

식품중의 Aflatoxin과 HPLC에 의한 분석법

노 정 구 · 박 명 옥

<한국과학기술원 안전성연구실>

1 서 론

곰팡이에 의하여 생성되는 유독대사물인 Mycotoxin은 우리의 건강장해를 일으키는 물질로 알려져 왔다. 그 중에서도 1960년대 영국에서 발생한 Turkey-X disease사건의 원인이 Brazil산 땅콩을 원료로 한 사료에서 발견된 *Aspergillus flavus*의 분비물인 aflatoxin에 기인한다는 것이 밝혀진 이래 많은 사람들에게 의해서 aflatoxin의 특성 및 그 특성들이 조사되어 왔다. aflatoxin은 옥수수, 땅콩, 쌀, 면실, 대두, 보리, 생강, 옥류와 옥가공품 등에서 많이 발견되었으며 아프리카와 아시아의 농작물에서 특히 많은 양의 aflatoxin이 발견된다.¹⁾

aflatoxin은 발암성이 강하며 포유동물, 조류, 어류 등에 광범위하게 나타남이 발견되었다. 독성의 크기는 동물에 따라 다르며 가장 크게 나타나는 오리에 있어서 aflatoxin B₁의 급성독성(LD₅₀)은 0.36mg/kg이다. Wogan²⁾에 의하면 aflatoxin B₁을 매일 12μg씩 245일간 숫컷 rat에게 주었을 때 간암 발생율이 80%, 4μg씩 주었을 때 14%가 된다고 보고하

였다.

인간에 대한 독성은 아프리카와 동남아시아에서 조사되었다. 특히 Thailand에서 식품의 aflatoxin 오염이 가장 높은 Singburi 지방과 Ratburi 지방에서 높은 간암을 발생이 발견되었으며 아프리카 Kenya에서의 1967~1970년의 간암발생율이 aflatoxin의 섭취에 비례하므로 aflatoxin이 간암발생에 원인적인 요소임이 Peers et al³⁾에 의해 지적되기도 했다. 이러한 발암성 뿐만 아니라 확실시되지는 않았으나 Indian child cirrhosis로 알려진 병의 요인이 된다고 보고되었다. 만성독성들 외에 급성독성들도 간암의 발생이 높은 Taiwan, Uganda 및 Thailand에서 보고되었으며 Thailand의 Reye's syndrome과 같은 증상이 aflatoxin에 기인되리라는 보고도 있었다.⁴⁾ 중요시되는, 간에 대한 aflatoxin의 특성기작에 대해 명확하게 알려지지 않은 점이 많으나 생체내에서 세포의 원형질 및 핵에 작용하여 세포에 큰 장해를 주는 것으로 나타났다.⁵⁾

국내에서 aflatoxin이 문제되기 시작한 것은 1968년 전주예수병원의 Seele이 국내 발효식품중 발암물질의 존재가능성을 제기한 후부터 지금까지 이에 대한 다수의 보문이 발표되었

표 1. Aflatoxins in consumer peanut products and corn (corn meal) in various countries

Countries	Period covered		No. of samples		Aflatoxin B ₁			
					incidence(%)		average($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Peanut	Corn	Peanut	Corn	Peanut	Corn	Peanut	Corn
U.S.A and Canada	1972-5		1416		19		1	
U.S.A., corn belt		1964-5, '67, '74		1763		2.5		<1
U.S.A., southeast		1967-'70, '70		175		41		18
Thailand	1967-9		216	62	54	35	470	93
Uganda	1966-7		150	48	19	40	70	53
Philippines	1967-9		309	98	88	97	130	110

다.^{6,18)} 국내에서 소비되고 있는 식품과 사료 중 옥수수, 쌀, 대두 등 수입되는 일부 원료에 aflatoxin이 존재할 가능성이 많으며 여름의 고온다습한 기후로 인해 발효 및 저장식품에서도 오염될 가능성이 높다.

식품과 사료가운데 가장 많은 aflatoxin이 발견되어지는 땅콩 및 옥수수의 지역에 따른 aflatoxin의 오염정도를 살펴 보면 표 1과 같다.

표 1에 나타난 것과 같이 미국과 캐나다의 식품에서는 거의 나타나지 않으나 고온다습한 필리핀, 타일랜드 등의 땅콩과 옥수수에서는 매우 많은 aflatoxin이 존재하며 미국 내에서도 남서부지역의 옥수수가 다른 지역의 것 보다 많은 aflatoxin을 함유하고 있었다.

표 2. Incidence of aflatoxins in small grains in commercial channels in the united states 1967-75

Grain	No. Samples examined	No. Samples with detectable aflatoxins	Average aflatoxin B ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Wheat	1,828	3	8
Grain Sorghum	786	10	12
Oats	416	3	6
Rye	35	2	trace
Barley	254	0	—
Rice	170	1	5

우리나라에서 주식으로 사용되는 쌀을 비롯한 보리, 밀 등의 곡류에서는 aflatoxin이 거의 나타나지 않으나(표 2) 요리된 쌀이 오랫동안 잘못 저장되었을 때 aflatoxin의 오염원이 될 수 있다고 나타났다.¹⁾

이렇게 널리 존재하는 aflatoxin에 대하여 선진 각국을 비롯한 여러 나라에서 식품 및 사료에서의 aflatoxin오염정도를 규제하는 법들이 제정되었다(표 3). 1968년 미국에서는 수입 농작물의 aflatoxin에 대한 자율적 규제가 시행된 후 수입된 Brazil nut의 aflatoxin 오염 정도는 급격히 줄었으며 수입되는 물품의 20%가 aflatoxin의 오염으로 인하여 금지되기도 하였다. 또한 대부분의 식량과 사료를 외국에 의존하는 일본은 수입식품 및 농작물에서의 aflatoxin 및 기타 미생물독소 존재여부에 대해 예민한 반응을 보이고 그 규제도 매우 철저하다. 그러나 우리나라에서는 아직도 aflatoxin의 규제법이 제정되어지지 않은 상태이다.¹⁾

Aflatoxin을 생성하는 균주로는 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. Ochraceus*, *Penicillium citricus*, *P. glaucum*, *P. purpurogenum* 등이 있으나 특히 *A. flavus*와 *A. parasiticus*가 aflatoxin을 대량 생산하며 같은

표 3. Aflatoxin Control in Various Countries

Country(s)	Legal Control	Commodity	Food	Feed	Aflatoxins Limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Remarks
Brazil	Ministerial decree	Peanut meal		×	50B ¹	Export control
Canada	Administrative guideline	Consumer nuts and nut products	×		15T ²	Control under hazard to health
Denmark	Decree	Peanuts, shelled Brazil nuts, peanut products	×		0	Analytical method sets 5B
EEC Countries ³	Council directive	All mixed feeds		×	10-50B	Dependent on animal
		Dairy supplements		×	20B	
France	Regulation (in preparation 1 April 1976)	All foods	×		5B	
West Germany	Regulation (effective 1 Jan 1977)	All foods	×		5B or 10T	Not to exceed either criterion
India	Indian Standards Institute suggestion	Peanut meal	×		30B	Based on WHO/PAG recommendation
Israel	Stored Products Research Lab recommendation	All feedstuffs		×	20B	
Italy	Ministry of Health circular	Peanuts or peanut products	×		50B	
Japan	Regulation	All foods	×		0	Analytical method set 10B
		Peanut meal		×	1,000B	Use in feed limited chicks, calves, pigs—10% dairy—<3% other livestock—<5%
Malawi	Export regulation	Peanuts	×		5B	
Malaysia	Food code	All foods	×		0	Set by analytical method
Netherlands	Royal decree	Peanuts and peanut products	×		0	Analytical method sets 5B
Norway	Ministry of Agriculture regulation	Oilseed meals		×	600B	Limited in feed concentrate to <8%
Poland	Bill	All foods	×		0	Set by analytical method
	Ministry of Agriculture regulation	All mixed feeds			0-200B	Dependent on animal, and regulated limit of peanut products in feed
Rhodesia	Voluntary code	Peanuts	×		25B	
Sweden	Royal decree	Mixed feeds		×	50-400B	Dependent on animal
	Advisory standard	All foods	×		5T	
United Kingdom	Tariff regulations	Peanut meal	×	×	600B	Dairy feed limit 15%
	Tariff regulations	Peanuts	×		50B	
United States	Regulated tolerance	Consumer peanut products	×		15T	Proposed regulation
	Administrative guideline	All other foods or feeds	×	×	20T	

¹Aflatoxin B₁. ²Total aflatoxins. ³European Economic Community.

중에서도 aflatoxin의 생성에 큰 차이가 있음이 보고되었다. 또한 aflatoxin이 생성되기 위해서는 *A. flavus* 단독으로 존재해야 하며 다른 미생물이 공존하면 소량만 생성되거나 또는 생성되지 않는다. aflatoxin은 가장 발암성이 강한 B₁과 그의 B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, GM₁, B₃, aflatoxicol 등으로 분리되고 있으며 U. V light 하에서 강한 형광성으로 초미량(ng unit)까지 정량되어 질 수 있다. 이 물질은 건조한 상태에서는 용융점까지 가열시에도 열에 안정하나 수분 존재시에는 불안정하다. 또한 강산성과 강알칼리(pH < 3과 > 10), 산화제, 환원반응 및 U.V와 γ -ray 조사에 불안정하다. 이것은 furan ring의 불포화성과 lacton 구조에 기인된다고 보고되었다.⁴⁾

우리나라에서는 1969년부터 식품중 aflatoxin의 유무와 이에서 분리한 곰팡이의 aflatoxin 생성 등에 대한 검색이 수행되어졌다. 곡류 및 된장 등의 대두발효식품을 검색한 결과 TLC상의 R_f값으로 보아 aflatoxin과 동일한 형광물질이 발견되었으나 자외선 흡수스펙트럼이 표준품과 일치하지 아니하여 aflatoxin의 존재와 생성균주에 대한 추리를 벗어나지 못하였다. 1977년 이서래 박사팀이 이 실정에서 벗어나기 위해 메주, 된장, 땅콩에서의 aflatoxin을 검출 정량 후 분리한 B₁을 정제하여 용매체를 달리한 TLC와 유도체 합성에 의해 그리고 생물학적 검정에 의해 표준품과 동일한지의 여부를 밝혔으며 이 실험에 의하여 부산에서 수집한 된장중 aflatoxin의 함량은 선진국에서의 허용량을 수십배나 초과한 것으로 나타났다.⁶⁾

TLC에 의한 aflatoxin 동정분석상의 문제점은 대부분 HPLC를 이용하여 해결된다. 외국

에서는 1975년부터 HPLC를 이용한 aflatoxin 분석법이 발표되었으며 일반적으로 HPLC를 이용한 방법은 신속성, 선택성, 정확성 등의 이점을 가짐이 보고되어져 왔다. 또한 detector로 fluorescence Spectrometer를 사용시 0.1ng 이하까지 정량되어 질 수 있다.

본 실험실에서 HPLC에 의해 aflatoxin의 분석이 행해 졌으며 시료로 사용된 시중 땅콩의 대부분에서 aflatoxin은 검출되어지지 않았다. (2ppb 이하) 그러나 제과용으로 사용되어지는 분쇄된 땅콩에서는 aflatoxin이 미량 존재하는 것으로 나타났다(10ppb 정도). 본란에서는 aflatoxin의 분석에서의 각 정제법 및 정량법 그리고 HPLC를 이용한 방법들에 대해 논하여 보고저 한다.

② 분석 방법

1. 검체채집

분석검체가 모든 검체를 대표하지 않을 때 분석결과는 별 의미가 없게되므로 검체는 가능한 한 여러번 무작위로 취한다. 이 검체는 처음 No. 8이나 10 sieve를 통과하도록 분쇄되어지며 1~2kg의 분쇄된 검체는 다시 No. 20 sieve를 통과하도록 분쇄되어져 검체로 취한다.

2. 추출법

여러 추출방법들이 1960년 초기부터 발표되었으며(표 4), 검체에 따라 조금씩 다른 추출법들이 AOAC methods에 제시되었다. AOAC CB method와 BF method의 비교실험에서 CB method가 높은 recovery, BF method가 더 나은 정제방법으로 나타났으며 Pons 등에 의하여 methanol : HCl 추출방법이 위의 두 장점

표 4. Primary extraction of aflatoxins from ground peanuts

Method	Sample(g)	Tope extraction	Time	Extraction solvent*	Separation of extract
Robertson et al	50	Blender	4min	A : W : H	Centrifuge
Lee et al**	20	Shaker	30min	C : W	filter
AOAC CB method	50	Shaker	30min	C : W	filter
AOAC BF method	50	Blender	1min	M : W : H	Centrifuge
일본식품위생법	50	Blender	5min	M : W : H	Centrifuge
Pons et al	50	Shaker	30min	M : HCl	filter

* M=methanol, H=hexane, W=water, A=acetone, C=chloroform

** 지방이 pet. ether로 전처리됨.

을 가지고 있음이 보고되었다.⁷⁾

3. 정제법

Partition method와 chromatographic method에 의하여 정제된다. aqueous methanol, acetone층은 Hexane을 사용하여 지방을 제거하며 이 수층은 chloroform과 methylene chloride, Benzene 등으로 추출한다. 색소와 aflatoxin보다 적은 친수성을 가지는 성분은 질산은, 암모늄설페이트, 초산납과 같은 염을 사용하여 미리 제거한다. chromatography 법에 있어서 silicagel이 주로 사용되며 alumina와 florisil (MgSiO₃)도 가끔 사용된다. alumina를 사용시 aflatoxin이 염기성 alumina에 의하여 파괴되므로 산성이나 중성 alumina가 사용된다. AOAC법에 의하면 초산으로 처리된 florisil이 green coffee를 위해 사용된다. 추출액이 column에 가하여 진 후 가능한 한 빠른 flow rate로 용출된다.

색소와 지방은 처음 hexane과 ether, benzene-HOAC와 Ether-hexane이나 toluene-HOAC와 ether-hexane 등으로 용출시키고 chloroform-methanol, chloroform-acetone 그리고 dichloromethane-acetone 등으로 aflatoxin을 용출한다.⁸⁾ 또 다른 정제방법으로 TLC를 사용하며 이것은 2차원적인 전개법을 이용하여

여러 용매를 사용할 수 있어 aflatoxin의 선택성을 높여 주므로 최근 egg에 있는 aflatoxin B₁ 정제방법으로 AOAC법에 선택되었다. 그러나 이 방법은 recovery가 낮다고 보고되었다.

4. 정량법

초기에서부터 아직도 널리 사용되고 있는 방법으로써 TLC상에서 표준품과 같은 R_f값을 가지는 물질의 형광성을 장파장 U.V하에서 비교하여 정량한다. 이 때 표준용액을 B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 비율이 1 : 0.2 : 1 : 0.2 μg/ml로 만들고 TLC에 2~15ng/spot 농도로 점적한다. 전개시 사용되는 용매는 acetone-chloroform이 formic acid나 acetic acid가 포함된 용매나 세 가지 용매로 혼합된 용매 benzene-ethanol-water나 ether-methanol-water보다 TLC parameter에 적게 영향받으므로 많이 사용된다. TLC에 사용되는 흡착제의 조건, 사용되는 용매 등 자세한 방법들은 AOAC method에 제시되었다.

TLC에 의한 정량에서 유도될 수 있는 오차 (spotting technique, silicagel adsorption activity, silicagel particle size etc에 기인되는 오차)로 낮은 정확성 및 결과의 재현성(최소치 20%)의 문제들, 또한 aflatoxin의 photochemical decomposition과 harmful vapor

들의 성질은 HPLC에 의한 분석으로 유도하였다.

5. HPLC에 의한 정제 및 정량법

HPLC에 의하여 분리된 aflatoxin은 U.V spectrometry와 fluorospectrometry에 의해 detect되어지며 U.V detector에 의하여 360~365nm에서 5~10ng으로 최소분석 적정치가 얻어지며 fluorescence detector (excitation : 360~365nm, emission : 400~430nm)에 의하여는 B₂와 G₂ 그리고 B₁과 G₁은 B_{2a}와 G_{2a}로 전환되어 0.2ng으로 적정치가 얻어진다. 이것은 TLC에 의해 detect될 수 있는 2ng과 비교시 10배이상 높은 sensitivity를 가진다. 1975년 Garner⁹⁾에 의하여 HPLC를 이용한 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 분석이 발표되어진 이래 여러 다른 column packing 및 mobile phase를 이용한 aflatoxin의 분석정량법이 보고되었다.

HPLC column으로 microparticulate column이 비용이 적게 드는 pellicular column보다 더 효율적이고 정밀한 결과를 보여준다. normal phase 5~10 microparticulate silicagel column이 주로 사용되었으며 reverse phase octadecyl silicagel column과 Micropak-CN column에 의한 분석들도 발표되었다.^{10,19)} silicagel column에는 dichloromethane과 chloroform이 주용매로 사용되었으며 water saturated dichloromethane or chloroform-cyclohexane-acetonitrile (25 : 7.5 : 1.0)^{7,11)}, 0.3% V/V methanol in water saturated dichloromethane⁹⁾, chloroform : methylene (3 : 1)¹⁰⁾들을 이용하여 분석하였다(그림 1).

그 후 정량되어지는 fluorescence가 chloroform과 dichloromethane에 quenching되어지

므로 이 용매를 이용치 않는 mobile phase toluene-ethylacetate-formic acid-methanol (89.0 : 7.5 : 2.0 : 1.5)들이 제시되어 지기도 하였다.¹²⁾ aflatoxin의 분석이 normal phase silicagel column에 의해서만 잘 분리되었다고 보고된 후 reverse phase column에 의한 분석은 늦게 Takahashi¹³⁾에 의해 이루어 졌다. silica ODS-bonded와 Silica CN-bonded column에 의해서도 높은 recovery와 sensitivity를 나타냈으며 B₁과 G₁를 trifluoroacetic acid로 처리하므로 B₁, B₂, G₁ 및 G₂ 모두 0.05~0.1ng까지 분석하였다. Octadecyl Silicagel column에는 비율을 달리한 water, methanol, acetonitrile의 혼합용매들이 사용되었으며 Hurst et al¹⁴⁾은 1mM sodium chloride-methanol-acetonitrile(3:1:1)를 사용하여 10분이내에 peanut butter에 있는 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를

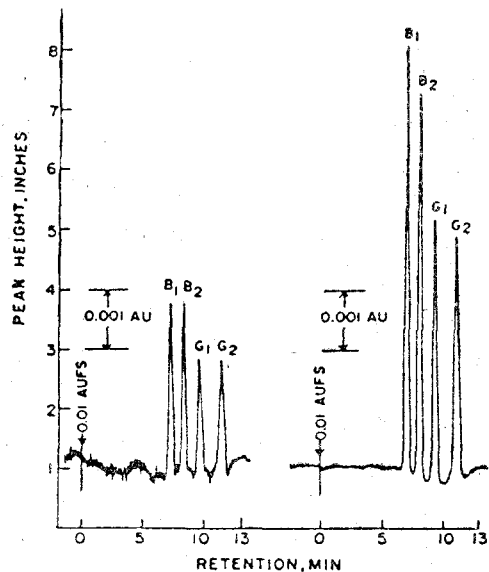


그림 1.-HPLC resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂, 10 and 25 ng each, on μ Porasil, elution solvent water-saturated CHCl₃-cyclohexane-acetonitrile (25+7.5+1.0) + 1.5% added ethanol; flow rate 1.0 ml/min, detection 360 nm, 0.01 AUFS.

분리정량하였다.

6. 분석 예

Peanut products, cottonseed products, peanut butter, 옥수수, 곡류, 간장 및 메주에서의 aflatoxin 존재는 HPLC에 의하여 정량되어져 왔다. 일반적으로 미국 AOAC methods의 CB method에 의해 추출된 용액은 column chromatography의 정제과정을 거쳐 HPLC에 의해 분석된다. HPLC에 의해 분석전 시료에 따른 조금씩 다른 정제법들이 발표되었다.

Pons et al¹²⁾은 peanut product를 0.1N HCl와 methanol 혼합용매로 추출후 여액은 10% NaCl soln과 hexane으로 진탕 후 aqueous phase는 dichloromethane으로 추출된다. 이 용액은 column chromatography에 의해 정제되며 이 때 사용되는 용매는 hexane, ether 대신 benzene+acetic acid(9:1), ether+hexane(3:1)이 사용되며 chloroform+methanol 대신 dichloromethane+acetone(9:1)로 용출한다. 이때 용매는 각각 150ml보다 훨씬 적은 40~50ml가 사용된다. 이렇게 정제된 시료는 normal phase 및 reverse phase column들에 의해 분석정량되어졌다(그림 2). 그림 1에서와 같이 normal phase column에서 flow rate를 1.0ml/ml로 하였을 때 15~20분이

내에 정량된다. reverse phase column에서도 (그림 2) 15~20분 이내에 정량되나 B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 용출되는 순서가 normal phase의 순서와 반대된다. gossypol 및 여러 색소가 많은 cottonseed product도 위의 방법에 의해 정제 후 HPLC로 분석되었으며 90~95%의 높은 recovery와 7.3%(B₁), 7.4%(B₂)의 낮은 편차를 나타내었다.¹¹⁾

Lansden et al은 peanut과 rice의 aflatoxin을 methanol: water로 추출 후 sal+saln으로 처리하여 alumina column을 통과한 후 HPLC에 의해 분석정량하였으며¹⁵⁾ 간장과 메주에 있어서 aflatoxin을 Wei et al¹⁶⁾은 SEP-PAK

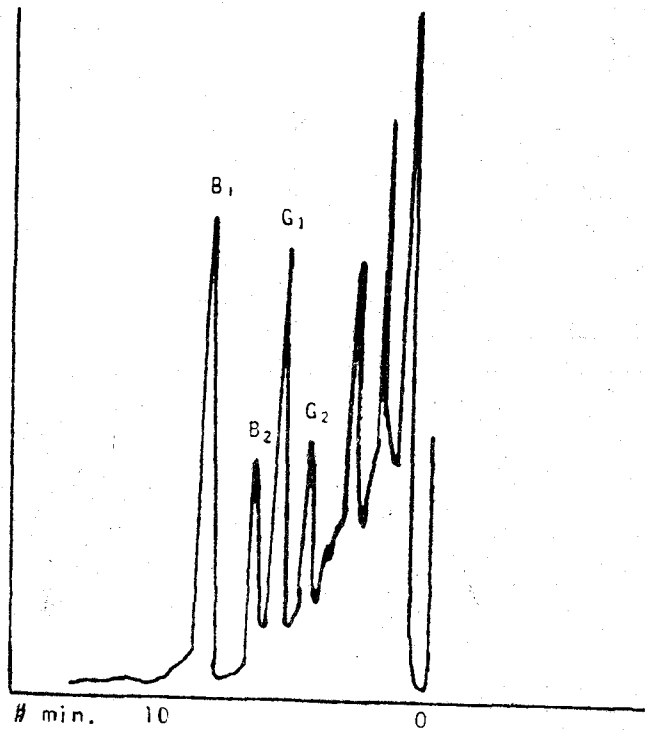


그림 2. . . Chromatogram of artificially contaminated peanut butter sample. Column: Chromegabond C18. 5μ4.6 mm x 15 cm; Solvent: 1 mM NaCl + CH₃CN + MeOH (3 + 1 + 1); Flow 1 ml/min; Detector: Waters Assoc. Model 440 Absorbance Detector (365 nm).

silica cartridge와 TLC에 의하여 정제후 HPLC에 의해 분석정량하였다. 일반적인 column chromatography에 의한 정제시 보다 훨씬 적은 용매가 사용되었으며 BF method 보다 방해물질이 적다고 보고되었다. Goto et al¹⁷⁾은 정제법에 있어서 silicagel-sodium sulfate column 대신 acidic alumina-silicagel-sodium sulfate column을 사용하므로 aflatoxin B₁ 부근의 방해물질을 줄였으며 옥수수 및 여러 사료에 가하여진 aflatoxin은 90~100%의 높은 recovery를 나타내었다. ■

참 고 문 헌

1. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehlman, M.A. (Ed.), Mycotoxins, Pathotox Publishers Inc. (1977).
2. Wogan, G.N., Mycotoxins Ann. Rev. Pharmacol., 15, 437(1975).
3. Peers, F.G. and Linsell, C.A., Br. J. Cancer 27, 473(1973).
4. Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G. (Ed.), Mycotoxic Fungi, Mycofoxines, Mycotoxicoses, An Encyclopedic Handbook, Vol. 3, MARCEL DEKKER, INC.(1978).
5. Essigmann, J.M. Croy, R.G., Nadzan, A.M. and Busby, W.F., Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 1890(1977).
6. 金容華·皇甫丁淑·李瑞來, 한국식품과학회지, 9,1(1977).
7. Pons, W.A. Jr. and Franz, A.O. Jr., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61,4, 793(1978).
8. Neshim, S., NBS Symposium on trace organic analysis (1978).
9. Garner, R.C., J. of Chrom., 103,186(1975).
10. Seitz, L.M., J. of Chrom., 104,81(1975).
11. Pons, W.A. Jr. and Franz, A.O.Jr., J. Assoc. off. anal. chem., 60,1,89(1977).
12. Manabe, M., Goto, T. and Matsuura, S., Agric. Biol. Chem., 42,11, 2003(1978).
13. Takahashi, D.M., J. of Chrom., 131,147 (1977).
14. Hurst, W.J. and Toomey, P.B., J. of Chrom Sci., 16, 372(1978).
15. Lansden, J.A., J. Agric. Food Chem., 25,4, 969(1977).
16. Wei, R.D., Chang, S.C. and Lee, S.S., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63,6,1269(1980).
17. Goto, T., Manabe, M. and Matsuura, S., Agric. Biol. Chem., 43(12), 2591(1979).
18. 李泰寧·李相圭, 한국식품과학회지, 1,78(1969)
19. Johnson, E.L. and Abu-Shumays, A., Liquid Chromatography at work #48, Varian Aero-graph, Walnut Creek, California

.....
건전한 가정의례 건전한 사회건설
