

HPLC를 이용한 전통식품 중 오크라톡신 A 오염도 조사

박성국* · 권기성 · 김미혜 · 정소영 · 장귀현 · 남태희 · 이종욱 · 김명철
식품의약품안전청

Survey of Ochratoxin A in Cereal-based Korean Traditional Foods by HPLC

Sung-Kug Park*, Kisung Kwon, Meehye Kim, So-Young Jeong, Gui-Hyun Jang,
Tae-Hee Nam, Jong Ok Lee, and Myung-Chul Kim
Korea Food and Drug Administration

To determine rapid and reliable analytical method for ochratoxin A detection in cereal-based Korean traditional foods, ochratoxin A content was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with immunoaffinity column clean-up. Recoveries of ochratoxin A in tested samples ranged from 68.4 to 85.3%. Occurrences of ochratoxin A were 15, 10, and 5% for *Kochujang*, *Deonjang*, and *Kanjang*, respectively. None was detected in *Sunsik* (mixed cereals). Average levels of ochratoxin A ranged from 0.5 to 1.3 µg/kg, lower than maximum residue level of 5-50 µg/kg of ochratoxin A recorded in foreign food code.

Key words: food, ochratoxin A, occurrence, HPLC

서 론

Ochratoxin은 자연계에 널리 존재하는 독성물질로서 aflatoxin, fumonisin, trichothecene, zearalenone과 더불어 곰팡이독소의 대표적 물질로서 ochratoxin A, ochratoxin B, ochratoxin C, 4-hydroxyochratoxin A 등 17종의 유사체가 알려져 있는데, 이중 독성이 가장 강한 것이 ochratoxin A이며(1) 주로 *Aspergillus ochraceus*와 *Penicillium verrucosum* 등의 곰팡이에 의해 생산된다. Ochratoxin A는 여러 가지의 실험동물에 신장독성, 간장독성, 유전독성, 면역억제 작용, 기형 및 암 등을 유발하며(2), 특히 신장 및 간장에 치명적인 손상을 주는 것으로 알려졌다(3-4). 그리고, 사람에게는 남서부 유럽인 보스니아, 루마니아 등의 Balkan지역에서 발생된 Balkan 증후군인 유행성 nephropathy의 원인물질로 밝혀졌으며 만성 신장염을 일으키는 신장독으로도 보고되고있다(5). 이러한 독성으로 인해 WHO(세계보건기구)에서는 chloroform, DDT 등과 함께 ochratoxin A를 사람에게 발암가능성이 있는 물질인 독성물질 2군-B로 분류해 놓고 있으며, JECFA(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)는 ochratoxin A의 주간허용섭취량(Tolerable Weekly Intake)을 0.1 g/kg(1일 약 14 ng/kg)으로 설정해 놓고 있

으나 EC (European Committee)는 1일 허용섭취량(Tolerable Daily Intake)을 5 ng/kg으로 더 엄격하게 설정하여 최근에는 TDI를 더 낮출 것을 권고하였다(6-8).

Ochratoxin A는 곡물의 성장, 수확, 건조, 저장 중에 온도, 습도 등의 환경적 요인에 의해 생성되며 열에 안정하고 물리적 제조공정에서 안정한 성질 때문에 국외에서는 식품원료 및 제품 중 곡류 및 견과류, 육류, 커피, 빵, 사료, 우유, 포도주, 맥주 등에 널리 오염된 것으로 보고되었으며, 특히 유럽에서는 돼지와 사람의 혈액 및 모유에서도 검출되었다(9-12). 그리고, 국내에서도 곡류 및 곡류를 이용한 전통식품에서도 ochratoxin A가 발견되어지고 있는데, 김 등의 보고에 따르면 간장, 고추장, 된장에서도 ochratoxin A가 오염되어 있음을 보고하고 있다(13). 이렇듯 국내외적으로 ochratoxin A는 식품의 안전성 관리측면에서 커다란 문제가 되고 있어 10여개의 국가에서 잔류허용기준을 설정하여 규제하고 있는데, 덴마크, 프랑스, 스웨덴, 루마니아, 그리스 등 주로 유럽국가에서 규제하고 있으며 식품은 주로 쌀, 보리 등 곡류에 대해 5-50 g/kg의 범위로 규제하고 있으며 사료에 대해서는 이스라엘, 루마니아, 스웨덴 등의 국가에서 5-300 g/kg의 기준을 설정하여 규제하고 있다(12). 아직까지, 우리나라에서는 ochratoxin A의 잔류허용기준 마련에 필요한 기초자료인 식품 중에 함유실태 및 안전성평가에 관한 연구보고가 초기단계이거나 미흡한 실정이며 함유실태조사에 필요한 분석방법에 대한 연구보고도 대부분이 곡류에 대한 것이고 전통식품(고추장, 된장)에 대한 연구도 보고되었으나 결과에 사용된 분석법은 대부분 면역학적 방법으로 정밀한 기기분석법에 비해 신뢰성이 떨어지는 것이다(13-15).

본 실험에서는 전통식품의 안전성 확보와 이에 대한 효율적

*Corresponding author : Sung-Kug Park, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1692
Fax: 82-2-382-4892
E-mail: skpark7@kfda.go.kr

인 관리를 위한 기초자료를 마련하기 위해 분석시간이 짧고 유독한 유기용매 사용이 적은 상업용 분석 키트인 immunoaffinity columns을 사용하는 전처리 방법(16-18)과 HPLC 분석방법을 확립하여 고추장·된장 등의 국내 전통식품을 대상으로 ochratoxin A의 오염도를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

국내에서 시판되고 있는 선식(40종), 간장(20종), 된장(20종), 고추장(20종)을 2000년 11월부터 2001년 2월까지 서울 시내 수퍼마켓, 대리점 등에서 구입하여 시료로 사용하였으며, 실험에 사용한 ochratoxin A 표준물질은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 5 mg을 benzene : acetic acid (99 : 1, v/v)에 녹여 1,000 mg/L으로 제조한 후 적당량을 취하여 acetonitrile로 용해시킨 후 희석하여 사용하였다. 그리고, acetonitrile, ethyl acetate, acetone, methanol은 HPLC급을, phosphoric acid, sodium bicarbonate, acetic acid는 ACS급을, 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다. 정제에 사용한 cartridge는 Sep-Pak C₁₈ plus cartridge(Waters Co., USA)와 immunoaffinity column (Vicam Co., USA)를 사용하였다.

시험용액의 조제

AOAC method: 시료 25 g을 취해 0.1 M phosphoric acid 2.5 mL과 chloroform 125 mL을 넣고 3분간 혼합하여 얻은 추출액을 Whatman paper No. 1로 여과하였다. 여과액 50 mL을 분액깔때기에 넣고 3% sodium bicarbonate 10 mL을 넣어 추출한 후 bicarbonate층을 취하였다. C₁₈ cartridge의 시료주입은 cartridge를 활성화시키기 위하여 methanol 2 mL, 증류수 2 mL, 3% sodium bicarbonate 2 mL을 흘려보내고 통과가 끝난 후 여과액 5 mL을 cartridge에 통과시키고 0.1 M phosphoric acid와 증류수를 각각 2 mL씩 흘려서 세척하였다. 다음으로 ethyl acetate-methanol-acetic acid(95 + 5 + 0.5) 8 mL을 흘려서 ochratoxin A를 용출시킨 후 수욕조상에서 질소로 농축하여 이동상으로 녹인 후 0.45 m 필터를 통과시켜 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

Immunoaffinity column method: 시료 25 g을 취하여 blender에 70% acetonitrile 100 mL을 넣고 3분간 균질화하여 얻은 추출액을 Whatman paper No. 1로 여과하였다. 여과액 4 mL을 PBS 용액(증류수 1 L에 potassium chloride 0.2 g, potassium dihydrogen phosphate 0.2 g, anhydrous disodium hydrogen phosphate 1.16 g, sodium chloride 8.0 g을 용해시켜 제조) 44 mL과 혼합한 후 immunoaffinity column에 2 drop/sec의 유속으로 용출시키면서 column이 마르지 않도록 하였다. 통과시킨 후 증류수 10 mL로 세척하고, methanol 2 mL로 용출시켜 이 용출액을 질소로 농축하여 HPLC 이동상으로 용해시킨 후 0.45 m 필터를 통과시켜 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

유도체화: 분석결과시 검출된 시료의 ochratoxin A 확정실험으로 ochratoxin A를 유도체화하여 머무름 시간(retention time)의 차이를 비교하여 보았다. 검출된 시료는 동일한 방법으로 전처리를 한 후 수욕조상에서 질소로 농축한 후 500 µL boron trifluoride methanol을 넣어 80°C에서 10분간 반응시킨 후 다시 질소 농축하여 이동상으로 녹인 후 HPLC 분석에 사용되었다.

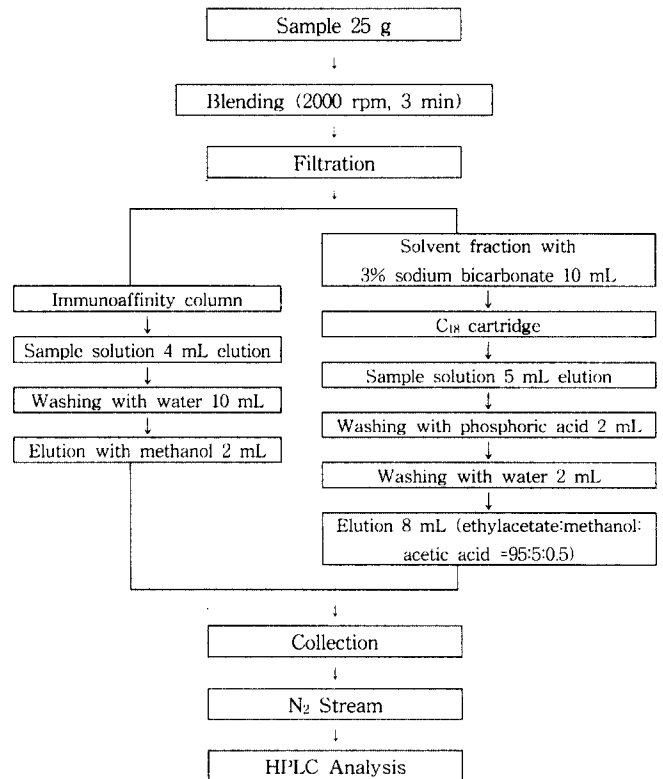


Fig. 1. Flow chart of the sample preparation for HPLC analysis.

분석

HPLC 분석에 사용한 HPLC(high performance liquid chromatography)는 Injector(waters 717 plus Autosampler), pump (Waters 510), fluorescence detector(Waters 470)이고 data 처리는 Waters사의 Millennium32 프로그램을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 컬럼은 C₁₈ Novapak(3.9 mm×300 mm, 5 µm)이고 이동상은 물 : 아세토니트릴 : 초산(5 : 5 : 0.1, v/v) 혼합용액을 사용한 후 시료를 50 µL 주입하여 0.6 mL 유속으로 흘려 ochratoxin A를 형광검출기(Ex 333 nm, Em 460 nm)로 검출하였다(Table 1).

결과 및 고찰

시료전처리법 비교

정제방법을 비교하기 위해 각 시료에 ochratoxin A 표준용액 20 µg/L, 2 mL를 첨가하여 회수율을 알아보았다(Table 2). 그 결과 된장을 제외한 시료에서 모두 immunoaffinity column을 사용한 경우가 AOAC 방법에서 사용한 C₁₈ Sep-Pak cartridge보다 회수율이 높게 나타났다. 이는 시료에 사용한 추출용매와 정제 방법이 AOAC 방법에 비해 immunoaffinity column을 사용했을

Table 1. Operating conditions of HPLC for ochratoxin A analysis

Parameters	Condition
Column	Novapak 3.9 mm × 300 mm, 5 m
Mobile phase	Water : Acetonitrile : Acetic acid = 5 : 5 : 0.1
Detector wavelength	Ex: 333 nm, Em: 460 nm
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	50 µL

Table 2. Result for recovery test of ochratoxin A from different sample preparation methods

Sample	Spiked level (µg/kg)	Recovery level (µg/kg)		Recovery (%)	
		Immunoaffinity coulmn	AOAC	Immunoaffinity coulmn	AOAC
<i>Sunsik</i>	40	34.1 ± 2.1 ¹⁾	25.3 ± 2.2	85.3 ± 5.2	63.2 ± 5.4
<i>Kochujang</i>		31.4 ± 4.2	28.7 ± 3.0	78.5 ± 10.4	71.8 ± 7.4
<i>Deonjang</i>		26.4 ± 6.5	31.0 ± 1.3	68.4 ± 16.3	77.2 ± 3.2
<i>Kanjang</i>		32.2 ± 2.9	26.5 ± 2.3	80.5 ± 7.3	66.2 ± 5.8

¹⁾Result was mean and standard deviation of three trials.

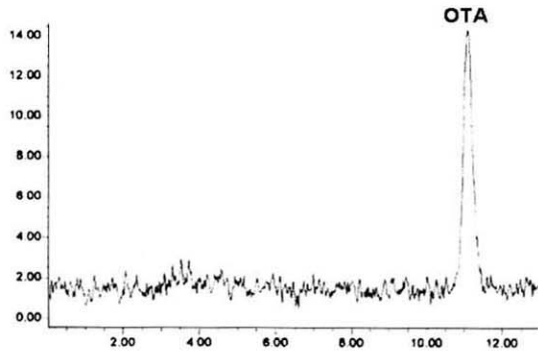


Fig. 2. Chromatogram showing the ochratoxin A (OTA) peak after immunoaffinity clean-up procedure of *Deonjang* spiked at 10 µg/kg.

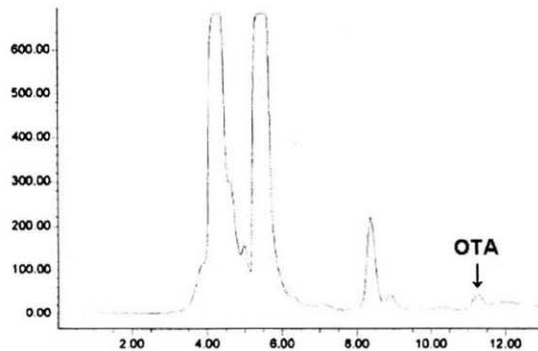


Fig. 3. Chromatogram showing the ochratoxin A (OTA) peak after C₁₈ Sep-pak clean-up procedure of *Deonjang* spiked at 10 µg/kg.

때가 손실이 작았던 것으로 사료되며, Gonzalez-Penas 등(19)이 보고한 포도주에서 immunoaffinity column을 적용한 회수율과도 유사한 수준으로 조사되었다. 그리고, ochratoxin A 정제방법에 따른 크로마토그램의 peak pattern은 Fig. 2, 3에서 비교한 바와 같이 immunoaffinity column을 통과했을 때 ochratoxin A peak 이외의 다른 피크가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 Solfrizzo 등(10)이 보고한 immunoaffinity column의 항체 특이성으로 인해 시료유래의 방해물질을 줄일 수 있다는 결과와 일치하였다.

오염도 조사결과

오염도 조사는 HPLC 분석에 의한 결과를 Fig. 4와 같이 유도체화 방법을 통해 최종적으로 확인한 결과를 토대로 검토하였다. Table 3과 같이 국내에서 시판되고 있는 선식(40건), 간장(20건), 된장(20건), 고추장(20건)을 수거하여 HPLC로 분석한

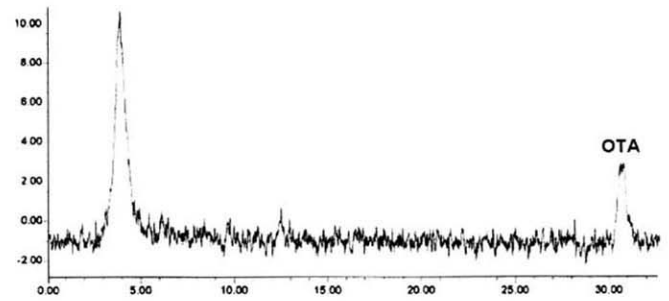


Fig. 4. Chromatogram showing the boron trifluoridemethanol derivative peak of ochratoxin A (OTA) of *Deonjang* spiked at 10 µg/kg.

Table 3. Distribution of ochratoxin A as found in samples by HPLC

Sample	Number of samples in Ochratoxin A Concentration range (µg/kg)		
	<0.5	0.5-1.0	>1.0
<i>Sunsik</i>	40	0	0
<i>Kochujang</i>	17	3	0
<i>Deonjang</i>	18	1	1
<i>Kanjang</i>	19	1	0

결과 선식 40건 불검출, 고추장 3건, 된장 2건, 간장 1건에서 검출되었으며 검출농도는 0.5-1.3 µg/kg으로 세계 여러 나라에서 식품에 규제하고있는 잔류허용기준치 범위인 5-50 µg/kg 이하(20) 오염도로 매우 낮은 수준이었다. 이러한 결과는 김 등(13)이 보고한 가정에서 제조한 장류의 평균 오염도인 된장 7.1 µg/kg, 고추장 4.0 µg/kg, 간장 2.1 µg/kg의 오염도와 차이를 보였으나, 이는 본 연구의 오염도 조사결과가 시판되는 장류에 국한된 것으로서 재래식 가정용 장류와 직접적인 비교는 할 수 없을 것으로 판단된다. 한편, 영국에서 수확·저장된 곡류에서 Scudamore 등(12)이 조사한 바에 의하면 보리, 밀, 귀리의 평균 오염도가 각 0.69 µg/kg, 0.29 µg/kg, 0.15 µg/kg 수준으로 나타났다. Czerwiecki 등(21)에 의해 폴란드 전통적인 농업방식으로 재배, 수확, 저장한 곡류의 오염도를 조사한 바에 의하면 평균 오염도가 1.11 µg/kg이었으며 이중 호밀과 밀의 평균 오염도는 14.5 µg/kg, 1.17 µg/kg로 조사되었으나 보리는 1건에서 0.3 µg/kg 오염되었고 밀은 오염되지 않은 것으로 나타났다. 그리고, Lombaert 등(22)은 캐나다에서 시판되는 커피에 대한 오염도를 조사하였는데 평균 오염농도가 원두 및 원두커피는 0.6 µg/kg, 인스턴트커피가 1.1 µg/kg으로 조사되었다. 외국에서 보고된 곡류의 오염도 조사결과를 비교해 보았을 때 시판되는 장류의 오염도 조사결과는 외국과 유사하거나 낮은 수준으로 나타났으며, 단순가공식품인 선식도 오염도 조사결과는 검출한계 이하

의 수준으로 제조, 보관, 저장 등의 유통상태가 양호한 것으로 추정되었다.

이상의 연구결과를 종합하여 볼 때, 장류 및 전식 섭취에 의한 ochratoxin A 노출에 대해 안전한 것으로 판단되나 본 연구에서 수행된 시료수가 대표성을 갖추기에는 미흡한 점이 있어 시료수와 조사대상 식품을 확대하여 지속적으로 ochratoxin A 오염도 조사가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

국내 전통식품 중에 함유되어 있는 ochratoxin A를 검출할 수 있는 신속, 정확한 분석방법을 확립하고자 immunoaffinity column과 C₁₈ Sep-Pak cartridge를 비교 후 분리도와 회수율이 우수한 immunoaffinity column으로 전처리 방법을 사용하였으며 HPLC 검출한계는 0.5 µg/kg로 나타났다. 오염도조사를 위하여 시판되는 장류(고추장, 된장, 간장 각 20건) 60건을 수거하여 분석한 결과 고추장 3건, 된장 2건, 간장 1건에서 0.5-1.3 µg/kg 수준으로 검출되었으며 수거된 전식 40건에서는 ochratoxin A가 검출한계이하 수준이었다. 이는 일부 외국의 규격치인 5-50 µg/kg와 비교해 볼 때 낮은 수준이었다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(관리번호: HMP-98-p-0041, 식품공전 미등재 오염물질 관리방안 연구)의 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

1. Frisvad JC, Lund F. Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing in stored cereals. In: Proceedings of the United Kingdom Workshop on Occurrence and Significance of Mycotoxin. Scudamore KA (ed). London, UK (1993)
2. Van Der Merwe KJ, Steyen PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature 205: 1112-1113 (1965)
3. Szczech GN, Carton WW, Tuite J. Ochratoxin A toxicosis in swine. Vet. Pathol. 10: 347-364 (1973)
4. Connole MD, Blaney BJ, McEwan T. Mycotoxins in animal feeds and toxic fungi in Queensland 1971-80. Aust. Vet. J. 57: 314-318 (1981)
5. Krogh P, Hald B, Plestina R, Ceovic S. Balkan (Endermic) nephropathy and food from ochratoxin A. Preliminary results of a survey of foodstuffs. Acta. Path. Microbiol. Sect. 85: 238-240 (1977)
6. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Some naturally occurring substances: Food Items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins Int. Agency Res. Cancer Lyon. 56: 489-521 (1993)
7. World Health Organization. Ochratoxin A-Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Add. Ser. 35: 363-376 (1996)
8. Herrman JL, Walker R. Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. In: Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Geneva, Switzerland (1999)
9. Angelo V, Michelangelo P, Gianluca C. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. J. Chromatogr. A 888: 321-326 (2000)
10. Solfrizzo M, Arantaggiato G, Visconti A. Use of various clean-up procedures for the analysis of Ochratoxin A in cereals. J. Chromatogr. A 815: 67-73 (1998)
11. Scott PM, Vanwalbreek W, Kennedy B, Anyeti Y. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. J. Agric. Food Chem. 20: 1103-1109 (1972)
12. Keith AS, Susan P, Victor B. Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in United Kingdom for ochratoxin A. Food Addit. Contam. 16: 281-290 (1999)
13. Kim CJ, Park KR, Kim JB, Shin HK. Analysis of ochratoxin A from *Deonjang*, *Kanjang*, *Gochujang* collected from houses and traditional markets. J. Fd. Hyg. Safety 9: 221-228 (1994)
14. Kim DS, Chung DH, Lee YW. Study on the analysis method of ochratoxin A in cereals by ELISA method. Korean J. Env. Hlth. Soc. 20: 54-60 (1994)
15. Chung IM, Kim EY, Park SB, Yu SH. Detection of mycotoxins from contaminated cereals (wheat, soybean, corn). Anal. Sci. Technol. 12: 534-539 (1999)
16. Lee SC, Chu FS. Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 45-49 (1984)
17. Pestaka JJ, Steinert BW, Chu FS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A. Appl. Env. Microbiol. 41: 1472-1474 (1981)
18. Shon DH, Park AR, Lee YW. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of aflatoxin B1 from the imported cereals. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 335-361 (1992)
19. Gonzalez-Penas E, Leache C, Viscarret M, Perez de Obanos A, Araguas C, Lopez de Cerain A. Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A 1025: 163-168 (2004)
20. FAO. Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995-A Compendium. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy (1997)
21. Czerwiecki L, Czajkowska D, Witkowska-Gwiazdowska A. On ochratoxin A and fungal flora in polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. Food Add. Contam. 19: 1051-1057 (2002)
22. Lombaert GA, Pellaers P, Chettiar M, Lavalee D, Scott PM, Lau BPY. Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. Food Add. Contam. 19: 869-877 (2002)

(2003년 10월 17일 접수; 2004년 1월 16일 채택)