

## ELISA-LC/MS/MS 병행에 의한 식품 중 aflatoxins 분석

김경열\* · 남민지\* · 남보람\* · 류희정\* · 송정언\* · 심원보\*\*† · 이수형\*\*\* · 정덕화\*,\*\*

\*경상대학교 응용생명과학부(BK 21 program), \*\*경상대학교 농업생명과학연구원,  
\*\*\*농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물과

(2009. 12. 17. 접수/2010. 1. 5. 수정/2010. 2. 1. 채택)

## Determination of Total Aflatoxins in Foods by Parallelism of ELISA and LC/MS/MS

Kyeongyeol Kim\* · Minji Nam\* · Bo-Ram Nam\* · Hee-Jung Ryu\* · Jeong-Eon Song\* ·

Won-Bo Shim\*\*† · Soo-Hyung Lee\*\*\* · Duck-Hwa Chung\*,\*\*

\*Division of Applied Life Science(BK 21 program), Graduate School, Gyeongsang National University,  
Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

\*\*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

\*\*\*Microbial Safety Division, National Academy of Agricultural Science and Technology,  
Rural Development Administration, Suwon, Gyeonggi 441-707, Korea

(Received December 17, 2009/Revised January 5, 2010/Accepted February 1, 2010)

### ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) have been widely used to quantify aflatoxins in food, but these methods are expensive, time-consuming, unsuitable for analysis of the routine screening of large sample numbers and require derivatization and high level techniques to perform. The objective of this study is to detect aflatoxins in a large number of foods by a high efficient analytical system of combined enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for screening and LC/MS/MS for confirmation. The samples spiked individually with aflatoxin B<sub>1</sub> (0.5 and 1.0 ng/g) and total aflatoxins (10 ng/g) were analyzed by ELISA and LC/MS/MS, and the recoveries for ELISA and LC/MS/MS were 71.8~119.2% and 70.8~135.3%, respectively. A total of 378 samples (grains, nuts, soybean and fermented soybean foods, pepper and fermented pepper foods) were purchased from the six major cities in Korea and analyzed by ELISA-LC/MS/MS system. Twenty two (5.8%; peanut: 11, pistachio: 2, walnut: 6, almond: 1, pepper powder: 1, pepper paste: 1) out of 378 samples were screened as aflatoxin B<sub>1</sub> positive by ELISA, but, 4 (1.1%; peanut: 2, pistachio: 1, pepper powder: 1) out of the 22 samples screened were confirmed as aflatoxins positive at levels of 1.02~52.79 ng/g by LC/MS/MS. ELISA-LC/MS/MS system provides a more rapid, accurate and cost-effective method for the detection of aflatoxins in large number of samples.

**Keywords:** simultaneous, aflatoxin, ELISA, LC/MS/MS, monitoring

### I. 서 론

아플라톡신(aflatoxin, AF)은 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* 등 *Aspergillus*속 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물로서, 주로 자연계에서 발견되는 아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 및 M<sub>1</sub> 등은 자외선 하에서 나타내는 형광색에 따라 B(blue)군, G(green)군으로 구분되

며, 동물의 소변과 우유에서 주로 발견되는 대사물질인 M(metabolized)군은 청자색(blue-violet)형광을 나타낸다.<sup>1,2)</sup> 특히, 가장 독성이 큰 아플라톡신 B<sub>1</sub>은 사람이나 동물에 강력한 간 독성과 발암성 및 기형유발을 일으키는 등 치명적인 위해성이 있어 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 Group I(carcinogenic to human)로 분류하고 있다.<sup>3,4)</sup> 주로 쌀, 보리, 밀 등의 곡류, 땅콩, 피스타치오, 호두 등의 견과류 및 옥수수 등과 같은 탄수화물 함량이 높은 농산물이나 그 가공품 등에서 광범위하게 발견되고 있고,<sup>5,6)</sup> 최근에는 열대 및 아열대지방을

†Corresponding author : Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University  
Tel: 82-55-751-5480, Fax: 82-55-757-5485  
E-mail : dbqlrhd@hanmail.net

중심으로 생산되는 호유자, 가자 등과 같은 종자류 생약뿐만 아니라 감초, 아차, 필발, 후추 등과 같은 일부 생약에서도 이플라톡신 오염사례가 보고된 바 있다.<sup>7)</sup>

우리나라는 최근 기후변화로 인해 이플라톡신의 생성 기후조건으로 변화하고 있고, 국가간 교역이 증가하면서 외국으로부터 농산물 및 사료용 곡물의 수입량이 증가하고 있으며, 국민 대부분이 곡류 및 곡류 가공식품을 주식으로 하고 있기 때문에 이플라톡신에 노출될 가능성이 높을 것으로 예상된다.<sup>8)</sup> 그러므로 농산물 등의 수입량 증가에 따른 장기저장이 요구되는 현 시점에서 이플라톡신 오염에 대한 안전성을 확보하기 위해서는 이플라톡신의 오염현황에 대한 체계적인 모니터링 연구뿐만 아니라 보다 간편·신속·정확한 분석법 확립에 관한 연구 역시 활발히 수행되어야 할 것으로 판단된다.

일반적으로 이플라톡신 분석에 널리 이용되는 방법은 비교적 분석과정이 간단하고 비용이 적게 드는 thin layer chromatography(TLC)법이 많이 이용되어 왔지만, 민감도가 낮고 정량분석이 어려운 단점이 있어 유럽을 중심으로 한 선진국에서는 high performance liquid chromatography(HPLC)법 등으로 대체되었고,<sup>10)</sup> 최근에는 보다 정확한 분석을 위해 질량분석기(Mass spectrometry)를 장착하여 측정대상물질을 확인할 수 있는 liquid chromatography mass spectrometry(LC/MS) 등이 이용되고 있다.<sup>11)</sup> HPLC법은 다양한 형태의 시료에 성공적으로 적용할 수 있는 획기적인 분석법<sup>12)</sup>으로 높은 특이성, 민감성 및 선택성 등의 장점이 있고, 이플라톡신 이성질체들의 구조적 차이, 특히 terminal ring의 차이에 기인한 형광 성질의 차이를 이용하여 HPLC-형광검출기에 적용하면 이플라톡신 이성질체인 이플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub> 등의 동시·개별분석이 가능하다.<sup>13)</sup> 그러나 HPLC를 이용한 이플라톡신 분석을 위해서는 시료추출과 정제과정 등에 장시간이 소요되고, 상당한 수준의 기술이 요구되며, 이플라톡신 B<sub>1</sub>과 G<sub>1</sub>의 분석 및 민감도 향상을 위해서 pre-column이나 post-column에 의한 유도체화 과정이 요구되는 등 많은 어려움 또한 존재한다.<sup>14)</sup> 특히 Kim 등<sup>15)</sup>에 의하면, 현재 적용되고 있는 대부분의 유도체화 방법은 기술적, 경제적 측면에서 여러 가지 문제점이 있어 분석에 어려움을 더욱 심화시키고, 분석 오차를 크게 하는 요인이 되고 있는 것으로 보고하였다. 또한, 많은 양의 시료를 동시에 분석할 경우, 전처리 및 유도체화 과정 등에서 많은 기술적, 시간적 및 경제적 문제에 직면할 수 있어 보다 효율적이고 안정적인 분석방법이 필요하다고 보고하였다. 최근 전통적인 기기분석의 단점을 보완

하고 대체하기 위해 널리 이용되고 있는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 민감도가 높고, 간편·선택성이 탁월하며 전처리 과정이 간단할 뿐만 아니라 저비용으로 다수의 시료를 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있어 곰팡이독소의 정성 및 정량분석 등 다양한 연구에서 차지하는 비중이 날로 높아지고 있다.<sup>11)</sup> 그러나 ELISA는 현재 대부분의 연구에서 정량분석 보다는 주로 정성분석으로 이용되고 있고, ELISA에 의해 확인된 시료는 HPLC나 LC/MS 등의 기기분석을 이용하여 추가적으로 정량 및 재확인하는 과정이 요구되고 있다.<sup>16)</sup> 이러한 기기분석이나 면역분석법 등은 이플라톡신을 분석함에 있어 많은 장단점을 내포하고 있어 분석의 안정성과 효율성 등을 향상시키고, 이플라톡신 오염현황을 지속적으로 모니터링하기 위해서는 보다 상호보완적인 병행분석방법이 필요할 것으로 판단된다.

최근 기존 곰팡이독소 분석법의 문제점을 보완하기 위해 다양한 분석기술이 연구되고 있으나, 국내에서는 여전히 HPLC법으로 정량분석 후 다시 LC/MS/MS법으로 재확인하는 분석패턴을 고수하고 있다.<sup>17)</sup> 이 병행 분석방법 역시 HPLC법의 유도체화 과정 등과 같은 분석과정이나 추가적인 LC/MS/MS법의 재확인과정으로 인한 기술적, 시간적 및 경제적인 문제점 역시 존재한다. 그러나 ELISA법에 의한 정성분석에서 양성으로 선정된 시료를 바로 LC/MS/MS법으로 정량 및 재확인을 실시한다면 HPLC법의 유도체화 과정이 생략되어 보다 안정적이고 효율적인 분석이 가능할 것이고, 시료 전처리과정이나 분석에 의해 소비되는 많은 시간이나 유기용매 등이 절약되는 등 기존의 분석법이 가진 많은 단점을 보완할 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 국내 유통 중인 다양한 식품시료를 대상으로 ELISA법으로 이플라톡신 B<sub>1</sub>을 신속히 검색한 다음, 확인된 양성시료를 LC/MS/MS법으로 정량 및 재확인하는 병행분석방법을 적용하여 이플라톡신의 오염현황을 조사하여 기초정보를 제공하고자 하였다.

## II. 연구방법

### 1. 재료 및 분석장비

실험에 사용된 이플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 및 M<sub>1</sub> 표준물질을 비롯한 hydrogen peroxide, 2,2-azino(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile과 methanol은 HPLC grade(Merck Co.,

Damstadt, Germany)를 사용하였으며, 아플라톡신에 특이적인 항체가 결합된 아플라톡신 정제용 컬럼인 Immunoaffinity column(IAC)은 AflaTest(Vicam, Co., Watertown, MA, USA)를 이용하였다. 본 연구에 사용된 아플라톡신 B<sub>1</sub> 단클론성 항체는 본 연구실에서 생산되어 Kolosova 등<sup>18)</sup>의 연구에 사용된 것을 이용하였고, 아플라톡신 B<sub>2</sub>(20%), G<sub>1</sub>(74%) 및 G<sub>2</sub>(14%)를 제외한 다른 곰팡이독소와는 교차반응성이 없어 본 실험의 목적에 적합한 항체로 판단되었으며, 아플라톡신 B<sub>1</sub>-horseradish peroxidase conjugate(HRP)는 본 연구실에서 Shim 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 합성하여 사용하였다. ELISA reader는 Bio-Rad사의 model 550(Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하였고, LC/MS/MS는 Applied Biosystems사의 MDS SCIEX 3200 Q TRAP<sup>®</sup> 기기를 이용하여 분석하였으며, 모든 data는 MPM software(ELISA)와 Analyst 1.4.2 software(LC/MS/MS)를 사용하여 처리하였다.

## 2. 시료수집 및 시료 전처리

국내 유통 중인 곡류, 견과류 및 그 가공품 등의 식품을 대상으로 아플라톡신에 대한 오염현황을 조사하기 위해 인구수와 지리적 위치를 고려하여 서울, 대전, 대구, 부산, 광주 및 진주 등 전국 6개 지역을 중심으로 각 지역 재래시장 및 대형할인매장 등에서 시료를 수집하였다. 곡류는 백미, 현미, 옥수수, 밀가루, 보리, 맥아 등 6품목에 대해 186점, 견과류는 땅콩, 피스타치오, 아몬드, 호두 등 4품목에 대하여 96점, 두류 및 두류 가공품인 대두와 된장, 기타시료인 고춧가루와 고추장은 각각에 48점씩을 구입하여 총 378점의 시료를 대상으로 아플라톡신의 오염현황을 조사하였다. 구입된 모든 시료는 균질화하여 -20°C의 냉동상태로 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

## 3. ELISA에 의한 정성분석

시료의 전처리를 위하여 균질화된 시료 5 g을 취한 후 1 g의 NaCl과 25 ml의 60% MeOH로 혼합하여 20분 동안 강하게 교반하면서 추출하였으며, 4°C, 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 모두 여과지로(Whatman No.1, England) 추출한 후, 인산염 용액(phosphate buffer saline; PBS, pH 7.4)으로 희석하였으며, 희석액은 지체 없이 바로 ELISA분석에 사용하였다. 시료 속의 matrix effect를 최소화하기 위해 인산염 용액을 이용한 희석방법을 사용하였으며, 예비실험에서 확인된 시료별 최적희석배수로는 백미, 현미, 옥수수, 밀가루, 된장 및 고추장 등 11종 시료는 15배,

보리, 땅콩, 피스타치오, 아몬드 및 호두 등 5종의 시료는 20배로 확인되었다.

시료 속 아플라톡신 B<sub>1</sub>을 분석하기 위해 확립된 ELISA 분석법은 Kolosova 등,<sup>18)</sup> Shim 등<sup>19,20)</sup> 및 AOAC<sup>21)</sup>법을 일부 수정하거나 그대로 적용하였으며, 다음과 같이 정성분석을 실시하였다. 간단히 설명하면, anti-mouse IgG(100 ng/100 µl)를 96 microtitre well에 분주하여 하룻밤 반응 시킨 후, 아플라톡신 B<sub>1</sub> 단클론성 항체를 PBS로 1200배 희석하여 96 microtitre well에 100 µl씩 분주한 다음, 37°C에서 90분 동안 반응시켰다. 반응시킨 well은 PBS-0.05% Tween 20(PBST) 용액으로 3회 세척 후 50 ml의 아플라톡신 B<sub>1</sub> 표준물질 또는 시료 추출액과 동량의 아플라톡신 B<sub>1</sub>-HRP conjugate를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 경쟁반응을 시켰다. 경쟁반응이 끝난 well은 PBST 용액으로 6회 세척하여 기질용액인 ABTS(100 µl/well)를 well에 첨가하고, 30분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한, 본 연구에 사용된 ELISA법에 대한 검증의 일환으로 아플라톡신이 오염되어 있지 않은 백미, 현미, 옥수수, 밀가루, 보리, 맥아, 땅콩, 피스타치오, 아몬드, 호두, 대두, 된장, 고춧가루 및 고추장 등 14종 시료를 대상으로 아플라톡신 B<sub>1</sub>의 최종농도가 0.5 및 1.0 ng/g 이 되도록 임의로 오염시킨 후 앞서 설명한 전처리과정을 거쳐 ELISA법으로 검출율을 확인하였다.

## 4. LC/MS/MS에 의한 정량분석 및 재확인

ELISA법에서 양성으로 확인된 시료를 대상으로 LC/MS/MS법을 이용하여 총 아플라톡신(아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub>)을 분석하기 위해 IAC가 적용된 다음과 같은 방법으로 수행하였다.<sup>22,24)</sup> 먼저 각 시료 5 g을 칭량하여 70% methanol 25 ml를 첨가하고 1시간 동안 shaking한 후 4°C, 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 시켰다. 상등액은 여과지(Whatman No. 4, England)로 여과하고, 여과액 10 ml를 3차 증류수 40 ml와 혼합한 후 0.45 µm cellular syringe filter로 재 여과하였으며, 여과액 중 15 ml를 IAC로 정제하였다. 즉, 여과액 15 ml를 IAC에 분주하여 모든 여과액이 IAC를 통과하면 3차 증류수 10 ml로 세척하였고, 남아있던 증류수를 모두 제거한 다음 HPLC급 methanol 1.25 ml로 아플라톡신을 용출시켜 3차 증류수로 5 ml 정용한 후, Table 1과 같은 LC/MS/MS 조건으로 분석을 실시하였다. 즉, 아플라톡신을 분석하기 위해 아플라톡신 M<sub>1</sub>(10 ng/g)을 내부표준물질로 사용하였고, water : acetonitrile : methanol(6:2:3, v/v/v)을 이동상용매로 Agilent ZORBAX

**Table 1.** LC/MS/MS conditions for the quantification and confirmation

Instrument	Parameter	Conditions
LC (Agilent 1200 series, Agilent Technolog.)	Column	Agilent ZORBAX SB-Aq C <sub>18</sub> column (Agilent, 4.6×150 mm, 5 μ particle size)
	Mobile phase	Water : Acetonitrile : Methanol = 6 : 2 : 3 (v/v/v)
	Flow rate	1 ml/min
	Injection vol.	20 μl
	Elution seq.	Aflatoxin M <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>1</sub>
MS (MDS SCIEX 3200 Q TRAP®, Applied Biosystems)	Curtain gas	20 Mpsi
	Nebulizer current	5
	Interface heater	On
	Vaporizer temp.	450°C
	Ion source GS1, GS2	60, 50 Mpsi
	Ion source	Atmospheric pressure chemical ionization(APCI, heated nebulizer) positive(+)
	Mass spectra range	100~500 m/z
MPN (Multiple Reaction Monitoring)	Standard	Q1 Mass (amu)    Q3 Mass (amu)    EP <sup>a)</sup> (V)    DP <sup>b)</sup> (V)    CE <sup>c)</sup> (V)    CXP <sup>d)</sup> (V)
	Aflatoxin B <sub>1</sub>	313.1    285.2    9    61    33    10
	Aflatoxin B <sub>2</sub>	315.5    259.2    4    46    45    16
	Aflatoxin G <sub>1</sub>	329.1    243.1    6    51    37    14
	Aflatoxin G <sub>2</sub>	331.1    313.3    8.5    61    35    12
	Aflatoxin M <sub>1</sub>	329.1    273.3    12    41    31    16

<sup>a)</sup>EP: entrance potential, <sup>b)</sup>DP: declustering potential, <sup>c)</sup>CE: collision energy, <sup>d)</sup>CXP: collision cell exit potential.

SB-Aq C<sub>18</sub> column(Agilent, 4.6×150 mm, 5 μm particle size)을 이용하여 아플라톡신 M<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 및 B<sub>1</sub> 순으로 분리시켰으며, 각 시료당 20 μl를 주입하여 분석하였다. 또한 ion source는 atmospheric pressure chemical ionization(APCI, heated nebulizer) positive 방식을 이용하였고, 최적의 분석을 위해 curtain gas 15 Mpsi, nebulizer current 5, interface heater: on, vaporizer temperature 450°C 등의 조건을 유지하였으며, 아플라톡신은 multiple reaction monitoring(MPN)으로 검출하였다.

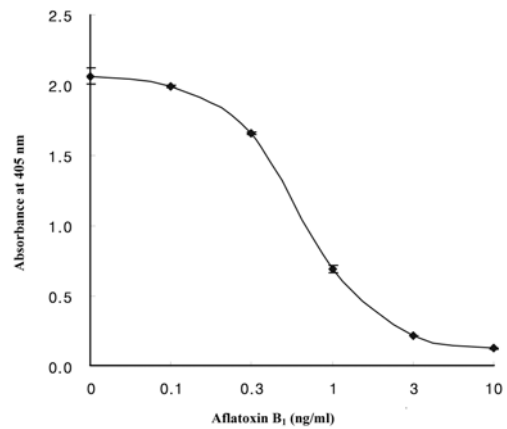
또한, 확립된 LC/MS/MS법의 검증을 위해 아플라톡신이 검출되지 않은 시료 중 땅콩, 호두 및 보리를 대상으로 아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 및 M<sub>1</sub>(내부표준물질)을 시료에 최종농도가 10 ng/g이 되도록 각각 임의로 오염시켜 IAC를 이용한 전처리과정을 거친 후 LC/MS/MS법으로 회수율을 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 분석법 검증

##### 1) ELISA

본 연구에 사용된 ELISA법을 검증하기 위해 먼저 아플라톡신이 오염되어 있지 않은 백미, 보리 등 14종 시료를 대상으로 아플라톡신 B<sub>1</sub> 표준용액을 시료에 최



**Fig. 1.** Standard curve for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub> by ELISA.

종농도 0.5 및 1.0 ng/g이 되도록 첨가하여 ELISA법의 검출율을 측정하였다. 확립된 ELISA의 표준곡선은 Fig. 1과 같았고, 검출한계(limit of detection, LOD)는 0.01 ng/g인 것으로 확인되어 확립된 ELISA법이 아플라톡신 B<sub>1</sub>을 검색하기에 적합한 것으로 판단되었다. 이를 이용하여 각 시료의 검출율을 측정된 결과, 농도별로 각각 71.8~116.1%와 76.9~119.2%의 수준으로 확인되었다. 이상으로 ELISA를 이용하여 임의로 오염시킨 시료와 오염시키지 않은 시료를 분석한 결과,

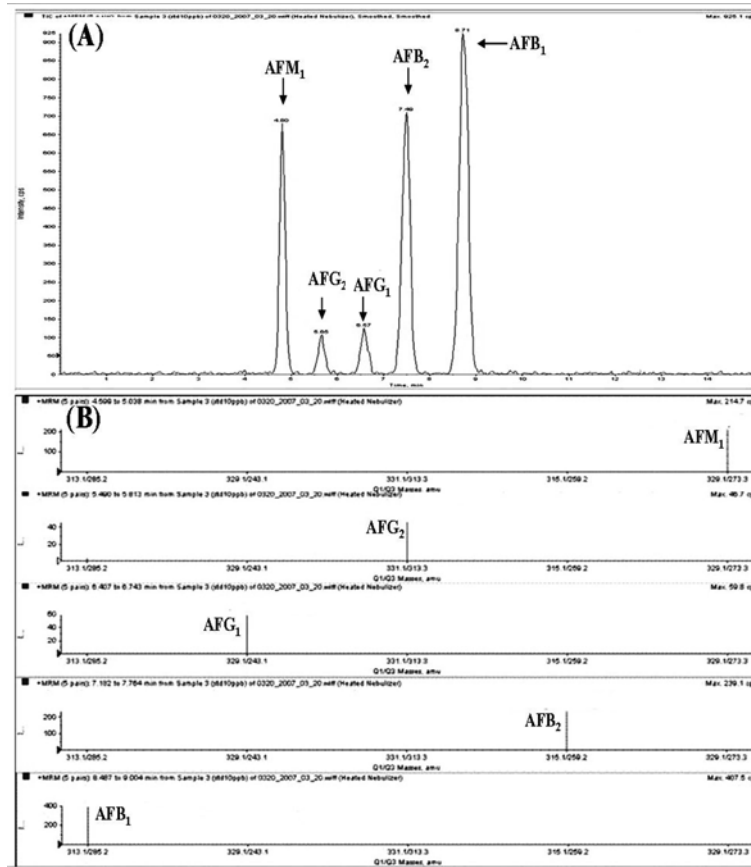


Fig. 2. LC/MS/MS results of standard aflatoxins(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and M<sub>1</sub>); LC chromatogram (A), LC/MS/MS spectrum (B).

ELISA 결과에서는 위음성 결과를 찾아 볼 수 없었으므로 시료의 정성분석에 적합한 것으로 판단된다.

## 2) LC/MS/MS

LC/MS/MS법의 경우, 아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 및 M<sub>1</sub> 혼합표준물질에 대한 LC/MS/MS의 크로마토그램과 스펙트럼은 Fig. 2와 같았으며, 검량선에서 상관계수 (R<sup>2</sup>)는 아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub> 모두 0.9999로 검출되어 양호한 직선성을 보였다. 앞서, ELISA에서와 동일한 방법으로 아플라톡신이 오염되어 있지 않은 시료에 아플라톡신을 임의로 오염시켜 LC/MS/MS에 대한 총 아플라톡신의 회수를 측정 결과, 아플라톡신 B<sub>1</sub>은 72.3~98.2%, B<sub>2</sub>는 93.5~104.3%, G<sub>1</sub>은 70.8~108.5%, 그리고 G<sub>2</sub>는 84.9~135.3%로 비교적 양호한 회수율을 보였다. 이러한 결과를 Chan 등<sup>25)</sup>과 Jang 등<sup>26)</sup>의 73~101%와 64~101%의 결과와 비교해 볼 때, 본 연구의 분석법은 비교적 안정적인 것으로 판단되었

다. 한편 본 연구에서는 아플라톡신 G<sub>2</sub>의 회수율이 84.9~135.3%로 다른 아플라톡신 이성체들에 비해 상대적으로 높은 수준으로 나타난 반면, Jang 등<sup>26)</sup>과 Oh 등<sup>27)</sup>의 연구에서는 각각 64.2~92.2%와 62.2~89.9%로 비교적 낮은 경향을 나타내었다. 그 원인은 시료 전처리에 사용한 IAC에 흡착되어 있는 antibody의 친화력 차이에 기인하는 것으로 추정된다. 추가적으로 아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub>의 검출한계는 최소검출량 (Signal : Noise(S/N) = 1 : 3)을 구하는 방법을 적용하여 아플라톡신 B<sub>1</sub>은 0.4 ng/ml, B<sub>2</sub>는 0.3 ng/ml, G<sub>1</sub>은 0.1 ng/ml, 그리고 G<sub>2</sub>는 0.1 ng/ml로 나타났다.

## 2. ELISA에 의한 aflatoxin B<sub>1</sub> 정성분석

수집된 14종 378점의 식품 시료를 대상으로 ELISA 법으로 1차 검색을 실시한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 백미, 현미 등의 곡류를 제외한 땅콩, 피스타치오, 아몬드, 호두 등의 견과류에서 20점, 고춧가루와

**Table 2.** Results of aflatoxin B<sub>1</sub> analysis in various foods by ELISA

Classification	No. of examined samples	No. of positive/negative samples	Ratio(%) of positive samples
<b>Grain</b>			
Rice	60	0 / 60	0
Barley	24	0 / 24	0
Brown rice	24	0 / 24	0
Corn	30	0 / 30	0
Wheat flour	24	0 / 24	0
Malt	24	0 / 24	0
<b>Nuts</b>			
Peanut	24	11 / 24	45.8
Pistachio	24	2 / 24	8.3
Almond	24	1 / 24	4.2
Walnut	24	6 / 24	25
<b>Soybean and fermented soybean food</b>			
Soybean	24	0 / 24	0
Soybean paste	24	0 / 24	0
<b>Pepper and fermented pepper food</b>			
Pepper powder	24	1 / 24	4.2
Pepper paste	24	1 / 24	4.2
Total	378	22 / 378	5.8

고추장에서 각각 1점씩, 총 22점의 시료가 양성시료로 확인되었으며, 전체 시료 중 약 5.8%가 아플라톡신 B<sub>1</sub>에 오염되어 있는 것으로 확인되었다. 특히, 견과류는 검색된 전체 양성시료 중 약 91.6%로 시료의 대부분을 차지하고 있었으며, 땅콩(45.8%), 호두(25%), 피스타치

오(8.3%), 아몬드(4.2%)순으로 검출비율이 높은 것으로 확인되었다. Chun 등<sup>15)</sup>의 연구에서도 땅콩, 호두 등과 같은 견과류 총 85점 시료를 ELISA법으로 검색한 결과 총 31점(36.5%)이 양성시료로 확인되었으며, Aydın 등<sup>28)</sup>은 고춧가루 100점 중에서 68점(68%)이 아플라톡신에 오염되어 있는 것으로 보고하였다. 이상의 ELISA법에서 아플라톡신 B<sub>1</sub> 양성으로 확인된 22점의 시료는 LC/MS/MS법으로 정량 및 재확인하는 실험을 수행하였다.

### 3. LC/MS/MS의 정량 및 재확인

수집된 곡류, 견과류 등 378점의 시료 중 ELISA법에서 양성시료로 검색된 22점에 대해 LC/MS/MS법을 적용하여 총 아플라톡신의 오염수준을 분석하였다. 그 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 총 22점의 시료 중 땅콩(2), 피스타치오(1) 및 고춧가루(1)에서 총 4점이 아플라톡신에 오염되어 있는 것으로 확인되어 전체 시료 중 1.1%의 오염율이 확인되었다. 특히 4점의 시료에서 아플라톡신 B<sub>1</sub>과 B<sub>2</sub>만이 각각 1.02~48.42 ng/g과 4.37~5.01 ng/g 수준으로 검출되었으며, 총 아플라톡신으로서도 약 1.02~52.79 ng/g 수준으로 검출되었다. 식품유형별로는 곡류, 콩류 및 그 가공품에서는 아플라톡신이 검출되진 않았지만, 고춧가루에서는 48점 중 1점(2.1%), 견과류인 땅콩과 피스타치오는 24점씩 중 각각 2점(8.3%)과 1점(4.2%)에서 아플라톡신이 검출되어 견과류에서 검출빈도가 가장 높은 것으로 확인되었다. 특히 견과류의 경우, 검출된 오염수준이 국내·외의 기준·규격(한국:아플라톡신 B<sub>1</sub>-10 µg/kg, CODEX:총 아플라톡신-15 µg/kg, EU:총 아플라톡신-4 µg/kg 및 미국:총 아플라톡신-20 µg/kg)<sup>29)</sup>을 초과하는 것으로 나타나

**Table 3.** Quantification and confirmation of aflatoxins using LC/MS/MS for presumptive positive samples by ELISA

Classification	Incidence (No.)	Range of total aflatoxins levels (ng/g)				
		AFs <sup>a)</sup>	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
<b>Nuts</b>						
Peanut	2/11	1.81, 32.16	1.81, 27.15	5.01	ND	ND
Pistachio	1/2	52.79	48.42	4.37	ND	ND
Almond	0/1	ND <sup>b)</sup>	ND	ND	ND	ND
Walnut	0/6	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Pepper and fermented pepper foods</b>						
Pepper powder	1/1	1.02	1.02	ND	ND	ND
Pepper paste	0/1	ND	ND	ND	ND	ND
Total	4/22	1.02-52.79	1.02-48.42	4.37-5.01	ND	ND

<sup>a)</sup>AFs: total aflatoxin was represented by summation of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> levels.

<sup>b)</sup>ND: not detected.

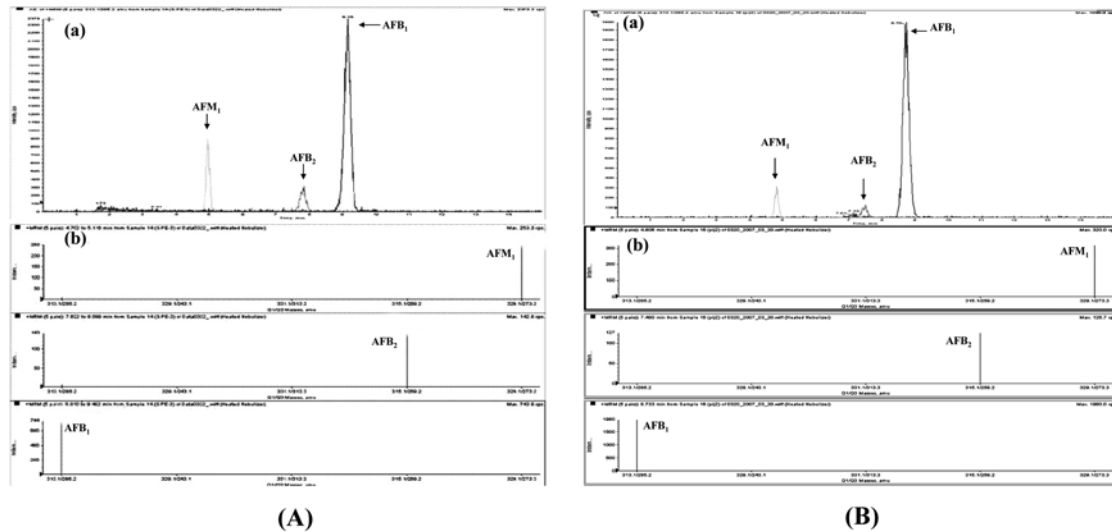


Fig. 3. LCMS/MS results of positive peanut (A) and pistachio (B) sample; LC chromatogram (a), LC/MS/MS spectrum (b).

보다 철저한 관리가 필요한 것으로 생각된다(Fig. 3).

Jang 등<sup>21)</sup>의 연구에서는 총 393점의 시료 중 견과류 및 그 가공품 37점(9.4%)에서 최대 5.51  $\mu\text{g}/\text{kg}$  수준으로 아플라톡신에 오염된 것으로 보고하였고, Park 등<sup>30)</sup>은 견과류 및 그 가공식품 79점 중 34점(43.0%)에서 아플라톡신이 검출되어 다른 식품유형보다는 검출빈도가 가장 높은 것으로 보고하였다. 또한 Chun 등<sup>17)</sup>은 견과류 85점 중 9점(10.6%)에서 총 아플라톡신이 검출되었고, 특히 볶음 땅콩은 2.0~28.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 비교적 높은 수준으로 검출된 것으로 보고하였다. 그리고 소비자보호원<sup>31)</sup>은 포장 및 비포장 견과류를 대상으로 견과류 내 곰팡이독소 모니터링을 실시하여 베트남산 볶음 땅콩 1점에서 83  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 허용기준치 이상의 아플라톡신 B<sub>1</sub>이 검출되었고, 그 판정결과 원산지에서 오염된 것으로 확인되어 수입과정에서 보다 세심한 검사 및 관리가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 한편, 고춧가루는 총 96점 중 고춧가루 1점(1.0%)에서 1.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  수준으로 검출되어 견과류와는 달리 국내·외의 허용기준을 초과하지 않는 것으로 확인되었다. 하지만 Choi 등<sup>32)</sup>의 연구에 의하면 고춧가루 12점을 대상으로 곰팡이를 분리·동정할 결과, 아플라톡신을 생성하는 *A. flavus*의 분리수준이 높은 것으로 보고된 것으로 보아 고춧가루 역시 곰팡이 및 독소의 생육 및 생성방지를 위해 적절한 건조 및 저장과정 등 다각적인 노력이 선행되어야 할 것으로 판단된다. 한편, 곡류, 콩 및 그 가공품에 대하여 본 연구의 모든 시료에서는 아플라톡신이 검출되지 않았지만, 많은 문헌을 통해 오염사례가

지속적으로 보고되고 있기 때문에 더욱 철저한 관리가 필요하다. 또한, 본 연구에서 아플라톡신의 검출빈도는 378점의 전체 시료 중 4점만이 검출되어 약 1.1%의 낮은 경향을 나타내었고, 검출수준은 소수의 품목에 대해 다소 높은 수준으로 검출되었지만, 전체적으로 국내 유통 중인 식품 등에 대한 아플라톡신의 오염 정도는 낮은 것으로 확인되었다. 그러나 우리나라의 국민 대부분이 곡류나 곡류 가공품을 주식으로 하기 때문에 검출빈도와 오염수준이 비교적 낮은 수준이라 하더라도 아플라톡신은 만성독성의 위험이 크기 때문에 사전에 방적 관리를 위한 다각적인 노력이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

#### 4. ELISA-LC/MS/MS system 제시

식품이나 사료 등에 아플라톡신과 같은 곰팡이독소의 오염현황을 모니터링 하기 위해서는 많은 양의 시료를 대상으로 HPLC와 LC/MS/MS 등의 기기분석법을 이용하여 정량분석이나 재확인하는 것이 일반적인 분석 방법이다. 하지만 본 연구에서와 같이 수집된 시료가 많을 경우, HPLC법이나 LC/MS/MS법으로 분석을 하면 많은 시간과 노력이 소비되고, 정제용 킬럼인 IAC의 비용이 증가할 뿐만 아니라 아플라톡신, 푸모닌신 및 T-2 등과 같이 유도체화 과정이 필요한 물질에 대해서는 시료 분석과정에 있어 난점을 더욱 심화시키고, 분석오차를 크게 하는 요인이 되고 있어 비효율적 면이 존재한다고 판단된다. 따라서 시료 수가 약 20~30여 개 미만으로 적은 경우에는 IAC로 정제과정

후 LC/MS/MS법으로 정량분석 및 재확인하는 것이 합리적인 반면, 시료수가 많을 경우는 먼저 ELISA법의 정성분석으로 아플라톡신 양성시료를 검색하고, 확인된 양성시료만을 선택적으로 IAC의 정제과정을 거쳐 LC/MS/MS법으로 정량분석 및 재확인하는 것이 매우 효율적이라고 생각된다. 실제 본 연구에서는 수집된 378점의 많은 시료를 먼저 ELISA법으로 분석한 결과, 22점이 양성시료로 나타나 LC/MS/MS로 분석할 시료 수가 전체의 약 5.8%로 감소하여 보다 효율적인 분석이 가능하였다. 그러므로 본 연구에 적용된 ELISA-LC/MS/MS 병행시스템을 적용한다면 기존의 분석법이 가진 어려움을 보완하고, 경제성과 효율성이 보다 향상될 것으로 판단된다.

#### IV. 결 론

본 연구에서는 국내 유통 중인 곡류, 견과류, 두류와 두류 가공품 및 고춧가루와 고춧가공품 등 총 14품목 378점의 시료를 대상으로 보다 효율적인 아플라톡신 분석을 위해 ELISA-LC/MS/MS 병행시스템을 적용하여 아플라톡신의 오염현황을 분석하였다. 그 결과, ELISA법의 1차 정성분석에서 총 378점의 시료 중 땅콩, 피스타치오 및 호두 등의 견과류, 고춧가루 및 고추장에서 총 22점이 양성시료로 검색되었다. 이렇게 검색된 22점(5.8%)의 양성시료들을 LC/MS/MS법으로 정량 및 재확인한 결과, 땅콩 2점, 피스타치오 및 고춧가루에서 각각 1점씩 총 4점의 시료에서 총 아플라톡신이 약 1.02~52.79 ng/g 수준으로 검출되어 전체 시료에 대해 약 1.1%의 오염율을 나타내었다. 총 아플라톡신 오염 시료 4점중 땅콩과 피스타치오 각 1점씩은 그 오염수준이 허용기준을 초과한 것으로 분석되어 보다 철저한 관리와 예방이 필요한 것으로 생각되었다. 따라서 유통 중인 식품에 대한 아플라톡신의 안전성을 확보하기 위해서는 아플라톡신 B<sub>1</sub>을 대상으로 한 제한적인 범위보다 아플라톡신 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub>를 모두 고려한 모니터링 연구를 비롯하여 전국규모, 계절별·보관조건별 오염현황 및 안전성 검토 등 다양한 연구가 더욱 활발히 이루어져야 할 것이다. 또한 최근 식품 속 아플라톡신을 분석하기 위해 HPLC나 LC/MS/MS 등이 이용되고 있지만 HPLC로 분석하기 위해서는 전처리과정 중 유도체화 과정이 필요하므로 많은 양의 시료를 분석할 경우 분석과정뿐만 아니라 시간적, 경제적인 면에서 문제점에 직면할 수 있어 ELISA-LC/MS/MS 병행시스템을 이용한다면 식품 중 오염된 각종 곰팡이독소를 보다 효율적으로 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2006년 부산지방식품의약품안전청에서 시행한 유해물질 인체 영향 연구 사업(06172위해성465)에 의해 이루어졌으며, 김경열과 송정언은 교육과학기술부 BK21프로그램의 장학금을 수혜받았음.

#### 참고문헌

1. Taber, H. H., Schroeder, H. W. : Aflatoxin producing potential of isolates of the *Aspergillus flavus-oryzae* group from peanuts(*Arachis hypogaea*). *Journal of Applied Microbiology*, **15**, 140-144, 1967.
2. Sweeney, M. J., Alan, D. W. : Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 141-158, 1998.
3. Kim, J. G. : Occurrence of aflatoxins in rice and rice products and by products of rice: A review. *Korean Journal of Environment Health*, **32**(5), 515-521, 2006.
4. International Agency for Research on Cancer (IARC) : IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC, Lyon, France, 56, 1993.
5. Chiavaro, I., Cacchioli, C., Berni, E., Spotti, E. : Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in pig liver: Comparison with high-performance liquid chromatography determination. *Food Additives and Contaminants*, **22**(11), 1154-1161, 2005.
6. Lee, K. M., Kim, J. G. : The effects of lactic acid bacteria on the growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production of *Aspergillus parasiticus*. *Korean Journal of Environment Health*, **31**(2), 127-133, 2005.
7. Cho, S. Y., Kang, I. H., Shim, Y. H., Yang, D. H., Oh, S. W., Lee, B. H., Hyeon, S. Y., Chang, S. Y., Jeong, C. S., Lee, Y. S., Kim, Y. S., Kang, S. J. : Contamination and detoxification of aflatoxins. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **38**(3), 205-216, 2007.
8. Ministry of Health & Welfare : Report on 1998 Korean national nutrition survey. 2000.
9. Shim, W. B. : Production of specific monoclonal antibody to aflatoxin B<sub>1</sub> and its application to development of simultaneous immuno-detection techniques for mycotoxins. A thesis for the degree of doctor of science, Graduate Gyeong Sang National University, 2006.
10. Kim, J. K. : Determination of aflatoxin using high performance liquid chromatography with optimized fluorescence detection. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **13**, 41-46, 1998.
11. Schatzki, T. F., Haddon, W. F. : Rapid, non-destructive selection of peanuts for high aflatoxin content by soaking and tandem ass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3062-3069, 2002.



12. Thean, J. E. : Extraction, clean up and quantitative determination of aflatoxin in corn. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, **63**(3), 631-633, 1980.
13. Hwang, J. H., Jeon, H. S., Lee, G. G. : Review ; Aflatoxins in foods -analytical methods and reduction of toxicity by physicochemical processes. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **47**(1), 1-16, 2004.
14. Papadopoulou-Bonuraoui, A., Stroka, J., Anklam, E. : Comparison of two post-column derivatization systems, ultraviolet irradiation and electrochemical determination, for the liquid chromatographic determination of aflatoxins in food. *Journal of AOAC International*, **85**(2), 411-416, 2002.
15. Kim, J. G., Kang, H. Y., Min, K. J. : Determination of aflatoxins using high-performance liquid chromatography and fluorescence or UV absorbance detection. *Korean Journal of Environment Health Society*, **22**(1), 36-44, 1996.
16. Nilufer, D., Boyacioglu, D. : Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3375-3379, 2002.
17. Chun, H. S., Kim, H. J., Ok, H. E., Hwang, J. B., Chung, D. H. : Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, **120**, 385-391, 2007.
18. Kolosova, A. Y., Shim, W. B., Yang, Z. Y., Eremin, S. A., Chung, D. H. : Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **384**, 286-294, 2006.
19. Shim, W. B., Kim, J. S., Kim, J. Y., Choi, J. G., Je, J. H., Kuzminz, N. S., Eremin, S. A., Chung, D. H. : Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in rice, barley, and feed by noninstrumental immunochromatographic strip-test and high sensitive ELISA. *Food Science and Biotechnology*, **17**(3), 623-630, 2008.
20. Shim, W. B., Yang, Z. Y., Kim, J. S., Kim, J. Y., Kang, S. J., Woo, G. J., Chung, Y. C., Eremin, S. A., Chung, D. H. : Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in grain and feed samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**(10), 1629-1637, 2007.
21. AOAC international, <http://www.aoac.org>, 2007.
22. IP, S. P., Che, C. T. : Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup improvement of recovery. *Journal of Chromatography A*, **1135**, 241-244, 2006.
23. Calleri, E., Marrubini, G., Brusotti, G., Massolini, G., Caccialanza, G. : Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **44**, 396-403, 2007.
24. Giray, B., Girgin, G., Engin, A. B., Aydin, S., Sahin, G. : Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, **18**, 23-29, 2007.
25. Chan, D., MacDonald, S. J., Boughtflower, V., Brereton, P. : Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detector. *Journal of Chromatography A*, **1059**, 13-16, 2004.
26. Jang, M. R., Lee, C. H., Cho, S. H., Park, J. S., Kwon, E. Y., Lee, E. J., Kim, S. H., Kim, D. B. : A survey of total aflatoxins in food using high performance liquid chromatography-fluorescence detector(HPLC-FLD) and liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC/MS/MS). *Korean Journal of Food Science and Technology*, **39**(5), 488-493, 2007.
27. Ok, K. S., Suh, J. H., Park, S. S., Sho, Y. S., Choi, W. J., An, Y. S., Lee, J. O., Woo, G. J. : Advanced in the analysis of total aflatoxin in food. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **21**, 76-81, 2006.
28. Aydin, A., Emin Erkan, M., Baskaya, R., Ciftcioglu, G. : Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> levels in powdered red pepper. *Food Control*, **18**, 1015-1018, 2007.
29. Van Egmond, H. P., Jonker, M. A. : Current situation on regulation for mycotoxins. In : Yoshizawa, T., Kumagai, S., Goto, T. (Eds.), *New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety*. Japanese Association of Mycotoxicology, Tokyo, Japan, 1-15, 2004.
30. Park, M. J., Yoon, M. H., Hong, H. G., Joe, T. S., Park, J. H., Ko, H. U. : A survey of the presence of aflatoxins in food. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **23**(2), 108-112, 2008.
31. Korea Consumer Agency : Monitoring of mycotoxins in nuts. 2006.
32. Choi, E. H., Kim, Y. B., Lee, S. R. : Isolation of microorganisms from red pepper powder and their radiosensitivity. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **9**(3), 205-210, 1977.