.  $STD_w$ 의 불확도 요인은 보관표준용액의 불확도와 1 mL 마이크로피펫, 10 mL 정용플라스크에 대한 불확도를 고려해야 한다. 보관표준용액의 합성상대표준불확도는 0.020718이고, 1 mL 마이크로피펫의 교정성적서 상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.008 mL이므로 표준불확도는 0.004 mL이고 상대표준불확도도 0.004 mL이었다. 한편, 10 mL 정용플라스크의 교정성적서 상의 불확도는 95% 신뢰수준에서  $\pm 0.04$  mL로 B type의 삼각형 분포를 가정하여  $\sqrt{6}$ 으로 나누면 표준불확도는 0.016330 mL이다. 정용플라스크의 눈금 맞추기에 따른 시험원의 불확도는 10회 반복 측정 시 표준불확도는 0.005100이고 자유도는 측정횟수가 10회이므로 9가 된다. 또한, 실험실의 온도변화는  $\pm 3^\circ\text{C}$ 이고 물의 부피 팽창계수는 0.00021이다. 따라서 온도변화에 따른 부피의 불확도는  $10\text{ mL} \times 3^\circ\text{C} \times 0.00021$ 이고 신뢰구간이 주어지지 않으므로 직사각형 분포로 간주( $\sqrt{3}$ )하여 이에 따른 표준불확도는 0.003637로 정용플라스크의 합성표준불확도는 0.016330,

0.003637와 0.016130의 제공합의 제공근인 0.023238이고 합성상대표준불확도는 0.002323이었다. 그러므로  $STD_w$ 의 합성상대표준 불확도는 보관표준용액의 불확도 0.020718, 1 mL 피펫의 불확도 0.004, 10 mL 정용플라스크의 불확도 0.002323의 제공합의 제공근인 0.021229이었다.

$STD_{1000}$  용액의 불확도는  $STD_w$ 의 불확도와 0.2와 3.8 mL의 마이크로피펫의 불확도를 고려하여 구하였다. 0.2 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.004 mL이고 상대표준불확도는 0.02 mL이다. 한편, 3.8 mL 마이크로피펫의 표준불확도는 0.003 mL이고 상대표준불확도는 0.000789 mL이다. 그러므로  $STD_{1000}$ 의 합성상대표준 불확도는  $STD_w$ 의 불확도인 0.021229와 0.02, 0.000781의 제공합의 제공근인 0.029177이었다.

$STD_{300}$  용액의 불확도는  $STD_{1000}$  용액의 불확도와 1 mL 마이크로피펫의 2회 사용에 대한 불확도를 고려하여 구하였다.  $STD_{1000}$ 의 불확도는 0.029177이었고 1 mL 마이크로피펫의 불확도는  $STD_w$ 에서 언급했듯이 표준불확도와 상대표준불확도가 각각 0.004 mL이다. 그러므로  $STD_{300}$ 의 불확도는 0.029177, 0.004, 0.004의 제공합의 제공근으로 0.029723이었다.

$STD_{100}$ 는  $STD_{300}$ 용액을 0.8 mL 취하여 4 mL로 희석하여 조제하였고  $STD_{100}$  용액의 불확도는  $STD_{300}$ 의 불확도와 0.8 mL와 3.2 mL 마이크로피펫의 불확도를 고려하였다. 보관표준용액 제조시 불확도에서 언급한 바와 같이 0.8 mL 마이크로피펫의 합성표준 불확도는 0.004 mL이고 상대표준불확도는 0.005이다. 3.2 mL 마이크로피펫은 합성표준불확도는 0.003 mL이고 상대표준불확도는 0.000938이다.  $STD_{100}$ 용액의 불확도는 0.8 mL와 3.2 mL 마이크로 피펫의 불확도인 0.004와 0.005의 제공값,  $STD_{300}$ 용액 불확도인 0.029723의 제공값을 합하여 제공근을 구한 값인 0.030152이었다.

$STD_{50}$ 용액은  $STD_{300}$ 용액 제조 시와 마찬가지로  $STD_{100}$ 용액을 1 mL를 취하여 2배 희석하여 만들었다. 이 표준용액의 불확도는 1 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도인 0.004와  $STD_{100}$ 의 불확도인 0.030152의 제공합의 제공근으로 0.030725이었다.

$STD_{25}$ 용액은  $STD_{50}$ 용액과 같은 방법으로 만들었으므로 2회 사용된 1 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도인 0.004와  $STD_{50}$ 용액의 불확도인 0.030725의 제공합의 제공근을 구한 결과,  $STD_{25}$ 용액의 합성상대표준불확도는 0.031315이었다.

**검량선 작성의 불확도**

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

$$A_j = B_0 + B_1 \times C_j \tag{9}$$

1차 회귀식에서  $C_j$ 는 분석시료의 계산값이고  $A_j$ 는 면적값, 절편인  $B_0$ 는 계산된 공시험값, 기울기  $B_1$ 은 회귀상수로써 분석법의 민감도를 의미한다.

Table 2. Uncertainty budget for the determination of concentration of sample

Parameter	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty	Type of uncertainty
( $x_i$ )	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$u(x_i)/ x_i $	$\sqrt{\sum(u(x_i)/x_i)^2}$	A or B
STD	$P_{Rep}$	100	-	0.0000	0.00000	B
	$F_{Rep}$	296.3	-	0.0692	0.00023	B
	STD v4 mL	4	-	0.0030	0.00075	B
	STD v3.2 mL	3.2	-	0.0030	0.00094	B
	STD v1.8 mL	1.8	-	0.0030	0.00167	B
	STD v0.8 mL	0.8	-	0.0040	0.00500	B
	STD v0.2 mL	0.2	-	0.0040	0.00200	B
STD <sub>w</sub>	STD	-	-	-	0.02071	-
		1	-	0.0040	0.00400	A
		10	9	0.0232	0.00232	B
STD <sub>1000</sub>	STD <sub>w</sub>	-	-	-	0.02122	-
		0.2	-	0.0040	0.02000	B
		3.8	-	0.0030	0.00078	B
STD <sub>500</sub>	STD <sub>1000</sub>	-	-	-	0.02918	-
		1	-	0.0040	0.00400	B
		1	-	0.0040	0.00400	B
STD <sub>100</sub>	STD <sub>500</sub>	-	-	-	0.02972	-
		0.8	-	0.0040	0.00500	B
		3.2	-	0.0030	0.00093	B
STD <sub>50</sub>	STD <sub>100</sub>	-	-	-	0.03020	-
		1	-	0.0040	0.00400	B
		1	-	0.0040	0.00400	B
STD <sub>25</sub>	STD <sub>50</sub>	-	-	-	0.03080	-
		1	-	0.0040	0.00400	B
		1	-	0.0040	0.00400	B
$L_C$	255.35	28	15.9264	0.06237	0.062371	A
$R_M$	0.8510	9	0.0064	0.00757	0.101385	A
	255.29	-	25.8107	0.10110		B
$I$	40960.5	5	0.0077	0.00317	0.000000	A
$V_f$	0.5	-	0.008	0.004	0.008	B
$C_e$	255.29	-	-	-	0.140291	-

검량선은 25, 50, 100, 500, 1,000 ng/mL의 표준용액을 각각 6 회씩 반복 측정하여 작성하였다. 그 결과 상관계수( $R^2$ )는 0.9997, 기울기( $B_1$ )는 165.86, y 절편( $B_0$ )은 -517.71이었다. 공시료에 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 첨가하여 분석한 후 작성된 검량선에 적용하여 얻은 농도는 255.35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 선형 최소제곱법으로 작성한 검량선에 의한 불확도는 다음과 같이 식 (10)-(12)를 이용하여 계산하면 표준불확도는 15.9264  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 상대표준불확도는 0.062371  $\mu\text{g}/\text{g}$ 이었다.

$$u(C_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - C)^2}{s_{xx}}} \quad (10)$$

$$s = \frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 C_j)]^2}{n-2} \quad (11)$$

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

p: Number of measurement to determine

n: Number of measurements for the calibration

$C_0$ : Concentration of deoxynivalenol in the extraction solution

$C$ : Mean value of the different calibration standards

i: Index for the number of calibration standard

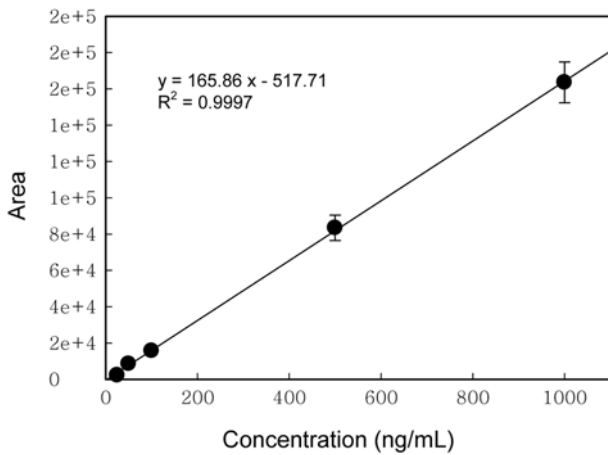
j: Index for the number of measurements to obtain the calibration curve

#### 기기 측정 시 불확도

HPLC를 이용하여 시료를 6회 반복 분석한 결과 평균값은 40960.5이고 상대표준편차는 0.778%였다. A type의 표준오차로 산출된 표준불확도는 표준편차를  $\sqrt{6}$ 으로 나눈 값 0.003176이었

**Table 3. Values and uncertainties for deoxynivalenol analysis by HPLC**

Parameter	Value	Degree of freedom	Combined standard uncertainty	Relative standard uncertainty
( $x_i$ )	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$u(x_i)/ x_i $
$W_s$	20.0024	10	0.000337	0.000017
$V_f$	0.5	-	0.004000	0.008000
$C_e$	255.35	-	-	0.140291
$C_s$	255.29	-	35.814949	0.140291



**Fig. 2. Calibration curve of 5 point standard solutions.**

고, 상대표준불확도는 표준불확도를 평균 면적값으로 나눈  $7.753677 \times 10^{-8}$ 이었다.

**시료의 측정 시 불확도**

시료의 기질에 대한 불확도는 반복 측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구하였다. 밀의 공시료에 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 첨가한 실험을 10회 반복 측정한 결과값은 255.29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었고 상대표준편차는 2.038%, 회수율은 85%였다. 상대표준편차를  $\sqrt{10}$ 으로 나누어 반복 측정의 불확도 0.006445를 구하였고 상대표준불확도는 0.007574였다. 공시료에 첨가한 양에서 결과값의 평균을 뺀 값(44.71)을  $\sqrt{3}$ 으로 나누어 얻은 회수율에 대한 표준불확도는 25.810733이었고 상대표준불확도는 0.101101이었다. 이 두 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근인 합성상대표준불확도는 0.101385이었다.

**최종 시험용액 부피의 불확도**

최종 시험용액 0.5 mL은 1 mL 마이크로피펫을 이용하여 0.5 mL을 분주하였으므로 1 mL 마이크로피펫의 교정성적서 상의 불확도(95% 신뢰수준)가 0.008이었고 표준불확도는 0.004 mL이며 상대표준불확도는  $\text{value}(0.5 \text{ mL})$ 로 나누어 얻은 값인 0.008이었다.

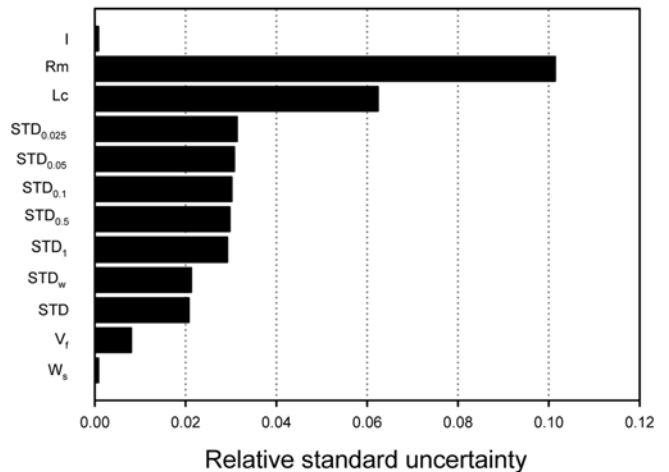
**합성표준불확도**

각 요인들의 합성상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 산출하여 구한다. 즉, 시료량( $W_s$ ) 0.000017, 최종부피( $V_f$ ) 0.008, 보관 표준용액(STD) 0.020718, 표준용액(STD<sub>w</sub>) 0.021229, STD<sub>1000</sub> 0.029177, STD<sub>500</sub> 0.029723, STD<sub>100</sub> 0.030152, STD<sub>50</sub> 0.030725, STD<sub>25</sub> 0.031315, 검량선( $L_c$ ) 0.062371, 매질( $R_m$ ) 0.101385, 기기(I)  $7.753677 \times 10^{-8}$ 의 제곱합의 제곱근인 0.140291이었다(Table 3). 합성상대표준불확도를 시험결과값에 곱하여 합성표준불확도( $u(C_s)$ )를 구한 결과 35.81  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

**Table 4. Value of the measurement uncertainty**

Concentration	Expanded uncertainty	Range of acceptable concentrations <sup>1)</sup>
100 g/100 g	4%	96 to 104 g/100 g
10 g/100 g	5%	9.5 to 10.5 g/100 g
1 g/100 g	8%	0.92 to 1.08 g/100 g
1 g/kg	11%	0.89 to 1.11 g/kg
100 mg/kg	16%	84 to 116 mg/kg
10 mg/kg	22%	7.8 to 12.2 mg/kg
1 mg/kg	32%	0.68 to 1.32 mg/kg
< 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	44%	56 to 144 $\mu\text{g}/\text{kg}$

<sup>1)</sup>This effectively means that values falling within these ranges may be regarded as being of the same analytical population.



**Fig. 3. Contributions of uncertainty factors for deoxynivalenol analysis by HPLC.** I: Uncertainty of instrument,  $R_m$ : Uncertainty of matrix,  $L_c$ : Uncertainty of linearity of calibration curve, STD<sub>w</sub>: Working standard solution, STD: Stock standard solution,  $V_f$ : Uncertainty of final volume,  $W_s$ : Uncertainty of sample weight

**확장불확도**

합성표준불확도에 포함인자  $k=2$ 값을 곱하여 확장불확도를 계산한 결과 확장불확도는 71.62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 산정되어, 최종결과값은  $255.29 \pm 71.62 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 표현되었다. EC에서는 화학적 분석에 있어서 공동연구 결과를 이용할 경우 실험결과에 확장불확도는 Table 4에 표시된 범위에 포함된다면 결과값을 수용하도록 하는 기준을 제시하였고 이 기준은 Horwitz equation이나 modified Horwitz predicted  $\sigma_R$  value에서 유래되었다(17). 본 연구에서의 확장 불확도는 28%로 1 mg/kg 이하 농도(확장불확도 32%)에서 계산된 값이므로 수용할 수 있는 값이라 생각된다.

### 불확도인자의 상대기여도

각 요인이 전체 불확도에 끼치는 영향을 막대그래프로 표현하였다(Fig. 3). 포함된 불확도인자의 상대불확도가 최종 시험결과값에 미치는 영향을 살펴보면 시료무게(0.000017), 최종전량(0.008), STD(0.020718),  $STD_n$ (0.021229),  $STD_{100}$ (0.029177),  $STD_{500}$ (0.029723),  $STD_{100}$ (0.030152),  $STD_{50}$ (0.030725),  $STD_{25}$ (0.031315), 검량선(0.062371), 매질(0.101385), 기기( $7.753677 \times 10^{-8}$ )로 나타났다. 가장 큰 영향을 끼치는 요인으로 매질의 반복측정임을 알 수 있었고 그 다음으로 검량선 작성, 표준물질의 제조였다. 매질에 의한 불확도는 회수율의 재현성 불확도와 회수율 불확도의 상대 불확도를 합성하여 구한 것으로 매질에 따른 불확도의 차이가 있으리라 예상되며 분석함에 있어 회수율 재현성을 높이기 위해 노력해야 할 것이다.

### 시험결과의 소급성

시험결과의 소급성 유지를 위해 인증표준물질(CRM)인 BCR-379(wheat,  $673 \pm 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ )을 이용하여 같은 방법으로 분석한 결과  $683 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 검출되었고 회수율은 101%였으며, 실험에 사용된 표준인증물질의 보증범위에 속하는 결과값으로 나타나 본 실험 결과의 소급성을 확인할 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 밀 시료에서 면역친화컬럼을 이용한 HPLC분석 방법으로 데옥시니발레놀을 분석함에 있어서 발생할 수 있는 측정 불확도를 GUM 지침에 따라 산정하였다. 분석과정에서의 불확도 요인은 시료량 측정, 최종 시료부피, 보관표준용액, 작업표준용액, 표준용액, 기기, 매질, 검량선 작성으로 구분하였다. 불확도 요인의 구성요인은 저울의 안정성, 분해능, 재현성, 표준물질의 순도, 분자량, 농도, 표준용액 희석, 검량선, 회수율 및 분석기기의 재현성 등이 작용하였다. 공시료에 데옥시니발레놀  $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 첨가하여 분석한 결과  $255.29 \pm 71.62 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 측정되었다. 확장불확도는 합성표준불확도  $35.81 \mu\text{g}/\text{kg}$ 에 포함인자( $k=2$ , 신뢰수준 95%)를 곱하여 산출하였다. 밀에서 데옥시니발레놀을 분석함에 있어 불확도에 영향을 주는 주요인자는 시료의 회수율과 검량선 작성인 것으로 파악되었다. 따라서 밀 시료에서 데옥시니발레놀 분석의 정밀성을 높이기 위해서는 회수율과 검량선 작성에 영향을 끼칠 수 있는 면역친화컬럼에 의한 시료의 정제과정과 표준물질의 희석과정에 주의를 기울이고 주기적으로 마이크로펄트를 교정하는 등 세심한 관리가 필요할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구비지원(08072기타사611)에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 문 헌

1. WHO. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO technical report series 906. p. 35-42. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2002)
2. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monograph No. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (1993)
3. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of JECFA. WHO food additives series 47/FAO food and nutrition 74. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2001)
4. CODEX Committee on Contaminants in Foods. Discussion paper on deoxynivalenol. Joint FAO/WHO food standards programme CODEX committee on contaminants in foods. First session. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy (2007)
5. FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO food and nutrition paper 81. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy (2004)
6. Chun HS. Safety evaluation of deoxynivalenol, a Fusarium mycotoxins, in food. Report of Korea Food & Drug Administration. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2007)
7. Pei SC, Lee WJ, Kim SS, Lee YW. Occurrence of deoxynivalenol in Korean barley and barley products. J. Am. Soc. Brew. Chem. 62: 93-96 (2004)
8. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18<sup>th</sup> ed. Method 986.17. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA (2005)
9. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18<sup>th</sup> ed. Method 986.18. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA (2005)
10. USDA. Quantitative test kit for deoxynivalenol for wheat, malted barley, barley, oats, corn. FGIS 2002-104. United States Department of Agriculture, Washington DC, USA (2002)
11. ISO. Guide to the expression of uncertainty in measurement. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland (1993)
12. EURACHEM. Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM, London, UK (1995)
13. EURACHEM. Quantifying uncertainty in analytical measurement 2<sup>nd</sup>. EURACHEM, London, UK (2000)
14. KRIS. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Korea Research Institute of Standard and Science, Daejeon, Korea (1998)
15. KOLAS. Guideline for quantifying and expressing the uncertainty in measurement results. Korea Laboratory Accreditation Scheme, Daejeon, Korea (2000)
16. FSA. Food standards agency information bulletin on methods of analysis and sampling for foodstuffs. No. 59 (2005). Available at: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/059/pdf>. Accessed Dec. 20, 2006
17. EU. Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation, with particular reference to community legislation concerning. Brussels, Belgium (2004). Available at: [http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling-analysis\\_2004\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling-analysis_2004_en.pdf). Accessed June 23, 2008