Application of Competitive ELISA Method for Estimation of Urinary Aflatoxin M1 Level

Yong-Dae Kim* and Heon Kim

Department of Preventive Medicine and Medical Research Institute, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received January 2, 2013 / Revised February 5, 2013 / Accepted February 5, 2013

We compared the efficacy of the competitive ELISA method for measuring the level of urinary aflatoxin M1 (AFM1) with that of the HPLC-fluorescence detector (HPLC-FLD) method. The recovery rate of AFM1 with the ELISA method was 105% (73-124%), and the coefficient of variation of the analysis was 6.85%. The ELISA method showed a 0.20 pg/ml and 0.62 pg/ml limit of detection and limit of quantitation, respectively. In correlation analysis, the two methods showed a very strong and statistically significant correlation ($R=0.96$, $p<0.01$). However, in spite of the strong correlation, the ELISA method tended to overestimate the urinary AFM1 concentration compared to the HPLC-FLD method. These results suggest that the competitive ELISA method may be a useful technique for measuring the AFM1 level in high-throughput urine samples, but it needs to be corrected with a regression equation from regression analysis with the HPLC-FLD method.

Key words : Urinary aflatoxin M1, competitive ELISA, HPLC-fluorescence detector (HPLC-FLD)

서 론

Aspergillus 속 곰팡이가 주로 생산하는 아플라톡신은 곰팡이의 2차 대사물질로서 간에 대한 독성, 특히 발암성이 매우 강한 것으로 알려져 있다[4, 11]. 옥수수, 땅콩, 면실과 같은 곡류, 두류 등의 각종 농산물에서 검출되며 보통의 식품 가공이나 살균처리로는 파괴되지 않는다. 지금까지 화학적 구조가 서로 다른 18종의 아플라톡신이 확인되었으며 thin layer chromatography (TLC)에 의해 자외선 하에서 발현되는 형광의 색에 따라서 B (Blue)군, G (Green)군으로 크게 분류한다[6, 11]. 자연상태에서는 아플라톡신 B1 (AFB1), B2, G1, G2 형태로 주로 존재하며, 이 중에서 가장 독성이 강하고 발생빈도가 높은 것은 AFB1이다[8]. AFB1은 체내로 유입되면 위장관으로 빠르게 흡수되어 간에 도달하며 그 곳에서 cytochrome P450 효소에 의해 아플라톡신 M1 (AFM1)을 비롯한 다양한 종류의 물질로 대사되는 것으로 알려져 있다[8]. AFM1은 사람과 동물의 소변, 유즙, 혈액 등에 존재하는데[8], 사람의 경우에는 AFB1의 섭취 정도에 따라 AFM1으로의 전환률이 달라질 수 있다. 즉, 식이를 통한 AFB1의 일

일 노출량이 높은 경우는 섭취된 양의 1.4~1.5%, 일일 노출량이 낮은 경우는 약 5% 정도가 요중 AFM1 형태로 배설된다고 알려져 있다[12].

체내에 흡수된 AFB1은 대부분이 다른 물질로 대사되기 때문에 요중으로 배설되는 AFB1의 농도는 AFB1의 노출량을 제대로 반영하지 못한다. 따라서, AFB1의 노출을 평가할 수 있는 적절한 지표를 개발하기 위한 노력이 지속적으로 이루어져 왔다. 선행 연구 결과에 따르면 요로 배설되는 AFB1의 대사체의 양과 식품 중 AFB1의 오염정도를 분석하여 상관관계를 분석한 결과, AFB1의 대사체인 aflatoxin-N7-guanine과 AFM1과의 높은 상관관계를 확인하였으며, 그 중 AFM1이 aflatoxin-N7-guanine의 두 배 정도 많이 존재하여 시료를 분석하기에 더욱 용이한 지표라고 보고하였다[9]. 따라서 AFB1의 노출정도를 파악하는데 있어서 요중 AFM1의 농도가 상대적으로 좋은 지표가 될 수 있을 것으로 예상된다.

지금까지 요중 AFM1의 농도는 주로 면역친화컬럼(Immuno affinity column)을 이용한 전처리와 결합된 HPLC-FLD방법이나 HPLC-MS의 방법이 주로 이용되고 있으나 방법의 특성상 시간과 비용에 대한 부담이 매우 커서 대규모 시료의 분석에 이용되는 데에는 많은 제약이 있었다[2, 3, 12]. 따라서, 이러한 단점을 보완할 수 있는 새로운 측정방법의 개발이 절실한 상황이다.

본 연구에서는 competitive ELISA가 요중 AFM1 농도 측정에 적합한 방법인지를 판단하기 위하여 HPLC-FLD 방법과의 특성을 비교, 평가해 보고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-43-261-2845, Fax : +82-43-274-2965

E-mail : ydkim@chungbuk.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

대상자

2011년 실시한 식약청의 유해물질 안전관리 통합노출평가 기반 연구사업의 일환으로 전국의 성인을 대상으로 확률표본 추출하여 수집한 시료 중 HPLC 방법으로 요중 AFM1이 검출된 20명의 소변 시료를 대상으로 ELISA 방법을 이용하여 요중 AFM1의 농도를 측정하였으며 이를 HPLC-FLD 방법에 의한 결과와 비교 평가하였다.

소변시료 농축

competitive ELISA 분석을 위한 소변은 원심분리기(Hanil, Union 32R Plus)를 이용하여 3,000 g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액 2 ml를 원심진공농축기(Hanil, Modul 4080C)로 80℃에서 약 500 µl가 될 때까지 농축시켰다. 남은 용액을 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상층액 270 µl에 10 X PBS를 가하여 총 300 µl를 만들었다. 농축배율은 농축 전후에 소변의 무게를 측정하여 산출하였다. 한편, HPLC-FLD 분석 방법으로 요중 AFM1의 농도를 측정하기 위하여 소변 시료

3 ml를 먼역친화컬럼(VICAM, USA)에 통과시킨 후 10 ml의 PBS로 세척하였다. 세척이 끝나면 methanol과 acetonitrile이 2:3의 비율로 혼합된 용매 0.5 ml로 먼저 추출한 후 동량의 물로 다시 한번 추출하여 최종 1 ml의 용액을 만든 후 HPLC로 분석하였다(Fig. 1).

경쟁적 효소면역측정법(Competitive ELISA)

경쟁적 효소면역측정법으로 요중 AFM1의 농도를 산출하기 위하여 이미 상품화 되어있는 AFM1용 kit (Immunolab GMBH, Kassel, Germany)를 사용하였다. 간략히 방법을 기술하면, 항원이 부착되어 있는 well에 농축한 소변시료와 표준시료 0 pg/ml, 10 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml를 100 µl씩 넣고 곧바로 1차 항체를 50 µl씩 넣었다. 잘 혼합하여 실온에서 60분간 방치한 후 well 내의 혼합물을 버리고 세척용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 conjugate solution을 well 당 100 µl씩 넣고 실온에서 다시 60분간 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 well 내의 혼합물을 버리고 세척용액으로 3회 세척하였으며 세척이 끝난 plate에 기질용액을 well 당 100 µl씩 넣고 빛을 차단한 실온 상태에서 5분간 방치하였다. 반응 후 stop solution을 100

Fig. 1. Flow charts of pre-treatment of urine for competitive ELISA and HPLC-FLD methods.

Table 1. Analytic condition of HPLC-FLD for urinary AFM1 measurement

Condition	
Column	Tosoh ODS 80TM, 150 x 4.4 mm
Mobile phase	50% MeOH + 4M Nitric acid (350 µl/l) + KBr (119 mg/l)
Wave length	353 nm, 432 nm
Flow rate	1 ml/min
Retention time	10 min
Injection volume	100 µl
Column temp.	Room temp.
KOBRA Cell	R-Biopharm Rhone Ltd

Fig. 2. Chromatograms of AFM1 standard and sample in HPLC-FLD analysis. A: AFM1 standard (80 pg/ml), B: AFM1 in urine sample.

μl씩 넣어주어 반응을 종료하고, 450 nm (reference wavelength 620 nm) 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 환산하여 요중 AFM1 농도를 산출하였다. 측정된 시료의 흡광도가 표준시료 0 pg/ml의 흡광도보다 높은 경우는 불검출 시료로 판정하였다.

HPLC-FLD 분석

HPLC를 이용한 요중 AFM1의 측정은 Neal 등의 방법 [9]을 다소 수정하여 사용하였다. 펌프(Model 305, Gilson)와 자동분주기(SIL-10AD, Shimadzu), 형광검출기(RF-20A, Shimadzu)로 구성된 HPLC system과 Tosoh ODS column을 사용하여 분석하였다. 이동상 용액은 50% methanol과 4 M Nitric acid (350 μl/l), KBr (119 mg/l) 혼합액을 사용하였다. 속도는 분당 1 ml였고 주입용량은 100 μl, 형광 분석 파장은 353 nm, 432 nm를 이용하였다. 분석 감도를 높이기 위하여 KOBRA cell (R-Biopharm Rhone Ltd, UK)을 부착하여 분석하였다(Table 1, Fig. 2).

통계분석

통계분석은 윈도우용 SPSS (Version 12.0)를 사용하였다. 두 방법간의 관련성을 파악하기 위하여 Pearson 상관분석을 이용하였고 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

요중 AFM1 농도를 측정하는 방법은 지금까지 HPLC-FLD 방법이나, HPLC-MS 등의 방법이 주로 이용되고 있으나 검출율이 비교적 낮고 높은 분석 비용 및 시간 소모가 많아서 이를 보완할 수 있는 방법의 개발 노력이 지속적으로 진행되고 있다[2, 3, 12]. 이러한 이유 때문에 일반인구집단을 대상으로 한

Table 2. Recovery rate of urinary AFM1 and coefficient of variance on competitive ELISA method

Spiked AFM1 (pg/ml)	Recovered AFM1 (pg/ml)	recovery rate±CV (%)
2.5	2.97±0.66	119.10±8.72
5	3.63±0.15	72.64±4.78
10	12.44±2.35	124.39±7.06
Average		105.37±6.85

Table 3. LOD and LOQ levels of urinary AFM1 on competitive ELISA method

	AFM1 (pg/ml)
Limit of detection (LOD)	0.20
Limit of quantitation (LOQ)	0.62

Fig. 3. Relationship between urinary AFM1 concentrations with HPLC-FLD and competitive ELISA methods.

요중 AFM1 농도를 조사한 역학조사는 많지 않은 실정이며, 식품섭취를 통한 설문조사 자료로 아플라톡신의 노출을 추정 한 연구가 대부분이다[1, 5, 6, 10]. 김현정 등은 2009년 보고한 논문에서 competitive ELISA를 이용한 방법은 검출감도가 매우 높으면서도 측정방법이 간단해서 매우 유용한 분석방법임

을 보고한 바 있다[7]. 본 연구의 결과에서도 요증 AFM1 농도 측정에 이용한 competitive ELISA 방법의 검출한계는 0.2 pg/ml, 정량한계는 0.62 pg/ml로 나타나 기존의 HPLC-FLD 방법에 비해 뒤지지 않는 매우 민감한 방법임이 확인되었다 (Table 3). 또한, ELISA를 이용한 요증 AFM1의 측정방법은 첨가한 표준용액의 농도에 따라 다소 차이는 보였으나 평균적으로 105.37%의 높은 회수율을 보여주었으며 반복 측정 시의 변이계수도 평균 6.85%를 나타내 매우 안정적인 결과를 보여주었다 (Table 2). 김 등의 연구[7]에 따르면 본 연구에서와 동일한 competitive ELISA 방법을 이용하여 요증 AFM1의 농도를 측정된 결과, 회수율과 변이계수가 각각 139%와 14.8%였다고 보고하였으며, 검출한계도 10 pg/ml라고 보고하여 본 연구에서 사용된 방법이 상대적으로 민감하면서도 안정적인 방법임을 알 수 있었다. 이와 같은 차이는 그 동안 AFM1에 특이적으로 반응하는 1차 항체의 개발이 지속적으로 이루어졌기 때문에 두 연구에서 사용된 ELISA kit의 민감도 차이 때문일 가능성이 크겠지만, 그와 더불어 두 연구에서 사용된 전처리 과정의 차이 때문일 가능성도 배제할 수 없다. 김 등의 연구[7]에서는 C18 cartridge column을 이용한 정제 방법을 이용한 반면, 본 연구에서는 소변시료를 농축하기 위한 방법으로 진공건조를 이용하였다. 일반적으로 면역친화컬럼을 비롯한 컬럼 정제 방법은 단시간 내에 특정 물질만을 농축시킬 수 있다는 장점은 있으나 세척과 추출을 반복하는 과정에서 원하는 물질을 일부 손실할 수 있는 단점이 있기 때문이다. 본 연구에서 사용한 진공건조 방법은 컬럼 방식에 비해 상대적으로 많은 처리 시간이 소요되고 특정물질만을 정제하기는 어려우나 소변을 그대로 농축시키기 때문에 특정물질의 손실이 거의 없어 극소량의 시료분석을 위한 전처리에 보다 적합한 방법이 될 수 있다.

본 연구에서 분석한 소변 시료는 모두 20개로 다소 적은 양이기는 하나 이 중 19개의 시료에서 AFM1이 검출되어 95%의 검출율을 나타내었다. 이는 김 등[7]의 연구 결과(95.9%)와 거의 유사한 것으로 HPLC 방법에서 보고된 40~70%의 검출율 보다는 월등히 높은 수준임을 알 수 있다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 연구에서 사용된 진공건조에 의한 전처리 방법과 competitive ELISA 방법을 이용한 요증 AFM1의 분석은 안정적이면서도 민감성이 뛰어난 우수한 방법으로 판단되었다.

ELISA를 이용한 요증 AFM1 농도와 기존의 HPLC-FLD 방법을 이용하여 측정된 농도와와의 관련성을 파악하기 위하여 두 측정값 사이의 산점도를 그리고 상관분석을 시행하였다. 그 결과, 두 방법을 이용한 측정값 사이에는 상관관계수 0.96 ($p < 0.01$)의 매우 높은 관련성이 있음이 확인되었다 (Fig. 3). 그러나 이처럼 높은 관련성에도 불구하고 두 측정치에 대한 회귀식 'HPLC를 이용한 측정치 = 0.29 x ELISA를 이용한 측정치 + 0.85'에서 보는 바와 같이 ELISA를 이용하여 측정된 AFM1 농도가 HPLC로 측정된 값에 비해 상대적으로 높음을 알 수

있다. 이러한 결과는 ELISA의 특성상 AFM1과 구조적으로 매우 유사한 다른 종류의 아플라톡신에 대한 교차반응 때문일 가능성이 크다. 특히, AFB1은 AFM1과 수산기(OH) 하나의 차이를 보이는 구조이고 AFM2는 AFM1이 가진 이중결합 하나가 단일결합으로 치환된 형태여서 상호간에 구조적으로 매우 유사한 특징을 가지고 있다. HPLC 분석은 미세한 구조적 차이도 감별해 낼 수 있는 능력이 있는 반면, ELISA에서의 항원 항체 반응은 그런 능력이 상대적으로 떨어지기 때문에 이들에 의한 교차반응 가능성이 있고 이를 극복하기 위한 새로운 항체의 개발이 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

요증 AFM1의 농도가 아플라톡신의 노출을 평가할 수 있는 좋은 지표임에도 불구하고 아직까지 우리나라에서 요증 AFM1 농도에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러한 이유는 앞서 기술한 바와 같이 기존의 방법들이 많은 시간과 돈이 소요됨에도 불구하고 검출율이 높지 않기 때문이다. 그러한 관점에서 볼 때 competitive ELISA 방법은 그 활용 가치가 매우 높다고 할 수 있다. 특히, 대규모의 시료를 분석하는 경우에 매우 효율적인 방법이 될 것으로 기대된다. 다만, 교차반응 등의 이유로 실제 농도보다 과평가되는 경향이 있음을 감안하여 ELISA 방법에 의한 결과를 해석할 때는 이 부분에 대한 충분한 고려가 동반되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 식품의약품처의 지원을 받아 수행된 연구 사업임(10162KFDA994).

References

1. Applebaum, R. S., Brackett, R. E., Wiseman, D. W. and Marth, E. H. 1982. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. *A Review J Food Prot* **45**, 752-777.
2. Cheng, Z., Root, M., Ran, W., Chen, J. and Campbell, T. C. 1997. Use of an improved method for analysis of urinary aflatoxin M1 in a survey of Mainland China and Taiwan. *Cancer Epidem Biomarker Prev* **6**, 523-529.
3. Everley, R. A., Ciner, F. L., Zhan, D., Scholl, P. F., Groopman, J. D. and Croley, T. R. 2007. Measurement of aflatoxin and aflatoxin metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **31**, 150-156.
4. Hu, W. G., Tien, C. C., Wang, Y. H., Ting, T. Y., Fong, Y. C., Loung, Y. T. and Huang, S. S. 1983. Urinary excretion of aflatoxin M1 in inhabitants of region with high liver cancer incidence in Guangxi. *Hygiene Invest* **27**, 152-154.
5. Jonsyn-Ellis, F. E. 2001. Seasonal variation in exposure frequency and concentration levels of aflatoxins and ochratoxins in urine samples of boys and girls. *Mycopathologia* **152**, 35-40.

6. Kim, E. K., Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J. and Kim, Y. B. 2000. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit Contam* **17**, 59-64.
7. Kim, H. J., Kwak, B. Y. and Shon, D. H. 2009. Detection of Aflatoxin M1 in Human and Porcine Urine and Its Risk Assessment. *Korean J Food Sci Technol* **41**, 215-221.
8. Leong, Y. H., Latiff, A. A., Ahmad, N. I. and Rosma, A. 2012. Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids. A short review. *Mycotoxin Res* **28**, 79-87.
9. Neal, G. E., Eaton, D. L., Judah, D. J. and Verma, A. 1998. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived *in vitro* systems. *Toxicol Appl Pharmacol* **151**, 152-158.
10. Park, J. W., Kim, E. K. and Kim, Y. B. 2004. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B1 through food consumption. *Food Addit Contam* **21**, 70-75.
11. Wogan, G. N., Kensler, T. W. and Groopman, J. D. 2012. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. *A review Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **29**, 249-257.
12. Zarba, A., Wild, C. P., Hall, A. J., Montesano, R., Hudson, G. J. and Groopman, J. D. 1992. Aflatoxin M1 in human breast milk from The Gambia, west Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. *Carcinogenesis* **13**, 891-894.

초록 : ELISA 방법을 이용한 요중 아플라톡신 M1 측정

김용대* · 김현

(충북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의학연구소)

본 연구는 요중 아플라톡신 M1 (AFM1)의 농도를 측정할 수 있는 competitive ELISA 방법의 특성을 HPLC-fluorescence detector (HPLC-FLD) 방법과 비교하여 평가하였다. ELISA 방법에서의 AFM1의 회수율은 105% (73-124%)였고 측정의 변이계수는 6.85%로 나타났다. ELISA 방법에서의 검출한계와 정량한계는 각각 0.20 pg/ml과 0.62 pg/ml로 조사되었으며, 두 방법을 이용하여 측정한 요중 AFM1 농도는 상관계수 0.96의 매우 높은 상관성이 있는 것으로 확인되었다($p < 0.01$). 그러나, 이렇게 높은 상관성에도 불구하고, ELISA 방법을 이용한 요중 AFM1의 농도는 HPLC-FLD 방법으로 측정한 값에 비해 상대적으로 높게 나타나는 경향을 보여 ELISA를 이용한 방법이 단시간에 많은 시료를 분석할 수 있는 장점은 있으나 그 결과는 HPLC-FLD 방법을 이용해서 얻은 회귀식을 이용하여 보정을 한 후 제시할 필요가 있는 것으로 판단된다.