pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 1, pp. 75~82 (2013)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

식품 중 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석법 개발 및 모니터링

박지원* · 유명상 · 국주희 · 지영애 · 이진하[1]
광주지방식품의약품안전청, [1]식품의약품안전평가원 영양기능연구팀

Simultaneous Determination and Mornitoring of Aflatoxin and Ochratoxin A in Food

Ji-Won Park*, Myung-Sang Yoo, Ju-Hee Kuk, Young-Ae Ji, and Jin-Ha Lee[1]
Gwangju Regional Korea Food & Drug Administration
[1]Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
(Received September 19, 2011/Revised January 7, 2013/Accepted February 26, 2013)

ABSTRACT - The simultaneous analysis and monitoring of aflatoxin B_1, G_1, B_2, G_2 and ochratoxin A in foods were carried out by HPLC with fluorescence detection. The samples were extracted with methanol/water mixture. The extract was centrifuged, diluted with phosphate buffer saline (PBS), filtered, and applied to an immunoaffinity column containing antibodies specific to both aflatoxins and ochratoxin A. After washing the column with PBS and water, the toxins were eluted from the column with methanol, and quantified by HPLC, with a run time of approximately 30 min. The recoveries for aflatoxin B_1, G_1, B_2, G_2 and ochratoxin A in foods were 78.4~101.5%, 73.3~102.1%, 81.7~106.7%, 67.0~104.6% and 78.7~120.8%, respectively. The limits of detection of aflatoxins and ochratoxin A ranged from 0.05 to 0.18 μg/kg. According to monitoring result with the established method, aflatoxin B_1 and ochratoxin A were found in 13 of 151 domestic commercial foods. The contamination levels were 0.32~1.80 μg/kg for aflatoxin B_1 and 0.97 μg/kg for ochratoxin A. Therefore, this study showed all commercial foods monitored were safe under the Korean standards for aflatoxins and ochratoxin A.

Key words: aflatoxin, ochratoxin A, simultaneous determination, monitoring

곰팡이독소는 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 사람과 가축에게 질병이나 이상 생리작용을 유발하는 물질로서, 대량생산 및 국가 간의 교역 증가에 따른 장기 저장·수송과 관련하여 곰팡이독소가 식품 위생상의 문제로 대두되어지고 있다. 그 중 아플라톡신은 *Aspergillus flavus*와 *Asp. parasiticus* 등에 의해 생성되며 곡류와 견과류와 같이 탄수화물 함량이 높은 기질에서 쉽게 생성된다고 알려져 있으며 강력한 발암물질, 기형발생물질, 돌연변이원으로 보고되어지고 있다[1,2]. 오크라톡신은 *Aspergillus ochraceus* 와 *Penicillium verrucosum*과 같은 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 신장 및 간장에 독성을 나타내며 신장독소, 간장독소, 면역억제를 유발하는 것으로 알려져 있다[3].

*Correspondence to: Ji-Won Park, Gwangju Regional Korea Food & Drug Administration, 176-39 Cheomdangwagiro, Buk-Gu, Gwangju 500-480, Korea
Tel: 82-62-602-1505, Fax: 82-62-602-1440
E-mail: wone0134@korea.kr

우리나라는 서양과 비교하였을 때 아플라톡신의 주요 오염원으로 알려진 곡류의 섭취가 많고, 가축의 사료 또한 옥수수 등 곡물을 주원료로 사용하고 있어 아플라톡신에 노출될 우려가 높다. 또한, 기호식품으로서 소비가 증가하고 있는 커피 및 과실류 가공품에서 오크라톡신 A가 검출된다는 보고[4-7]가 있어 아플라톡신과 오크라톡신 A에 대한 관리 강화가 필요한 실정이며, 국내·외적으로 곰팡이독소에 의한 인명 및 가축피해가 발생하고 있어서 곰팡이독소에 대한 관리를 더욱 강화할 필요가 있다[8-11]. 또한 식품의 저장온도 및 습도가 관리되는 시스템에서도 곰팡이독소에 대한 오염이 지속적으로 나타나고 있다고 보고되고 있어 곰팡이독소에 대한 다각적인 연구가 필요한 실정이다.

국내에서 식품 중 곰팡이독소에 관한 연구는 *Aspergillus*속 곰팡이가 생산하는 아플라톡신 및 오크라톡신 A 뿐만 아니라 저온, 저산소의 환경에서 발생하는 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 zearalenone, nivalenol, deoxynivalenol에 대한 연구가 보고되었다. 그러나 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 zearalenone, nivalenol, deoxynivalenol의 동시분석

에 대한 연구가 몇몇 보고되었을 뿐, 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석 및 최적의 분석조건에 대한 연구는 진행되지 않은 상태이며, 대부분이 곰팡이 독소에 대한 개별 분석이 보고되었다[12-14]. 국외의 곰팡이독소 분석법에 관한 연구는 면역친화성 컬럼을 이용하여 HPLC-FLD (High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence detector)로 분석한 연구가 주를 이루었고, 그 중, 동시분석에 관한 연구로는 파프리카, Bee-pollen, 곡류 및 그 가공품 등을 대상으로 한 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석에 관한 연구와 Multitoxin Immunoaffinity Columns을 이용한 곰팡이 독소의 동시분석에 관한 연구로서 곰팡이독소 추출을 위한 최적의 추출 용매 조건 또는 액체크로마토그래피의 분석 조건을 설정하고, 이들의 분석방법을 검증하기 위해 직선성, 재현성, 검출한계, 정량한계 등 밸리데이션을 실시한 보고가 있었다[15-20].

우리나라에서는 식품 및 농산물에 대하여 아플라톡신 B_1에 대해서만 기준을 10 ppb 이하로 규정하고 있었지만 2009년 3월부터 곡류, 견과류 및 그 가공품에 대한 아플라톡신을 기준을 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2의 합으로서 15 ppb로 규격을 강화시켰으며 점차 그 대상을 향신료, 밀가루, 건조과실 등으로 확대시켰다[21-23]. 오크라톡신 A는 밀, 보리, 호밀, 커피콩 및 인스턴트 커피에 각각 5, 10 ppb이하의 기준으로 관리하였으나 대상 식품을 고춧가루, 포도제품으로 확대하는 등 곰팡이독소 관리를 강화하였다[22,23]. 이렇듯 곰팡이독소에 대한 관리 기준이 강화되는 추세로 보다 효율적인 관리 방안이 필요하나 현재 식품공전에는 분석방법이 개별분석법으로 설정되어 관리 대상이 동일한 품목에 대해서도 아플라톡신과 오크라톡신 A를 각각 분석하고 있어 분석 상 많은 비용과 시간이 소비되고 있는 실정이다[22,23].

따라서 본 연구에서는 우리나라의 곰팡이독소 관리상 중요한 식품을 대상으로 아플라톡신과 오크라톡신 A를 동시에 분석할 수 있는 시험법을 확립하여 직선성, 회수율, 검출한계, 정량한계 등 유효성을 평가하고, 확립된 동시분석법을 통하여 국내 유통 식품 중 오염가능성이 있는 식품 151건에 대한 오염 실태를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

국내에서 유통되고 있는 식품 중 곡류 (41건), 두류 (18건), 견과류 (24건), 건조과일류 (17건), 가공식품 (27건), 기타식품 (24건)을 대상으로 2011년 4월부터 11월까지 36품목 151건을 전국 대형마트 및 할인매장에서 구입하였다. 분말상태나 가루상태의 시료를 제외한 모든 시료는 균질화하여 –20°C로 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

표준원액 및 시약

실험에 사용한 아플라톡신과 오크라톡신 A 표준원액은 Supelco 사로부터 구입하여 사용하였다, 표준용액은 표준원액을 benzene : acetonitrile(98 : 2) 혼합액으로 희석하여 사용하였다. 추출 및 분석에 사용되는 acetonitrile, methanol은 HPLC급(Burdic&Jackson Co., USA)을 사용하였고, phosphoric acid (Junsei Co., Japan), potassium dihydrogen phosphate (Junsei Co., Japan), sodium chloride (Merck Co., Germany), potassium chloride (Merck Co., Germany), sodium phosphate (Sigma Co., USA), trifluoroacetic acid (Acros Co., USA)는 특급시약을 사용하였다.

정제용 컬럼 및 분석장비

아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석을 위한 정제용 컬럼은 AflaOchra Test™ WB (Vicam Co., USA)를 사용하였으며, 분석장비는 Shiseido Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Japan)의 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프를 사용하였다.

표준용액의 조제

아플라톡신 혼합 표준원액(B_1, G_1, B_2, G_2의 표준원액의 농도는 각각 1.149, 0.985, 0.329, 0.329 μg/ml)과 오크라톡신 A 표준원액(50.384 μg/ml)을 benzene : acetonitrile(98 : 2)로 희석하여 아플라톡신과 오크라톡신 A의 혼합 표준용액을 제조한 후 이것을 적당량 취하여 acetonitrile를 이용하여 각각의 농도로 희석하여 사용하였다.

전처리 조건 검토

추출용액

식품 중 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석을 위한 최적의 추출용액를 결정하기 위해 쌀 시료 25 g을 취해 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2, 오크라톡신 A 의 농도가 각각 5.7, 4.9, 1.6, 1.6, 10.0 μg/kg이 되도록 혼합 표준용액을 첨가한 후 60% acetonitrile과 70% methanol 및 80% methanol 용액 100 mL을 추출용액으로 하여 균질기로 15분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로(whatman No.4)로 여과한 여액 10 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 PBS (Phosphate buffer saline) 40 mL을 가하여 흔들어 섞은 후 유리섬유여과지로 여과한 것을 추출액으로 하였다.

정제 및 용출용액

추출액 20 mL을 AflaOchra 면역친화성 컬럼에 주입하여 1 drop/sec의 속도로 통과시킨 다음 PBS (Phosphate Buffer Saline)와 증류수 10 mL을 같은 유속으로 유출시키고 컬럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 최적의 용출용매를 검토하기 위하여 acetonitrile,

methanol 각각 3 mL로 용출시켰다.

유도체화

용출액을 50°C에서 질소로 건고시키고 잔류물에 trifluoroacetic acid 0.2 mL을 가하여 어두운 곳에서 15분간 방치한 후 20% acetonitrile 용액 0.8 mL을 가하여 혼합하고 0.45 μm membrane filter로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

HPLC 분석 조건 검토

아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석이 가능한 기기분석조건 위해 분리 컬럼으로는 역상 컬럼인 Shiseido UG-120 C_{18}(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)과 C_{18}(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 사용하여 분석하였으며, 형광검출기의 파장은 파장 프로그램을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile : water (25/75, v/v), acetonitrile : water : acetic acid (99/99/2, v/v/v), water : acetonitrile : methanol (72/14/14, v/v/v), acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50/50, v/v) 등과 같이 다양한 조성으로 비교 분석하였다.

회수율 검토

전처리 조건 및 기기분석 조건 검토를 통해 확립된 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석법에 따른 회수율 측정을 위하여 각 시료에 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2 및 오크라톡신 A의 농도가 각각 5.7, 4.9, 1.6, 1.6, 10.0 μg/kg이 되도록 혼합 표준용액을 첨가하여 본 실험방법에 따라 3회 반복 실험하여 구하였다.

결과 및 고찰

전처리 조건의 최적화

추출용액 조건 확립

아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석을 위한 최적의 추출용매를 결정하기 위해 쌀 시료 25 g을 취해 60% acetonitrile 용액과 70% methanol 및 80% methanol을 추출용액으로 하여 아플라톡신과 오크라톡신 A를 추출한 후 회수율을 측정하였다.

각각의 추출용액을 사용하여 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 60% acetonitrile을 추출용액로 사용하였을 경우 아플라톡신 B_1, G_1, B_2 및 오크라톡신 A는 85% 이상의 회수율을 보였으나 아플라톡신 G_2의 회수율이 60% 미만으로, 다른 곰팡이독소에 비해 아플라톡신 G_2의 회수율이 낮아 추출용액으로 적절하지 않았다. 또한 70% methanol 및 80% methanol을 추출용매로 사용하였을 경우 두 추출용액이 80~104% 범위의 비슷한 회수율을 보였으나, 오크라톡신 A를 제외하고는 전반적으로 80% methanol을 추출용액으로 사용하였을 경우 다소 더 높은 회수율을 보였다. Garcia-Villanova 등[17]의 보고에서는 bee pollen에서 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석을 위해 60% acetonitrile를 추출용매로 사용하였으나 Stroka 등[24] 의 연구에서는 acetonitrile이 혼합된 추출용매를 파프리카나 동물 사료 같은 건조시료에 사용했을 때는 시료가 추출용매를 흡수하여 회수율에 영향을 미칠 가능성이 높으므로 methanol과 water가 혼합된 추출용액이 이러한 결과를 예방하는데 도움을 준다고 보고하였다. 또한 Hierro 등[16] 연구에서도 methanol과 water (80 : 20)의 혼합용액을 추출용액으로 사용하여 methanol로 용출시켰을 때 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2과 오크라톡신 A의 회수율이 각각 99.7%, 71.7%, 97.8%, 70.7%, 75.7%라고 보고한 바 있으며 Moller 등[25]의 연구에서도 아플라톡신 B_1과 B_2의 회수율이 각각 76.1%, 85.7%라고 보고하였다. 따라서, 추출용액으로 80% methanol 용액을 전처리방법에 사용하기로 결정하였다.

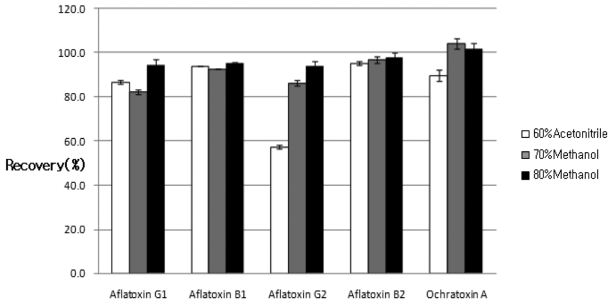

Fig. 1. Recoveries(%) of aflatoxin and ochratoxin A using various extraction solvents in the rice (n = 3) (mean ± S.D).

용출용액 조건 확립

AflaOchra 면역친화성 컬럼을 사용하여 추출액 중의 아플라톡신과 오크라톡신 A를 정제하고 용출용매로 각각 3 mL의 acetonitrile과 methanol을 사용하여 용출하였다. 3 mL의 acetonitrile을 용출용액으로 사용하였을 경우 아플라톡신의 회수율은 90% 이상으로 양호한 값을 보였으나, ochratoxin A의 회수율이 약 40%로 다소 낮은 값을 보였다(Fig. 2). 3 mL의 methanol을 용출용액으로 사용하였을

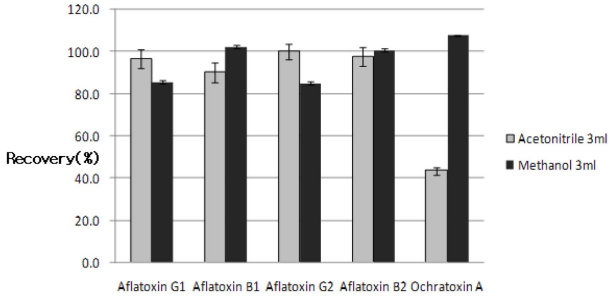

Fig. 2. Recoveries(%) of aflatoxin and ochratoxin A using various elution solvents in the rice (n = 3) (mean ± S.D).

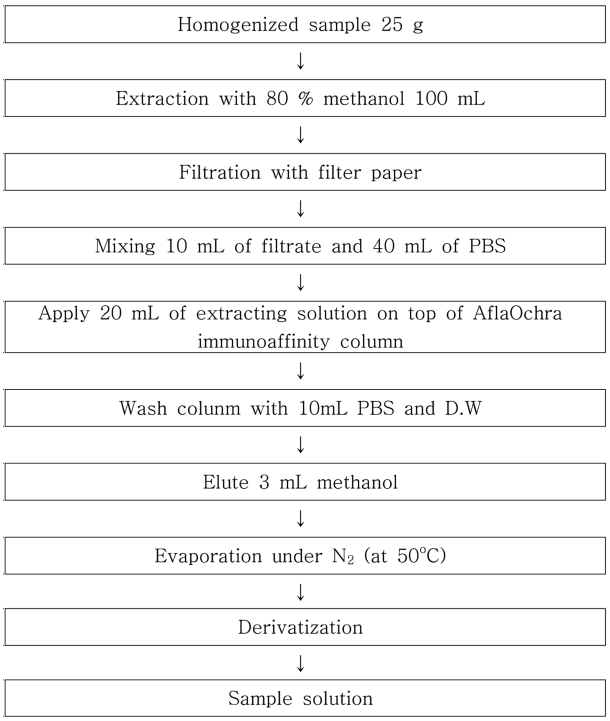

Fig. 3. Flow diagram of the sample preparation for analysis of aflatoxin and ochratoxin A in foods.

경우에는 전체적으로 85% 이상의 양호한 회수율을 나타내어 80% methanol로 추출 후 3 mL의 methanol로 용출시켜 다음의 기기분석 및 시료 전처리 방법에 적용시켰다(Fig. 3).

HPLC 분석조건 최적화

아플라톡신과 오크라톡신 A의 최적의 분석조건을 검토하기 위하여 측정파장, 컬럼, 이동상 등 다양한 조건으로 비교 분석하였다.

최적의 감도와 머무름 시간을 비교하였을 때 Shiseido UG-120 C_{18}(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)가 우수한 결과를 보였으며 유속은 1.0 mL/min, 컬럼온도는 40°C를 유지시켰다. 형광검출기의 파장은 파장프로그램을 사용하여, 분석시간 0-14분까지는 아플라톡신분석을 위해 여기파장 360 nm, 검출파장 450 nm으로 분석하였고 14-30분까지는 오크라톡신 분석을 위해 여기파장 330 nm, 검출파장 460 nm으로 분석하였다. 이동상은 acetonitrile : water (25/75, v/v), acetonitrile : water : acetic acid (99/99/2, v/v/v), water : acetonitrile : methanol (72/14/14, v/v/v), acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50/50, v/v) 등과 같이 다양한 조성으로 검토한 결과 A 이동상을 water : acetonitrile : methanol (72/14/14, v/v/v)로 사용하고 B 이동상을 acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50/50, v/v)로 하여 구매용매 조성으로 분석했을 때 피크의 분리도와 감도, 머무름 시간, 베이스의 안전성 이 우수함을 보임에 따라 Table 1과 같은 HPLC 분석조건을 확립하였다. Fig. 4는 확립된 조건으로 분석한 크로마토그램이

Table 1. HPLC conditions established for analysis of aflatoxin and ochratoxin A

Parameter	Conditions		
Instrument	Nanospace I system (Shiseido, Japan)		
Detector	FLD (0-14 min Ex 360, Em 450 nm / 14-30 min Ex 330, Em 460 nm)		
Mobile phase	A. water : Acetonitrile : methanol = 72 : 14 : 14 B. acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 50 : 50		
	min	A(%)	B(%)
	Init	95	5
	14	95	5
	16	50	50
	17	5	95
	25	5	95
	27	95	5
	30	95	5
Column	Capcell pak-C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Run time	30 min		
Injection volume	20 μl		
Column temp.	40°C		

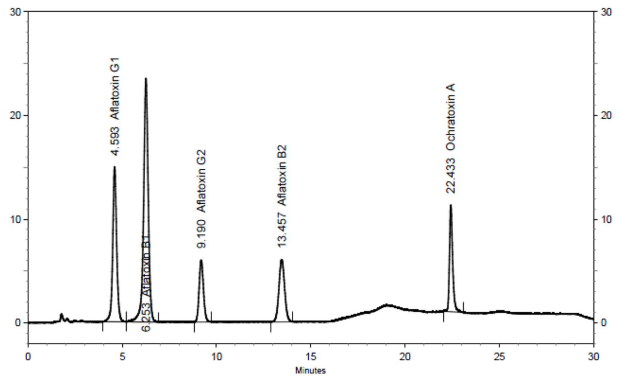

Fig. 4. HPLC chromatogram of aflatoxins and ochratoxin A by established conditions (aflatoxin B_1, 5.7 μg/L; G_1, 4.9 μg/L; B_2, 1.6 μg/L; G_2, 1.6 μg/L; ochratoxin A, 10.0 μg/L).

며 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2, 오크라톡신 A의 검출시간은 각각 4.593, 6.253, 9.190, 13.457, 22.433분 이었다.

직선성 및 검량선

아플라톡신과 오크라톡신 A의 혼합표준용액을 5단계로 희석하여 직선성을 확인한 결과는 Fig. 5에 나타내었으며, 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2 및 오크라톡신 A의 상관계수(R^2)는 각각 0.9998, 0.9998, 0.9997, 0.9998 및 0.9997이었다.

검출한계 및 정량한계

검출한계(Limit of detection)는 base-line의 노이즈로부터 3배 이상인 농도로 하였고 정량한계(Limit of quantification)는 base-line의 노이즈로부터 10배 이상인 농도로 하

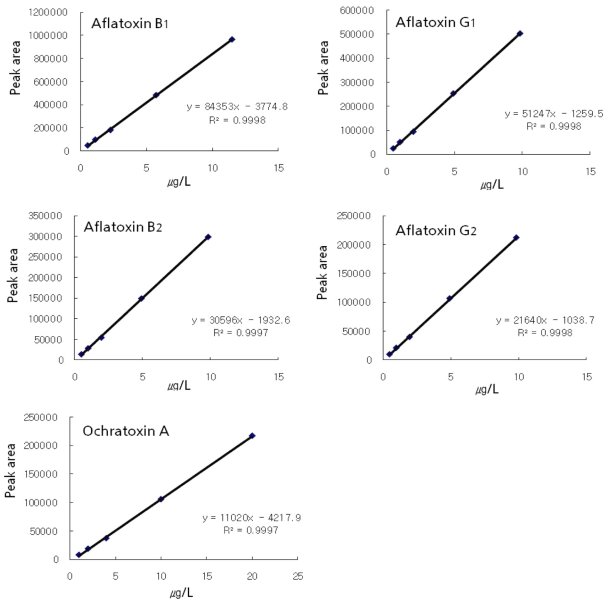

Fig. 5. Calibration curve of aflatoxin and ochratoxin A.

여 구하였다. 아플라톡신과 오크라톡신 A의 검출한계 및 정량한계는 Table 2와 같으며, 이러한 결과는 아플라톡신을 트리플루오르초산으로 유도체화 한 강 등(2010)[6]의 수치와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 아플라톡신과 오크라톡신 A의 정량한계를 0.2 μg/kg 라고 한 Chan 등[15]의 보고보다는 오크라톡신 A가 다소 높은 경향을 나타내었으나 아플라톡신과 오크라톡신 A의 검출한계를 0.3~0.6 μg/kg 라고 보고한 Hierro 등[16]의 보고보다는 더 낮은 검출한계 값을 보였다.

Table 2. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of aflatoxin and ochratoxin A

	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
Aflatoxin B_1	0.053	0.176
Aflatoxin G_1	0.069	0.231
Aflatoxin B_2	0.047	0.158
Aflatoxin G_2	0.056	0.188
Ochratoxin A	0.180	0.600

회수율 검토

아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석법에 대한 회수율을 측정하기 위해 시료 (곡류, 두류, 견과류, 건조과실류, 기타가공품) 25 g에 (단, 고춧가루와 커피는 5 g) 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2 및 오크라톡신 A 의 농도가 각각 5.7, 4.9, 1.6, 1.6, 10.0 μg/kg이 되도록 혼합 표준용액을 첨가하여 3회 반복 실험한 결과는 Table 3에 나타내었다. 곡류의 회수율은 아플라톡신(B_1, G_1, B_2, G_2)과 오크라톡신 A 각각 87.0~101.5%, 73.8~102.1%, 94.3~106.7%, 80.0~104.6%, 78.7~113.7%이었으며, 두류는 각각 82.0~98.3%, 80.0~96.4%,

Table 3. Recovery of aflatoxin and ochratoxin A from foods (n = 3)

Food type		Recovery (%)				
		Aflatoxin B_1	Aflatoxin G_1	Aflatoxin B_2	Aflatoxin G_2	Ochratoxin A
Cereals	Barley	87.0 ± 1.29	73.8 ± 0.26	94.3 ± 0.12	80.0 ± 0.30	96.7 ± 0.89
	Common millet	88.9 ± 2.48	91.5 ± 2.69	97.2 ± 3.38	96.3 ± 3.36	78.7 ± 2.70
	Job's tears	92.0 ± 1.21	91.7 ± 0.48	98.7 ± 0.43	96.8 ± 0.40	83.1 ± 0.80
	Brown rice	101.5 ± 0.36	102.1 ± 0.38	106.7 ± 0.30	104.6 ± 1.06	113.7 ± 0.23
Pulses	Mung beans	94.3 ± 4.33	82.1 ± 3.74	99.8 ± 4.85	89.3 ± 4.55	120.8 ± 1.33
	Azuki beans	88.4 ± 2.52	85.7 ± 2.70	96.3 ± 4.26	90.2 ± 3.00	113.4 ± 4.90
	Kidney beans	82.0 ± 1.15	96.4 ± 1.71	91.3 ± 0.83	87.5 ± 0.82	103.9 ± 1.17
	Seoritae	83.6 ± 1.83	80.0 ± 1.24	90.5 ± 1.32	81.3 ± 0.48	103.8 ± 1.59
	Baektae	98.3 ± 5.42	88.6 ± 4.95	104.2 ± 6.16	94.9 ± 5.19	115.9 ± 7.41
Nuts	Peanut	86.3 ± 2.00	87.7 ± 1.57	93.9 ± 2.02	88.7 ± 2.05	95.9 ± 1.72
	Walnut	78.4 ± 0.30	81.2 ± 1.66	88.7 ± 0.94	83.8 ± 1.87	92.4 ± 3.38
	Almond	87.0 ± 1.95	82.9 ± 1.98	95.3 ± 2.65	91.5 ± 2.93	99.4 ± 2.69
	Cashew nut	74.6 ± 0.53	79.1 ± 0.71	81.7 ± 0.44	84.5 ± 0.69	109.5 ± 0.74
	Pecan	90.2 ± 0.12	76.9 ± 0.38	97.5 ± 0.10	85.4 ± 0.26	98.2 ± 0.66
	Pine nut	86.4 ± 1.43	73.3 ± 1.44	95.2 ± 1.83	82.1 ± 1.23	104.8 ± 1.33
Processed food	Wheat flour	85.2 ± 0.58	83.0 ± 0.22	93.6 ± 0.51	90.2 ± 0.74	98.4 ± 0.83
	Red pepper paste	87.0 ± 0.87	86.6 ± 3.88	92.4 ± 2.05	85.1 ± 4.29	103.6 ± 1.82
	Soybean paste	88.4 ± 2.52	96.2 ± 2.99	93.0 ± 3.11	91.4 ± 3.74	91.6 ± 3.93
	Popcorn	86.9 ± 2.21	87.1 ± 2.61	93.5 ± 3.65	89.5 ± 3.36	103.3 ± 4.44
	Peanut butter	92.9 ± 2.25	88.2 ± 1.92	97.3 ± 2.32	93.2 ± 2.15	100.8 ± 2.59
Dried fruit	Raisin	90.8 ± 2.02	91.0 ± 1.93	96.5 ± 1.31	91.5 ± 0.48	108.4 ± 2.25
Other food	Red pepper powder	91.5 ± 1.59	89.4 ± 2.95	98.4 ± 2.21	84.9 ± 2.81	108.4 ± 2.33
	Coffee	82.8 ± 1.49	81.5 ± 1.70	88.0 ± 1.84	67.0 ± 1.71	82.0 ± 1.66

Table 4. Monitoring of aflatoxin and ochratoxin A in foods

Food type		No	No. detected	Concentration (μg/kg)				
				Aflatoxin B_1	Aflatoxin G_1	Aflatoxin B_2	Aflatoxin G_2	Ochratoxin A
Cereals	Polished rice	9	-	-	-	-	-	-
	Glutinous rice	4	-	-	-	-	-	-
	Foxtail millet	4	-	-	-	-	-	-
	Sorghum	3	1	0.32	-	-	-	-
	Barley	6	-	-	-	-	-	-
	Common millet	3	-	-	-	-	-	-
	Job's tears	2	-	-	-	-	-	-
	Wheat	1	-	-	-	-	-	-
Pulses	Brown rice	9	-	-	-	-	-	-
	Mung beans	2	-	-	-	-	-	-
	Azuki beans	3	-	-	-	-	-	-
	Kidney beans	1	-	-	-	-	-	-
	Seoritae	4	-	-	-	-	-	-
	Heuktae	3	-	-	-	-	-	-
	Baektae	5	-	-	-	-	-	-
Nuts	Peanut	6	-	-	-	-	-	-
	Walnut	5	-	-	-	-	-	-
	Almond	4	-	-	-	-	-	-
	Cashew nut	2	-	-	-	-	-	-
	Pecan	3	-	-	-	-	-	-
	Pine nut	4	1	1.80	-	-	-	-
Processed food	Wheat flour	7	-	-	-	-	-	-
	Red pepper paste	4	2	0.40~0.55	-	-	-	-
	Soybean paste	3	-	-	-	-	-	-
	Corn processed foods	5	-	-	-	-	-	-
	Corn flour	1	-	-	-	-	-	-
	Rye flour	1	-	-	-	-	-	-
	Peanut butter	6	6	0.33~0.99	-	-	-	-
Dried fruit	Raisin	9	1	-	-	-	-	0.97
	Dried cranberry	1	-	-	-	-	-	-
	Dried blueberry	1	-	-	-	-	-	-
	Dried cherry	1	-	-	-	-	-	-
	Prune	5	-	-	-	-	-	-
Other foods	Red pepper powder	13	2	0.25~0.91	-	-	-	-
	Curry	5	-	-	-	-	-	-
	Coffee	6	-	-	-	-	-	-
계		151	13			-		

90.5~104.2%, 81.3~94.9%, 103.8~120.8%이었다. 견과류는 각각 78.4~90.2%, 73.3~87.7%, 81.7~97.5%, 82.1~91.5%, 92.4~109.5%이었으며, 가공식품은 85.2~92.9%, 83.0~96.2%, 92.4~97.3%, 85.1~93.2%, 91.6~103.6%이었다. 또한 건조과실류 중 건포도는 각각 90.8%, 91.0%, 96.5%, 91.5%, 108.4%를 보였으며, 고춧가루나 커피 등 기타 식품의 회수율은 각각 82.8~91.5%, 81.5~89.4%, 88.0~98.4%, 67.0~84.9%, 82.0~108.4%를 나타내었다. 분석한 시료 대부분 아플라톡신 G_2가 다른 아플라톡신에 비해 회수율이 다소 낮았는데 이러한 결과는 오 등(2006)[26]과 Hierro 등[16]의 보고와 비슷한 결과를 나타냈으며, Hierro 등이 80% methanol을 추출용액으로 하여 대상 시료에 아플라톡신과 오크라톡신 A 혼합표준용액 최종농도 5 μg/kg가 되도록 첨가하여 회수율을 측정하였을 때 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2 및 오크라톡신 A의 회수율이 각각 99.7, 71.7, 97.8, 70.7 및 75.7%를 나타내었으며 이는 본 연구결과의 회수율와 유사하였다. 또한 위의 회수율 결과는 1 μg/kg 농도에서 40~120%, 10 μg/kg 수준에서 60~115%의 회수율을 제시하는 Codex 가이드라인을 만족하였다[27].

시료 중 아플라톡신과 오크라톡신 A 오염도 조사

전국에서 유통되고 있는 식품 중 36품목 151건을 수거

한 후 확립된 동시분석법으로 분석한 결과는 Table 4와 같다. 총 151건 중 13건에서 아플라톡신 또는 오크라톡신 A가 검출되어 8.6%의 검출율을 나타내었고, 땅콩버터 6건, 고추장 2건, 고춧가루 2건, 건포도, 수수 및 잣에서 1건씩 검출되어 시료유형별 검출율은 곡류, 견과류, 건조과실류 0.7%, 두류 0.0%, 가공식품 5.3%, 기타식품 1.3%였다. 국내 아플라톡신 오염도 조사에 대한 연구를 보면 장 등(2007)[28]의 연구에서는 곡류 및 견과류에서 9.4%의 검출율을 보였고 김 등(2006)[29]의 연구에서는 곡류, 견과류, 두류 및 그 가공식품 등에서 8.2% 검출율을 보여 본 연구와 비슷한 결과를 보였다.

검출 범위는 아플라톡신 B_1은 0.32~1.80 μg/kg, 오크라톡신 A는 0.97 μg/kg이었으며, 아플라톡신 B_2, G_1, G_2는 검출되지 않았다. 아플라톡신의 검출 내역을 살펴보면 다른 식품군에 비해 견과류에서 검출빈도가 높게 나타났다. 수거된 땅콩버터 6건에서 모두 아플라톡신 B_1이 0.33~0.99 μg/kg의 범위로 검출되었으며, 이는 아플라톡신 B_1의 검출빈도가 높은 땅콩으로부터 기인한 것으로 보이며, 검출 값은 Abdulkadar 등의 땅콩버터에서 0.32~13.26 μg/kg의 검출되었다는 보고와 비슷하거나 낮은 수준을 보였다[30]. 땅콩 가공품에서 아플라톡신의 검출 빈도가 높게 나타나는 것은 장 등(2007)[28]과 박 (2006)[31]의 연구결과와도 유사한 경향을 나타냈으며, 땅콩이 아플라톡신 생성이 쉬운 식품이라는 여러 연구결과와 일치했다[15,28]. 고추장에서 검출된 아플라톡신 B_1 역시 고춧가루로부터 기인한 것으로 생각되며[32], 건포도에서는 0.97 μg/kg의 오크라톡신 A가 검출되었으나 건포도의 오크라톡신 A의 국내 기준인 10 μg/kg보다 낮은 값으로, 오염 수준이 높지는 않으나 건포도나 건자두와 같은 건조과실류는 비교적 수분 함량이 높기 때문에 보관에 주의를 기울여야할 것으로 생각되어진다. 또한 간장, 고추장, 된장에서도 오크라톡신 A가 오염되어 있다는 보고가 있으나[33,34] 본 연구에서 사용된 고추장, 된장은 시판되는 장류이며 시료수가 적어 검출 건수가 없었던 것으로 판단된다. 수수에서도 미량의 아플라톡신 B_1이 1건 검출되어 곡류 41건 중 1건의 낮은 검출 빈도를 보였으나, 우리나라는 곡류를 주식으로 하고 있으며 사료 및 원료 농산물의 수입량이 많기 때문에 검출 빈도 및 검출량이 낮다고 하더라도 아플라톡신 및 오크라톡신 A의 오염에 노출될 가능성이 많으므로 지속적인 관리가 필요하다고 생각되며, 검출된 곰팡이독소는 모두 기준치 이하로 모니터링 한 식품 모두 안전한 수준임을 알 수 있었다.

요 약

아플라톡신 및 오크라톡신 A의 동시분석법을 확립하여 보다 신속하고 경제적인 분석을 통해 아플라톡신과 오크라톡신 A를 효율적으로 관리하고자 하였다. 시료의 전처리는 80% methanol로 추출하고 면역친화성 컬럼을 이용하여 정제한 다음 trifluoroacetic acid를 이용하여 유도체화 한 후 HPLC-FLD로 분석하였다. 컬럼은 Capcell pak-C_{18}(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 이동상은 water : acetonitrile : methanol (72 : 14 : 14) 용액과 acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50 : 50) 용액을 구배용매조성(gradient mode)으로 분석하였다. 형광검출기의 파장은 파장프로그램을 사용하여, 여기파장 360 nm, 검출파장 450 nm과 여기파장 330 nm, 검출파장 460 nm으로 분석하였다. 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2와 오크라톡신 A의 직선성을 검토한 결과 상관계수(R^2) 0.9997~0.9998의 범위였고, 검출한계와 정량한계는 각각 0.05~0.18, 0.16~0.60 μg/kg이었다. 회수율은 아플라톡신 B_1, G_1, B_2, G_2, 오크라톡신 A 각각 78.4~101.5%, 73.3~102.1%, 81.7~106.7%, 67.0~104.6%, 78.7~120.8%이었다.

확립된 동시분석법을 통한 국내 유통식품을 대상으로 모니터링을 실시한 결과 총 151건 중 13건에서 아플라톡신 및 오크라톡신 A가 검출되었으며 검출 범위는 아플라톡신 B_1은 0.32~1.80 μg/kg, 오크라톡신 A는 0.97 μg/kg이었다. 이들 결과로부터 우리나라에서 유통 중인 조사한 식품 151건의 아플라톡신과 오크라톡신 A의 검출량은 모두 기준치 이하로 적합한 것으로 조사되었으며 안전한 수준임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 식품의약품안전청 자체연구개발과제의 연구개발비 지원(10251식품안023)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Blesa, J., Soriano, JM., Moltó, JC. and Mañes, J.: Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local markets and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Addit Contam.*, **21**, 165-171 (2004).
2. Chu, F.S.: Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutat. Res.*, **259**, 291-396 (1991).
3. Van Der Merwe K.J., Steyen P.S., Fourie L., Scott D.B., Theron J.J.: Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, **205**, 1112-1113(1965).
4. Sibanda, L., Saeger, S.D. and Peteghem, C.V.: .Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. *J. Chromatogr. A.,* **959**, 327-330 (2002).
5. Entwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Russell, J. and Slack, P.T.: Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. *J. AOAC*

Int., **84**, 444-450 (2001).
6. 강영운, 조태용, 박희라, 오금순, 김동술: 향신료 및 건조 과실류 중 총 아플라톡신의 분석. 한국식품위생안전성학회지, **25**(1), 65-72 (2010).
7. Paulino De Moraes M.H. and Luchese R.H.: Ochratoxin A on green coffee: Influence of harvest and drying processing procedures. *J. Agric. Food Chem.,* **51**, 5824-5828 (2003).
8. Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Van Schalkwyk, D.J.: *Fusarium moniliforme* and fumonisin in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology,* **82**, 353 (1992).
9. Ueno, Y., Iijim, K., Wang, S.D., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C. and Yu, S.Z.: Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year studyof corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem. Toxicol*., **35**, 1143 (1997).
10. 이희권, 황영희, 김민정, 김무기, 이성은, 이희선: 식품 및 사료에서 발생하는 곰팡이독소의 독성 및 대사. 한국응용생명화학회지, **45**(1), 1-10 (2002).
11. 오금순, 서정혁, 소유섭, 박성수, 최우정, 이종옥, 김희연, 우건조: 식품중 총 아플라톡신의 노출량 평가. 한국식품과학회지, **39**(1), 25-28 (2007).
12. 제정현: 농산물 중 Fusarium속 곰팡이독소 검출을 위한 동시분석면역크로마토그래피법의 확립. 경상대학교 대학원 석사학위논문 (2008).
13. 김용기: 국내산 현미와 백미로부터 deoxynivalenol과 nivalenol의 동시분석법 확립과 응용. 충북대학교 대학원 석사학위논문 (2010).
14. 김성환: 면역친화성 칼럼과 HPLC를 이용한 식품 중 Aflatoxin 분석에 관한 연구. 서울산업대학교 석사학위논문 (2005).
15. Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V. and Brereton, P.: Si- multaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.,* **1059**, 13-16 (2004).
16. Hierro, J.M.H., Garcia Villanova, R.J., Torrero, P.R. and Fonseca, I.M.T.: Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: Occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *J. Agric. Food Chem.,* **56**, 751-756 (2008).
17. Garcia Villanova, R.J., Cordon, C., Paramas, A.M.G., Aparicio, P. and Rosales, M.E.G.: Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. *J. Agric. Food Chem.,* **52**, 7235-7239 (2004).
18. Gõbe,l R. and Lusky, K.: Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. *J. AOAC Int.,* **87**, 411-416 (2004).
19. Ferracane, R., Tafuri, A., Logieco, A., Galvano, F., Balzano, D. and Ritieni, A.: Simultaneous determination of aflatoxin B_1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil. *Food Addit. Contam,* **24**, 173-180 (2007).
20. Wang, Y., Chai, T., Lu, G., Quan, C., Duan, H., Yao, M., Zucker, B. Schlenker, G.: Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environmental Research.* **107**, 139-144 (2008).
21. 박승영, 문현주, 조수열, 이준구, 이화미, 송지영, 조옥선, 조대현: 유통생약의 아플라톡신 모니터링. 한국식품위생안전성학회지, **26**(4), 315-321 (2011).
22. 식품의약품안전청: 식품공전 (2010).
23. 식품의약품안전청: 식품공전 (2011).
24. Stroka, J., Petz, M., Joerissen, U. and Anklam, E.: Investigation of various extractions for the analysis of aflatoxin B_1 in different food and feed matrices. *Food Addit. Contam.* **16**, 331-338 (1999).
25. Moller, T.E. and Nyberg, M.: Efficiency of different extraction solvent mixtures used in analyses of aflatoxins from a certified peanut meal reference material. *Food Addit. Contam.* **21**(8), 781-785 (2004).
26. 오금순, 서정혁, 박성수, 소유섭, 최우정, 안영순, 이종옥, 우건조: 식품중 총 아플라톡신 분석법 개선. 한국식품위생안전성학회지, **21**(2), 76-81 (2006).
27. Procedual Manual 19th ed. Codex Alimentarius Commission, Joint WHO/FAO Food Standard Programme, Rome. 52-53 (2010).
28. 장미란, 이창희, 조성혜, 박준식, 권은영, 이은진, 김소희, 김대병: HPLC-FLD 및 LC-MS/MS에 의한 식품 중 총아플라톡신 오염실태조사. 한국식품과학회지, **39**(5), 488-493 (2007).
29. 김소희 등: 식품 중 곰팡이독소류 실태조사-식품 중 총 아프라톡신 실태조사. 식품의약품안전청 연구보고서, **10**, 827-837 (2006).
30. Abdulkadar, A.H.W., Al Ali, A. and Al Jedah, J.: Aflatoxin conta-mination in edible nut import in Qatar. *Food Cont.,* **11**, 157-160 (2000).
31. 박제원: 국내 시판 땅콩 및 땅콩버터 중 Aflatoxin B_1 오염 분석. 한국식품과학회지 **38**(2), 309-312 (2006).
32. 김동호, 장한섭, 김영민, 안종성: 고추 중 오크라톡신 A와 아플라톡신의 오염도 조사 및 저감화방안 연구. 한국식품위생안전성학회지, **24**(4), 299-306 (2009).
33. 김철재, 박경란, 김종배, 신현길: 가정과 재래시장에서 수거한 된장, 간장, 고추장에 존재하는 ochratoxin A 분석. 한국식품위생안전성학회지, **9**(4), 221-228 (1994).
34. 박성국, 권기성, 김미혜, 정소영, 장귀현, 남태희, 이종옥, 김명철: HPLC를 이용한 전통식품 중 오크라톡신 A 오염도 조사. 한국식품과학회지, **36**(1), 158-161 (2004).