

분유 중 아플라톡신 M₁ 분석 및 위해평가

강영운 · 송정언 · 서정혁 · 박성국 · 김미혜*
식품의약품안전처 식품위해평가부 오염물질과

Analysis and Risk Assessment of Aflatoxin M₁ in Infant Formula

YoungWoon Kang, Jeong-Eon Song, Junghyuck Suh, Sung Kug Park, and Meehye Kim*

Food Contaminants Division, Food Safety Evaluation Department, Ministry of Food and Safety

Abstract To analyze aflatoxin M₁ (AFM₁), we dissolved infant formula in warm water and cleaned it by using an immunoaffinity column (IAC). The amount of AFM₁ was determined by high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. AFM₁ was detected in 281 of 439 samples. Thus, the detection rate of AFM₁ was 64.0%. The average concentration of AFM₁ in positive samples was 2.6 ng/kg (of prepared formula). The estimated daily intake (EDI) of AFM₁ through infant formula was 0.087-0.646 ng/kg body weight/day and the additional number of cases of liver cancer associated with exposure to AFM₁ would be 0.003-0.020 cancer cases/1,000,000. Because there is less than 1 cancer case/1,000,000 per year, the exposure to AFM₁ through infant formula in Korea is considered to be an unlikely human health concern.

Keywords: aflatoxin M₁, risk assessment, contamination, infant formula

서 론

아플라톡신은 여러 곰팡이독소 중에서 발암성이 가장 큰 것으로 알려져 있으며, 아플라톡신 동족체들 중 아플라톡신 B₁이 가장 큰 독성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 이 아플라톡신 B₁이 포유류 동물에 노출될 경우 체내에서 대사되어 노출된 아플라톡신 B₁ 농도의 약 0.3-6.2% 정도가 아플라톡신 M₁ 형태로 우유를 통하여 배출된다(1). 이와 같이 생성된 아플라톡신 M₁은 아플라톡신 B₁에 비하여 발암력이 1/10 이하로 평가되고 있으나(2), 아플라톡신 M₁으로 오염되는 우유제품은 매우 다양한 연령대에서 대량으로 소비되며, 특히 위해영향에 민감한 영유아들의 주요 식품이므로 아플라톡신 M₁의 엄격한 관리가 필요하다. 현재 세계적으로 우유에 대하여 원료로서 아플라톡신 M₁의 기준을 설정하여 관리하고 있으나, 우유를 원료로 하는 분유의 경우 현재 유럽연합 등 몇몇 나라에서만 세부적인 기준을 설정하여 관리하고 있다. 분유 및 조제분유는 우유를 농축한 분말을 원료로 사용하는데, 아플라톡신 M₁은 문자 구조적으로 열에 대해 안정적인 구조를 갖고 있어 농축과정에서 감소되거나 소멸되지 않고 농축될 가능성이 매우 높다. 따라서, 우리나라에서 소비되는 분유제품 중 아플라톡신 M₁의 위해성이 어느 정도인지 평가하는 것이 필요하다.

이와 같은 아플라톡신 M₁ 분석은 극성 유기용매로 추출하고 고상추출칼럼(SPE, solid phase extraction)이나 면역친화성칼럼

(immunoaffinity column)을 사용하여 불순물을 제거한 후 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분리하고 형광검출기나 질량분석기로 검출하는 시험법이 주로 사용되고 있다(2-5). 본 연구에서는 분유 중 아플라톡신 M₁ 시험법을 확립하고 이를 이용하여 오염실태조사를 수행하였다. 또한, 본 연구결과와 제품사용표시법상의 권장섭취량을 고려하여 인체노출량을 산출하였다.

재료 및 방법

대상시료

국내에 유통되고 있는 분유 및 조제분유 내의 아플라톡신 M₁ 오염현황을 파악하기 위해 조제분유(modified milk powder) 142 건, 성장기용 조제분유(modified milk powder for follow-up) 68건, 성장기용 조제식(follow-up formula) 96건, 영유아용 곡류조제식(cereal based food for infants and young children) 51건, 영유아용 특수조제식(special medical purpose for infants and young children) 17건, 영아용 조제식(infant formula) 6건, 기타 영유아식(other foods for infants and young children) 59건을 유통기한이 다른 제품으로 총 439건 수집하여 아플라톡신 M₁을 분석하였다.

시약 및 기구

아플라톡신 M₁ 표준물질 10 µg/mL (Supelco, Bellefonte, PA, USA; purity 99%)을 구입하여 HPLC grade용 acetonitrile을 이용하여 1 µg/mL 농도로 제조하여 냉장보관하면서 stock solution으로 사용하였다. 이 표준원액을 acetonitrile으로 희석하여 사용하였다. 본 연구에서는 acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), methanol (Merck)을 사용하였고, 정제를 위한 면역친화성칼럼(immunoaffinity column)은 AflaM₁Test (Vicam, Milford, DE, USA)을 사용하였다. 또한, 시험법 검증을 위해 인증표준물질(CRM, certified reference material)인 분유제품(ERM-BD283, Munich,

*Corresponding author: Meehye Kim, Food Contaminants Division, Food Safety Evaluation Department, Ministry of Food and Safety, Cheongwon, Chungbuk 363-951, Korea

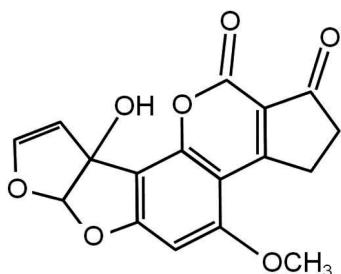
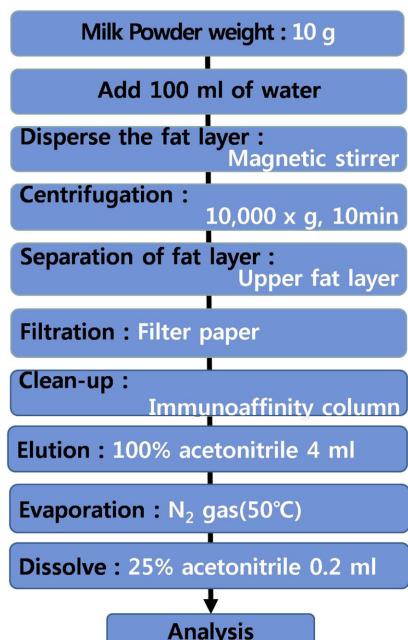
Tel: 82-43-719-4251

Fax: 82-43-719-4250

E-mail: meehkim@korea.kr

Received May 31, 2012; revised January 25, 2013;

accepted March 7, 2013

**Fig. 1. Chemical structure of aflatoxin M₁.****Fig. 2. Procedure for detection of aflatoxin M₁ of powdered milk.**

Germany)을 사용하였다.

시험용액의 조제

시료 10g를 침강하여 40°C의 온수 100mL를 첨가하여 10분 동안 마그네틱비를 이용하여 균질화 하였다. 균질화 후 4°C, 10,000×g에서 10분간 원심분리후 상층의 지방층을 제거하기 위해 Whatman No. 4 (WhatmanTM Maidstone, Kent, UK)로 여과하고, 여과액 50mL를 아플라톡신 M₁에 특이한 항체를 갖고 있는 면역친화성 칼럼(IAC)인 AflaM₁TestTM을 이용하여 초당 한 방울씩 자유낙하시키면서 정제하였다. 여과액이 완전히 빠지면 증류수 20mL를 가하여 세척하고, acetonitrile 4mL를 주입하여 아플라톡신 M₁을 용출시켰다. 정제시료를 50°C에서 질소농축후 이동상용매(25% acetonitrile) 200μL로 용해시킨 것을 시험용액으로 하였다(Fig. 2).

기기분석

아플라톡신을 정량분석하기 위해 Ultimate 3000 HPLC system (DIONEX, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였고, Chromeleon 프로그램으로 데이터 처리를 하였다. 아플라톡신 M₁의 분리를 위해 C₁₈ 칼럼(SIT, Kyoto, Japan; 4.6×250 mm, 5 μm)을 이용하였으며, 이동상용매는 acetonitrile : water을 25:75 (v/v)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 그리고 표준물질 및 시료 주입은 50 μL씩 주입하고, 유속은 1 mL/min으로 설정하여 분석하였다. 또한 아플라톡신 M₁

Table 1. HPLC conditions for analysis of aflatoxin M₁

Parameters	Conditions
Instrument	DIONEX Ultimate 3000 HPLC system
Detector	DIONEX RF 2000 fluorescence detector
Column	SP [^] column C ₁₈ 5 μm (4.6×250 mm ID)
Mobile phase	Acetonitrile : Water = 25:75 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temp.	35°C
Injection vol.	50 μL
Excitation wavelength	365 nm
Emission wavelength	435 nm

Table 2. Operation conditions of LC/MS/MS for aflatoxin M₁ analysis

Parameter	Conditions
Column	SP column C ₁₈ 5 μm (2.0×150 mm ID)
Mobile phase (gradient)	A: 2M ammonium formate in water B: 2M ammonium formate in 95% acetonitrile
Flow rate	0.3 mL/min
Injection vol.	10 μL
Ionization	ESI positive
Source temp.	330°C
Sheath/Auxiliary gas pressure	40/20 psi
Q1/Q3	329/259, 329/273
Collision energy	10 V
Tube lens offset	90 V
Ionization mode	SRM (Selected Reaction Monitoring)

검출을 위해 형광검출기(형광파장 365 nm, 여기파장 435 nm)로 분석하였다(Table 1). 검출된 시료는 질량분석기(LC/MS/MS)로 Table 2와 같은 조건으로 분석하여 아플라톡신 M₁의 여부를 재확인 하였다.

시험법 유효성 검증

시험법 검증을 위해 조제분유에 아플라톡신 M₁을 0.0125, 0.025, 0.05 μg/의 농도로 첨가시켜 시험용액 조제방법에 따라 처리하고 HPLC로 분석하여 회수율을 측정하였다. 또한, 동일한 방법으로 인증표준물질 분유제품(ERM-BD283, 111±18 ng/kg)을 이용하여 정확성을 확인하였다. 그리고, 분유에 저농도의 아플라톡신 M₁을 첨가하고 전처리하여 신호대잡음비(signal to noise)가 3인 검출한계(LOD, limit of detection)와 10인 정량한계(LOQ, limit of quantitation)를 구하였다.

안전성 평가

인체노출량 산출을 위해 본 연구결과의 모니터링 자료와 제품 사용표시법 상의 권장섭취량을 고려하여 연령별 식품섭취량을 적용하였으며, 영유아의 연령별 평균 체중은 2007년에 대한소아과학회에서 발표한 한국 소아성장 표준치를 활용하였다. 연령별 1일 추정섭취량(EDI, estimated daily intake)은 다음과 같은식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{연령별 1일 추정섭취량 (ng/kg bw/day)} \\ = \frac{\text{평균 오염도(ng/kg)} \times \text{연령별 식품섭취량(g/day)}}{\text{연령별 체중(kg bw)}}$$

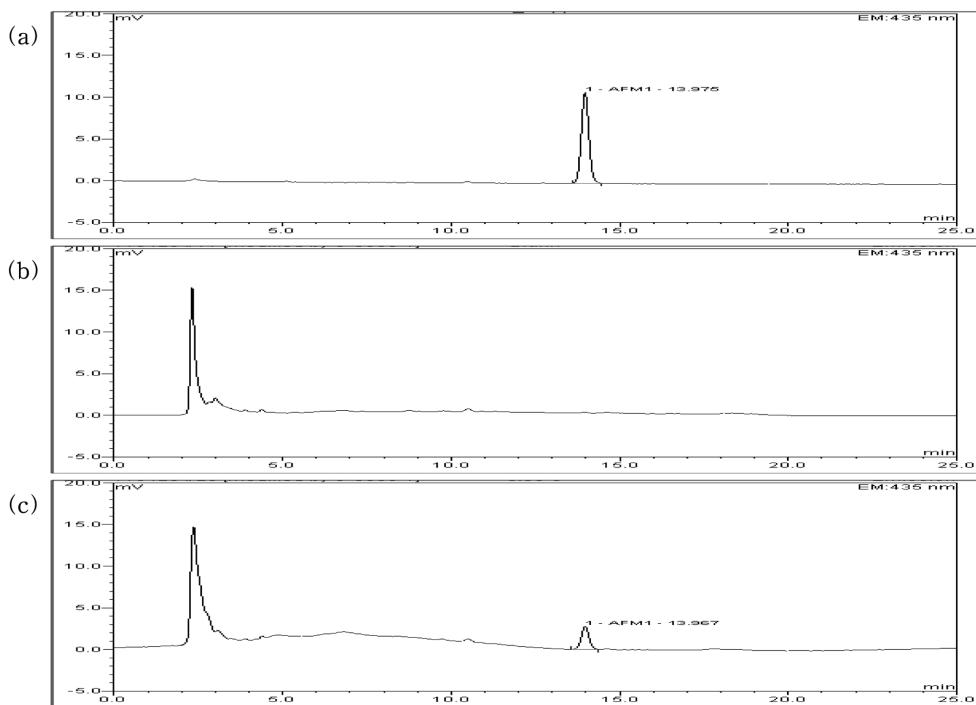


Fig. 3. Chromatograms of (a) aflatoxin M₁ standard (5.0 µg/kg), (b) control and (c) spiked powdered milk (0.05 µg/kg).

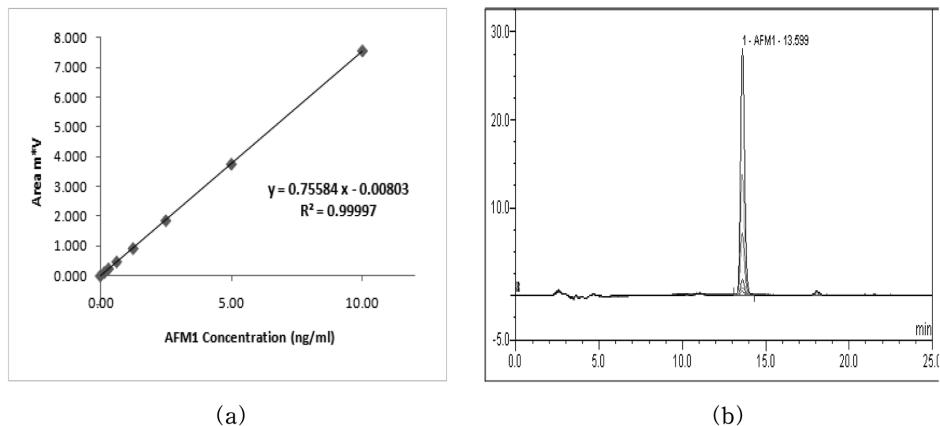


Fig. 4. Calibration curve and chromatograms of standard aflatoxin M₁.

아플라톡신은 유전독성을 가지는 발암물질이기 때문에 일일섭취내용량(TDI, tolerable daily intake)을 산출할 수 없으므로 본 연구에서는 국제기구 등 여러 문헌을 참고하여 동물실험 및 역학조사 결과 산출된 간암발암력을 위해평가 비교 자료로 이용하였다(6).

동물실험 및 역학조사 결과 산출된 발암력을 이용하여 아플라톡신 M₁에 의한 간암발생률을 산출하는데, 노출평가 결과 산출된 아플라톡신의 섭취량을 기 산출한 우리나라 간암 발암력에 적용하여 아래와 같이 아플라톡신 섭취로 인한 감암 발생률을 산출하였다(7,8).

$$\begin{aligned} \text{간암발생률} \\ = & \text{간암발암력(cancer potency)} \times 1\text{일추정섭취량(ng/kg bw/day)} \end{aligned}$$

결과 및 고찰

시험법 검증

아플라톡신 분석법의 특이성과 검량선의 상관성 등을 검토한

결과, Fig. 3과 같이 아플라톡신 M₁의 정제 및 피크 분리를 확인하였으며, 7개의 농도로 제조된 표준용액들을 분석하여 검량선을 작성하였을 때, 상관계수는 0.9999 이상으로서 확립된 HPLC 분석법이 조제분유 중 아플라톡신 M₁의 분석에 효과적임을 확인하였다(Fig. 4).

이 시험법의 적합성을 검토하기 위해 회수율을 조사한 결과 회수율은 81.2-98.9%(Table 3)로 Lin 등(9)이 0.5와 5.0 µg/kg 농도에 대한 각각 시료의 회수율이 88.7±1.9 및 86.0±1.9%와 비교했을 때 유사한 수준을 보였다. 현재 EU에서 제안한 곱평이독소 분석법 멜리테이션 중 회수율의 유효 범위 60-120%에 만족하는 것으로 확인되어 본 시험법이 아플라톡신 M₁ 분석에 적합한 것으로 판단된다. 아플라톡신 M₁의 검출한계(LOD)는 peak 대 noise의 비율이 3:1인 0.4 ng/kg이었고, 정량한계(LOQ)는 0.8 ng/kg으로 Shundo 등(10)과 Oliveira와 Ferraz(11)가 확립한 HPLC 분석법 결과와 비슷한 수준으로서 분유 내 아플라톡신 M₁을 분석하기에 적합한 것으로 판단된다.

Table 3. Validation for analytical method of aflatoxin M₁ in powdered milk
(unit: ng/kg)

	Days	AFM ₁ spiked levels		
		12.5	25	50
Intraday (n=3)	1 day	94.0±3.5	87.5±4.8	84.1±0.8
	2 day	98.8±8.6	89.8±7.3	81.2±0.4
	3 day	98.9±4.1	96.6±6.0	84.7±2.4
Interday (n=9)		97.2±5.6	91.3±6.7	83.3±2.1

¹⁾SD: standard deviation**Table 4. Validation of aflatoxin M₁ in CRM powdered milk**
(unit: ng/kg)

	Days	AFM ₁ levels	
		111±18	
Intraday (n=3)	1 day	86.1±5.1	
	2 day	89.1±0.4	
	3 day	82.7±1.8	
Interday (n=9)		86.0±3.7	

¹⁾SD: standard deviation

획립된 아플라톡신 M₁에 대한 HPLC 분석법의 정확성을 측정하기 위해 European Reference Materials에서 아플라톡신 M₁에 111±18 ng/kg 농도로 오염된 분유 인증표준물질(CRM)을 구매하여 오염량을 측정하였다. 그 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 86.0±3.7 ng/kg의 정확성(회수율)을 보였고, 표준물질을 첨가하여 분석한 회수율과 비슷한 수준으로 확인되었다. 같은 CRM을 이용한 Chen 등(12)의 98.6±15.4%와 비교하였을 때 본 연구의 분석결과가 더 재현성 있는 것으로 판단된다.

HPLC에 의해 분석된 검체들 중 검출한계 이상으로 검출된 시료들은 LC/MS/MS를 이용하여 아플라톡신 M₁의 존재 여부를 확인하였다. LC/MS/MS 크로마토그램에서 표준물질과 동일한 머무름 시간(retention time)을 가지며 SRM (selected reaction monitoring) 모드상에서 모분자 이온 m/z 329로부터 생성되는 딸이온

(daughter ion) m/z 259와 m/z 273의 이온세기의 비가 표준물질과 20% 이내에서 동일한 경우 아플라톡신 M₁임을 확인하였다(Fig. 5).

실태조사 결과

439점의 시료에서 아플라톡신 M₁을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 분유의 제품사용법에 근거하여 액상기준으로 환산하였으며, 분석 결과 얻어진 LOD 이하의 값은 LOD/2의 값으로 계산하였고 LOD 이상은 검출된 값을 적용하였다. 439점의 시료 중 281점(64.0%)에서 아플라톡신 M₁이 검출되었고, 제품내 유성분의 함량이 높은 제품군이 비교적 아플라톡신 M₁의 검출값이 높았으나, EU 기준규격을 초과한 제품은 없는 것으로 확인되었다.

JECFA에서 2001년 발표한 보고서에 의하면 유럽과 호주 및 남미지역에서는 매우 낮은 오염도를 보이는 반면 아시아지역에서 상대적으로 높은 오염도를 보이고 있다(6). 특히, 우리나라에서 1997년에 수행된 모니터링 결과를 보면 최대 0.33 μg/kg이 검출되었으며, 평균오염도가 0.15 μg/kg로서 브라질, 중국 및 프랑스에 비해서 낮게 검출되었으나 전체적으로 다소 높게 나온 것으로 보여진다(Fig. 6). 본 연구에서는 평균 0.0026, 최대 0.0149 μg/kg로서 1997년의 연구결과와 비교할 때 약 7배 낮은 오염도를 보이고 있다.

안전성평가

동물실험결과 및 역학자료를 이용하여 아플라톡신 M₁의 B형 간염바이러스 감염 여부에 따른 발암력을 산출하였다. 2001년에 JECFA에서는 아플라톡신 M₁의 발암력은 아플라톡신 B₁의 1/10 수준으로 평가하여, 아플라톡신 M₁이 1 ng/kg bw/day 노출되었을 때 간암보균자(HBsAg⁺)에서 간암 발암력은 0.3 cancers/1,000,000/year^o이고, 간염비보균자(HBsAg⁻)에서는 0.01 cancers/1,000,000/year로 평가하였다. 우리나라의 B형 간염보균자는 전체인구의 7%이므로 간암발암력은 다음과 같이 계산할 수 있다(8).

$$(0.3 \times 7\%) + (0.01 \times 93\%) \text{ cancers}/1,000,000/year \\ = 0.0303 \text{ cancers}/1,000,000/year$$

이 수치는 아플라톡신 M₁이 1 ng/kg bw/day 노출되었을 때 우리나라에서는 1년 중 백만명당 0.0303 명의 간암이 추가로 발생될 수 있다는 것을 의미하고 있다.

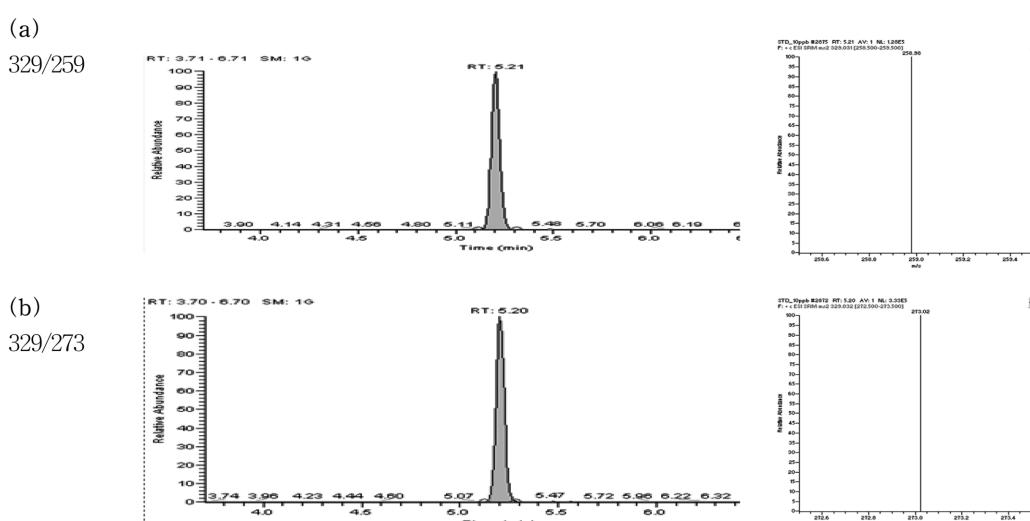
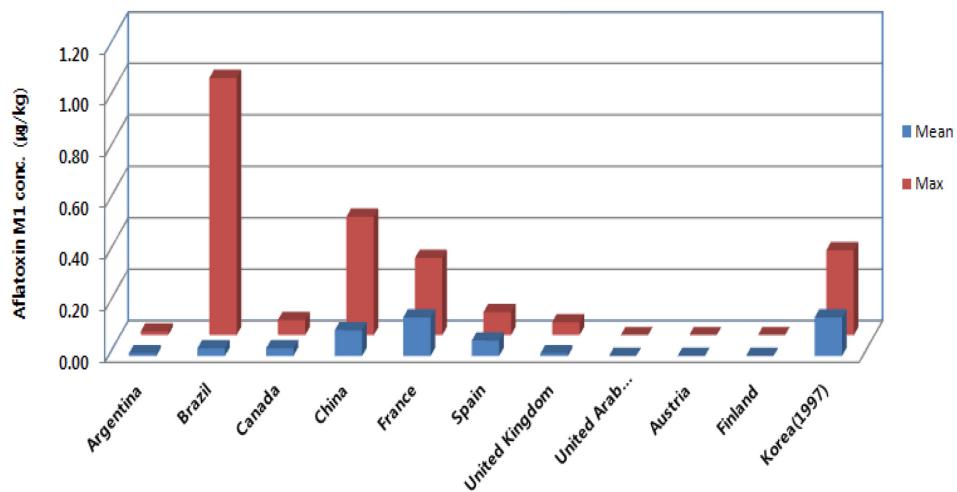
**Fig. 5. LC/MS/MS chromatogram and mass-spectrum of aflatoxin M₁.**

Table 5. Occurrence and average of aflatoxin M₁ in infant foods

Food	No.	Positive No. (%)	Mean (ng/kg)	Detection range	AFM ₁ Positive samples		
					<LOD ¹⁾	LOD≤LOQ ²⁾	LOQ<
Modified milk powder	142	104(73.2%)	2.6	N.D-7.7	38	13	91
Modified milk powder for follow-up	68	48(70.6%)	2.9	N.D-10.1	20	7	41
Follow-up formula	96	73(76.0%)	4.1	N.D-14.9	23	5	68
Cereal based food for infants and young children	51	31(60.8%)	2.3	N.D-11.3	20	5	26
Special medical purpose for infants and young children	17	5(29.4%)	1.4	N.D-7.1	12	-	5
Infant formula	6	3(50.0%)	0.8	N.D-1.2	3	1	2
Other foods for infants and young	59	17(28.8%)	0.5	N.D-5.9	42	8	9
Total	439	281(64.0%)	2.6	N.D-14.9	158	39	242

¹⁾LOD: Limit of detection, 0.4 ng/kg²⁾LOQ: Limit of quantitation, 0.8 ng/kg**Fig. 6. Aflatoxin M₁ levels in powdered milk according to country.****Table 6. EDI and cancer risk of aflatoxin M1 according to ages of people**

Age (month)	0-1	1-3	3-6	6-12	12-24
Body weight (kg bw)	3.35	5	7.2	8.9	11.1
Daily intake (g/day)	839.7	959.6	999.6	1199.5	959.6
Estimated daily intake (ng/kg bw/day)	0.646	0.494	0.358	0.347	0.223
Cancer risk (person/1,000,000/year)	0.0196	0.0150	0.0108	0.0105	0.0067

분유를 섭취하는 주 연령층은 0-24개월의 영유아로서 24개월 이상 연령의 소비량은 매우 미미하다. 따라서, 위해평가는 0-24개월의 영유아를 대상으로 하였고, 영유아의 간염보균자 비율은 전체인구의 간염보균자와 비율과 동일하다는 가정 하에 수행하였다.

오염도자료 및 섭취량자료를 이용한 위해평가결과, 분유 중 아플라톡신 M₁의 일일추정섭취량은 0.223-0.646 ng/kg bw/day이었고, 섭취에 의해 발생되는 연령별 간암 발생 가능성은 1년에 백만명당 0.0067명-0.0196명 수준이었으며, 신생아(0-1개월)에서 위해도가 가장 높았으나 노출에 의한 간암발생률은 1년에 백만명당 약 0.02명 수준으로서 분유 중 아플라톡신 M₁에 의한 위해수준은 낮은 것으로 평가되었다(Table 6). 그러나, 영유아의 경우 상대적으로 유해물질에 대한 면역력이 취약하고, 단위체중 당 특정 영유아용 식품의 섭취가 높은 점을 감안할 때 지속적인 관심이 필요하다.

요약

본 연구에서는 분유 중 아플라톡신 M₁을 면역친화성칼럼을 이용하여 정제하고 HPLC로 분리하였으며 형광검출기로 정량 분석하는 시험법을 확립하였다. 이 시험법을 이용하여 439건의 시료에 대한 분석을 실시하였다. 그 결과, 아플라톡신 M₁의 검출농도는 평균 2.6 ng/kg(불검출-14.9 ng/kg)로 나타났으며, 검출률은 64%로 조사되었다. 본 연구의 오염도자료를 이용한 분유 중 아플라톡신 M₁의 노출량 및 위해 수준은 연령별로 비교했을 때 신생아에게서 가장 높게 나타났으나 초과간암발생률은 1년에 백만명당 0.02명 정도로서 위해수준은 매우 낮은 것으로 평가 되었다.

문헌

- JECFA. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO

- Technical Report Series No 906. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive, Geneva, Switzerland. pp. 8-16 (2002)
2. Sargeant KCRBAAR. Chemistry and origin of aflatoxins. Chemical Ind. London, UK. pp. 53-55 (1963)
3. Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. Mutat Res. 424: 167-181 (1999)
4. Buchi G, Spitzner D, Paglialunga S, Wogan GN. Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P1. Life Sci. 13: 1143-1149 (1973)
5. Purchase IFH. Acute toxicity of aflatoxin M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. Food Cosmet. Toxicol. 5: 339-342 (1967)
6. Henry SH, Whitaker T, Rabbani I, Bowers J, Park D, Price W, Bosch FX, Pennington J, Verger P, Yoshizawa T, van Egmond H, Jonker MA, Coker R. Evaluation of certain mycotoxins. WHO Food Additives Series, No. 47/FAO Food and Nutrition Paper 74 (2001)
7. Lee MS, Kim DH, Kim H, Lee HS, Kim CY, Park TS, Yoo KY, Park BJ, Ahn YO. Hepatitis B vaccination and reduced risk of primary liver cancer among male adults: A cohort study in Korea. Int. J. Epidemiol. 27: 316-319 (1998)
8. Yo Ahn. strategy for vaccination against hepatitis B in areas with high endemicity: focus in Korea. Gut. 38: S63-S66 (1996)
9. Lin LC, Liu FM, Fu YM, Shih DYC. Survey of aflatoxin M₁ contamination of dairy products in Taiwan. J. Food Drug Anal. 12(2): 154-160 (2004)
10. Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. Food Control. 20: 655-657 (2009)
11. Oliveira CAF, Ferraz JCO. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. Food Control. 18: 375-378 (2007)
12. Chen CY, Li WJ, Peng KY. Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Agr. Food Chem. 53: 8474-8480 (2005)