RRLC-MS/MS를 이용한 견과류 및 그 가공품과 건조과실류의 아플라톡신 분석

최수정* · 박주성 · 정소영 · 손여준 · 이윤정 · 김미선 · 박소현 · 이상미 · 채영주
서울시보건환경연구원

Determination of Aflatoxins in Nuts, Their Products and Dried Fruits Using Rapid Resolution Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Su Jeong Choi*, Ju Sung Park, So Young Jung, Yeo Joon Son, Yun Jeong Lyi, Mi Sun Kim
So Hyun Park, Sang Me Lee, and Young Zoo Chae

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

Abstract The occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in nuts, their products and dried fruits was investigated. Samples were collected from local markets in Seoul and analyzed by rapid resolution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry using an immunoaffinity column. The chromatography method was validated for assay of aflatoxins using linearity, accuracy, precision and limit of detection and quantification. The linearity in the concentration ranged from 0.10 to 20 µg/kg with R²>0.9999. Sample recoveries ranged from 71.1 to 97.2% with relative standard deviations below 4.5% for spiking levels from 1 to 10 µg/kg. The limits of detection ranged between 0.02 and 0.05 µg/kg and the limits of quantification ranged between 0.05 and 0.10 µg/kg. The levels of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in nuts, their products and dried fruits were B₁ 0.10 to 9.94 µg/kg, B₂ 0.08 to 1.54 µg/kg, G₁ 0.04 to 3.21 µg/kg and G₂ 0.06 to 0.14 µg/kg.

Keywords: aflatoxins, RRLC-MS/MS, nuts, dried fruits, validation

서 론

곰팡이 독소는 *Aspergillus*속, *Penicillium*속 및 *Fusarium*속에 의해서 생성되며 그 중 아플라톡신은 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* 등의 *Aspergillus*속 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물이다(1,2). 지금까지 20여종의 아플라톡신이 알려져 있으나 일반적으로 발견되는 아플라톡신은 B₁, B₂, G₁, G₂로서 곡류, 두류, 견과류 등 농산물과 그 가공품에 광범위하게 발견되고 있다. 이 중에서도 아플라톡신 B₁은 발암성, 기형유발, 간장독성 등을 유발하는 가장 강력한 독성물질로, 국제암연구회(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서 Group 1(Carcinogenic to humans)로 분류하고 있다(3).

아플라톡신은 세계 각 나라별로 기준 및 규격이 설정되어 있는데 가장 독성이 강한 B₁으로 관리하는 경우와 총 아플라톡신(B₁, B₂, G₁ 및 G₂)으로 관리하는 경우가 있다. 각국의 관리현황을 살펴보면 유럽연합(EU)에서는 땅콩, 견과류, 건조과실류, 곡류, 그 가공품, 옥수수, 향신료, 영유아용 곡류가공품 및 이유식

에 대하여 B₁으로 0.1-8 µg/kg, 총 아플라톡신으로 4-15 µg/kg을 최대기준(Maximum level)으로 설정하고 있으며(4), 미국 식품의약국(FDA, Food and Drug Administration)에서는 브라질넛 · 식품, 땅콩, 땅콩가공품, 피스타치오에 대해 총 아플라톡신으로 20 µg/kg의 기준을 설정하여 운용하고 있다(5). 국제식품규격위원회(Codex)에서는 가공된 아몬드, 헤즐넛, 피스타치오넛, 비가공된 땅콩, 아몬드, 헤즐넛, 피스타치오넛에 대하여 총 아플라톡신 10-15 µg/kg으로 관리하고 있으며(6,7), 일본은 아플라톡신 B₁은 10 µg/kg으로 관리하고 있다(8). 우리나라는 곡류, 두류, 땅콩 및 그 가공품, 장류 및 고춧가루, 팥콩용 옥수수 가공품 등에 총 아플라톡신 15 µg/kg 이하, 특히 B₁은 10 µg/kg으로 규제하고 있으며(9), 2010년 6월에 밀가루, 건조과실류에 대한 기준을 신설하였다(10).

아플라톡신의 분석방법은 thin layer chromatography(TLC)(11), high performance liquid chromatography(HPLC)(12,13), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)(14) 등이 있다. TLC는 분석 과정이 간단하고 비용이 적게 드나 분리가 떨어지고, 민감도와 정확성이 떨어지는 단점이 있으며(15), ELISA는 빠르고 민감도가 높은 반면에 복잡한 매트릭스에 의한 교차반응에 의한 위양성이 나타날 수 있는 단점이 있다(16,17). 그래서 다양한 형태의 시료에 적용할 수 있는 분석법으로 형광검출기를 이용한 HPLC가 주로 이용되고 있으며, 높은 특이성, 민감성 및 선택성 등의 장점이 있고, 아플라톡신 이성질체들의 구조적 차이, 특히 terminal ring의 차이에 기인한 형광 성질을 이용하여 아플라톡신의 동시 분석이 가능하다(18). 그러나 HPLC를 이용한 아플라톡신 분석을 위해서는 시료추출과 정제과정, 물질 분리 등에 장시간이 소요되

*Corresponding author: Su Jeong Choi, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon, Gyeonggi 427-070, Korea
Tel: 82-2-570-3247
Fax: 82-2-570-3248
E-mail: kittysj@seoul.go.kr
Received June 7, 2011; revised September 6, 2011;
accepted September 8, 2011

고, 상당한 수준의 기술이 요구되며, 특히 아플라톡신 B₁과 G₁은 이동상에 의해 형광이 상쇄되어 검출한계를 높이기 위해 pre-column과 post-column 유도체화 과정이 요구되는 등 많은 어려움이 있다(19,20). 최근에는 피크의 분리능과 감도를 향상시켜 분석 시간의 단축과 효율적인 분리가 가능한 ultra high pressure liquid chromatography(UPLC)가 이용되고 있으며(21), 정확한 분석을 위해 질량분석기(Mass spectrometry)를 장착하여 측정대상물질을 확인할 수 있는 liquid chromatography mass spectrometry(LC/MS) 등이 이용되고 있으며, 유도체화 과정 없이 높은 감도와 정량분석이 가능한 장점이 있다(22).

또한 곰팡이독소분석의 중요한 단계는 시료의 정제과정에 있는데, solid phase extraction(SPE), liquid liquid extraction, supercritical fluid extraction(SFE), accelerated solvent extraction(ASE)(23), multifunctional columns(Mycosep)(24), immunoaffinity columns(IAC, 면역친화성칼럼) 정제법이 있다. 그 중 면역친화성칼럼은 아플라톡신에 특이적인 항체가 있어 아플라톡신 정제에 효율적이며, 신속하고, 간편한 방법이다(25).

따라서 본 연구에서는 아플라톡신 검출율이 높은 견과류 및 견과류 가공품과 최근 기준이 신설된 건조과실류에 대하여 면역친화성칼럼으로 정제 후 RRLC-MS/MS 분석법의 유효성을 검증하고, 확립된 분석법을 이용하여 아플라톡신의 오염도를 파악하고 안전관리 방향을 설정하는데 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료

2010년 서울에서 유통되고 있는 견과류 및 견과류 가공품 10 품목 127건, 건조 과실류 11품목 98건, 총 225건의 시료를 수거하여 아플라톡신을 분석하였다. 시료는 분쇄기(HMF-1000, Hanil, Incheon, Korea)로 분쇄하여 폴리에틸렌 비닐팩에 밀봉 포장하여 냉동(-20°C)보관하면서 사용하였다.

시약 및 장비

아플라톡신 B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 화학적 구조는 Fig. 1과 같으며, Sigma-Aldrich Inc.(St. Louis, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 추출 및 분석에 사용되는 메탄올과 아세토니트릴은 HPLC급(Merck, Darmstadt, Germany)였으며, 염화나트륨(Merck), 트윈20용액(Junsei, Tokyo, Japan), 암모늄아세테이트(Fluka, Buchs, Germany), 개미산(Fluka)은 모두 특급 이상의 것을 사용하였다.

Fig. 1. Chemical structures of aflatoxins.

시료를 여과하기 위해 5A 여과지(Advantec, Pleasanton, CA, USA)를 사용하였으며, 실린지 필터는 0.45 µm의 13 mm 실린지 디스크 필터(Life Sciences Co., UK)를 사용하였고, 분석물질 정제용 칼럼은 면역친화성칼럼(Aflatest, Vicam Co., USA)을 사용하였다.

분석에 사용된 RRLC-MS/MS는 Agilent사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200 Series HPLC와 결합된 Applied Biometrics 사(Bonn, Germany)의 Qtrap 3200 Triple-Quadrupole 텐덤 질량분석기를 사용하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Luna C₁₈(2) 150×2 mm, 3 µL이며, 추출에 사용된 균질기는 Omni Macro ES(USA)이고, 용매를 제거할 때 사용한 질소농축기는 EYELA MG-2200(EYELA Co., Tokyo, Japan)이었다.

표준용액의 조제

아플라톡신 표준원액은 B₁, B₂, G₁ 및 G₂ 표준물질을 메탄올에 녹여 정확히 100 µg/kg로 만들어 -20°C에서 냉동보관하면서 표준원액으로 사용하였으며, 혼합표준용액은 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 µg/kg 농도가 되도록 이동상으로 희석하여 사용하였다.

추출 및 정제

시료의 전처리 과정은 식품공전방법을 적용하였다(9). 분쇄한 시료 25 g을 달아 균질기에 넣고 염화나트륨이 함유된 70% 메탄올 100 mL를 넣어 50×g으로 10분간 고속으로 균질화한 후 이를 5A 여과지로 여과한다. 여액 10 mL를 취해 10% 트윈(Tween) 20

Fig. 2. Flow diagram of sample preparation for analysis of total aflatoxins in various foods.

용액 30 mL를 가하여 희석한 후 추출액 20 mL를 면역친화성컬럼(Immunoaffinity column)에 주입하여 초당 1방울의 속도로 통과시켰다. 이어서 물 10 mL를 같은 유속으로 완전히 유출하여 버리고 아세토니트릴 3 mL로 유출시킨 후 질소 농축하고 이동상 1 mL에 용해시켜 0.45 μ m 실린지 필터로 여과하여 기기분석에 사용하였다. 전처리과정을 요약하여 Fig. 2에 나타냈다.

기기분석

조제된 표준용액과 시험용액을 Qtrap 3200 Triple-Quadrupole 텐덤 질량분석기가 부착된 HPLC(Agilent 1200)에 주입하여 표준용액과 시험용액과 머무름 시간과 면적을 비교하여 분석하였으며, 기기분석조건은 Table 1에 나타냈다.

분석법 유효성 검증

본 실험의 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification)로 유효성 검증을 하였다. 직선성은 혼합표준용액을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 μ g/kg 농도가 되도록 이동상으로 희석한 후 RRLC-MS/MS에 주입하여 얻어진 피크면적으로부터 검량선을 작성하였다. 정확성과 정밀성은 아플라톡신이 검출되지 않은 시료에 최종농도가 1, 5, 10 μ g/kg으로 아플라톡신을 첨가하여 회수율과 상대표준편차로 측정하였고, 검출한계와 정량한계는 혼합표준용액을 저농도로 희석하면서 RRLC-MS/MS로 분석하여 signal 대 noise 비

(S/N ratio)가 3대 1일 때의 농도를 기준으로 아플라톡신의 검출한계를 측정하였고, 정량한계는 signal 대 noise 비가 10대 1일 때의 농도를 기준으로 측정하였다.

결과 및 고찰

크로마토그램과 질량 스펙트럼

아플라톡신 4종의 분리를 위해 RRLC-MS/MS를 사용하여 표준물질의 크로마토그램과 질량스펙트럼을 확인하였다. 혼합표준물질의 머무름 시간은 아플라톡신 G₂ 4.8분, G₁ 5.1분, B₂ 5.4분, B₁ 5.7분에 검출되었고, 분석하고자 하는 물질의 분리능과 효율성은 적합하였다. 텐덤 질량분석기에서 아플라톡신의 정량이온과 정성이온들을 얻기 위해 먼저 ESI 양이온(+)모드를 사용하여 full scan mode를 통해서 질량스펙트럼을 얻은 후, 기준이온(base ion)을 선구이온(precursor ion)으로 선택하였다. 선택된 선구이온에 최적의 충돌에너지(collision energy)를 선택하여 안정되고 감도 좋은 생성이온(product ion)을 만들어 특성 이온을 선택하여 MRM(multiple reaction monitoring)방법으로 분석하였다. 아플라톡신 4종 모두는 [M+H]⁺이 선구이온으로 선택되었는데 아플라톡신 B₁은 m/z 313, B₂는 m/z 315, G₁은 m/z 329, G₂는 m/z 331이었다(Fig. 3). 생성이온들 중에서 감도가 가장 큰 이온이 정량이온(quantification ion)으로, 차순 크기의 이온들은 확인이온(confirmation ion)으로 정성확인을 하였다(Fig. 4).

Table 1. The operation parameters of RRLC-MS/MS for analysis of aflatoxins

Instrument	Parameter	Conditions					
LC parameter	Column	Luna C ₁₈ (2), 2×100 mm, 3 μ m					
	Mobile phase	A: Methanol (5 mM Ammonium Acetate+0.1% Formic acid) B: Water (5 mM Ammonium Acetate+0.1% Formic acid)					
	Gradient	Time (min)	0	0.5	2	5	7 9
		Solvent A(%)	50	50	70	95	50 50
	Flow rate	0.4 mL/min					
	Injection volumn	10 μ L					
MS parameter	Column Temp.	25°C					
	Polarity	ESI+					
	Curtain gas	25 psi					
	Collision gas	medium					
	Ionspary voltage	5500 V					
	Temperature	500°C					
	Ion source gas 1	40 psi					
	Ion source gas 2	50 psi					
	Interface heater	on					
MRM	Standard	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	EP ¹⁾ (V)	DP ²⁾ (V)	CE ³⁾ (V)	CXP ⁴⁾ (V)
	Aflatoxin B ₁	313	285.2	2.5	71	29	4
		313	241.2	2.5	71	49	4
	Aflatoxin B ₂	315	287.3	4.5	76	31	4
		315	259.2	4.5	76	39	4
	Aflatoxin G ₁	329	243.2	10.5	66	35	4
		329	311.2	10.5	66	27	4
	Aflatoxin G ₂	331	313.2	10.5	66	29	4
		331	245.2	10.5	66	39	4

¹⁾EP: Enterance potential, ²⁾DP: Dedustering potential, ³⁾CE: Collision energy, ⁴⁾CXP: Collision cell exit potential

Fig. 3. Electrospray positive ion Q1 mass spectrum used for MRM of aflatoxins.

검량선과 검출한계 및 정량한계

아플라톡신 검량선 작성을 위하여 아플라톡신 혼합표준용액을 조제한 후 RRLC-MS/MS로 분석하였다. 그 결과 Table 2와 같이 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂에서 상관계수(R²)가 0.9999 이상의 우수한 직선성을 나타냈고, 분석법에 의해 얻은 표준물질의 크로마토그램은 Fig. 6에 나타냈다.

검출한계는 signal 대 noise 비가 3대 1일 때의 농도로 구한 결과 B₁, B₂, G₁은 0.02 µg/kg, G₂는 0.05 µg/kg 였고, 정량한계는 signal 대 noise 비가 10대 1일 때의 농도로 구한 결과 B₁, B₂, G₁은 0.05 µg/kg, G₂는 0.10 µg/kg 였다(Table 2). 본 연구의 검출한계와 정량한계는 기존 HPLC-FLD에서 보고된 Chun 등(26)의 검출한계(0.08-0.4 µg/kg), 정량한계(0.15-2.5 µg/kg)와 Kang 등(27)이 제시한 검출한계(0.05-0.2 µg/kg), 정량한계(0.1-0.4 µg/kg)보다 낮게 나타났다.

정확성과 정밀성

정확성 및 정밀성 실험을 위해 아플라톡신이 검출되지 않은 시료에 아플라톡신을 첨가 후 전처리하여 3회 반복 실험하였다. 회수율 실험은 시료의 매트릭스에 따라 땅콩, 건망고, 땅콩버터, 건포도로 나누어 최종농도가 1, 5, 10 µg/kg가 되도록 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂를 첨가하여 분석하였다. 아플라톡신의 각 첨가농도에 따른 회수율은 Table 3과 같이 B₁ 80.1-88.8%, B₂ 82.3-97.2%, G₁ 80.7-91.1%였고, 상대표준편차는 B₁ 0.41-4.50%, B₂ 0.23-3.85%, G₁ 0.25-4.48%, G₂ 0.79-4.05%을 보여, 회수율 최소 80% 이상과 정밀성 4.5% 이하의 상대표준편차(RSD)를 나타냈다.

하지만 G₂가 다른 아플라톡신에 비해 71.1-77.7%의 낮은 회수율을 보였는데, 이는 정제에 사용된 연역친화성 칼럼이 아플라톡신 B₁에 맞게 설계되어 다른 종류의 아플라톡신, 특히 G₂에 대해서는 특이적으로 결합하지 못해 이러한 결과를 보인 것으로 생각된다(28,29). 그러나 본 연구방법은 국제식품규격위원회(CODEX)의 아플라톡신 분석법에 대한 성능기준(performance criteria)인 회수율 70-110%(1-10 µg/kg 농도수준)와 상대표준편차 21.1-29.9%(1-10 µg/kg 농도수준) 이하를 만족하는 정확성과 정밀성을 나타냈다(30).

유통식품 중 총 아플라톡신 오염도 조사

유통 중인 견과류 및 그 가공품, 건조과실류를 대상으로 총 아플라톡신 오염도를 조사한 결과 Table 4에 나타났다. 총 225건 중 19건(8.4%)에서 아플라톡신 오염이 확인되었고, 그 농도는 총 아플라톡신 0.10-13.81 µg/kg, B₁ 0.10-9.94 µg/kg, B₂ 0.08-1.54 µg/kg, G₁ 0.04-3.21 µg/kg 및 G₂ 0.06-0.14 µg/kg였다. 본 연구결과에서 검출된 아플라톡신의 오염수준은 국내(총 아플라톡신으로 15 µg/kg 이하, 아플라톡신 B₁으로 10 µg/kg 이하) 및 미국(총 아플라톡신으로 20 µg/kg 이하)과 CODEX(총 아플라톡신으로 15 µg/kg 이하)의 기준규격을 초과하는 것은 없었다.

아플라톡신의 검출내역을 살펴보면 견과류 및 그 가공품의 검출빈도가 높았고, 오염수준은 건조과실류가 높게 나타났다. 견과류 및 그 가공품의 아플라톡신 오염수준은 총 아플라톡신 0.10-7.97 µg/kg, B₁ 0.10-6.43 µg/kg, B₂ 0.08-1.54 µg/kg, G₁ 0.07-0.72 µg/kg 및 G₂ 0.13 µg/kg였다. 특히 땅콩버터에서 87.5%의 높은 검

Fig. 4. Product ion Q3 mass spectrum used for MRM of aflatoxins.

Fig. 5. Extracted ion chromatogram (XIC) of aflatoxins (1 µg/kg) standards by RRIC-MS/MS.

출빈도를 보였고, 그 중 1건의 땅콩버터에서 아플라톡신 4종이 모두 검출되었으며, 땅콩에서 총 아플라톡신이 최대 7.97 µg/kg 검출되었다.

견과류에 대한 국내 아플라톡신 모니터링 연구결과를 보면 Chun 등(26)은 견과류 85건 중 9건에서 아플라톡신이 검출되었다고 보고하였으며, 볶음땅콩에서 총 아플라톡신이 최대 28.2 µg/

kg 검출되었다고 보고하였다. 또한 Jang(31) 등은 견과류 148건 중 31건에서 아플라톡신이 검출되었으며, 검출빈도는 땅콩버터 84.6%, 땅콩 30.0%였고, 총 아플라톡신 0.04-5.51 µg/kg, B₁ 0.04-2.65 µg/kg 검출되었고, Park(32)의 연구결과에서는 땅콩 및 땅콩버터 70건 중 15건(21%)이 검출되었고, 함량은 B₁ 1.2-49 µg/kg으로 보고하였다. 앞선 연구결과와 비교하면 본 연구결과의 오염수

Fig. 6. Extracted ion chromatogram (XIC) of aflatoxins contaminated dried fig by RRLC-MS/MS.

Table 2. Linear equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of aflatoxins¹⁾

	Linear equation	Correlation coefficient (R ²)	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
Aflatoxin B ₁	y=10851.3x-41.3	0.99997	0.02	0.05
Aflatoxin B ₂	y=8487.4x-116.5	0.99992	0.02	0.05
Aflatoxin G ₁	y=8475.8x-87.2	0.99994	0.02	0.05
Aflatoxin G ₂	y=4572.0x+111.5	0.99999	0.05	0.10

¹⁾Instrument linearity range: 0.1-20 μg/kg

준은 비교적 낮은 것으로 나타났고, 견과류 중 땅콩 및 땅콩가공품의 검출빈도가 높게 나타난 것은 유사하였다. 이러한 결과는 땅콩이 아플라톡신 생성 곰팡이에 가장 오염되기 쉬운 식품 중 하나라는 여러 연구결과와 일치한다(33-35).

외국의 연구사례를 보면 Leong 등(36)은 견과류 및 그 가공품 196건 중 32건에서 총 아플라톡신이 16.6-711 μg/kg 검출되었다고 보고하였고, Abdukadar 등(37)은 견과류 중 땅콩에서 총 아플라

톡신 0.17-2.13 μg/kg, 땅콩버터에서 총 아플라톡신 0.32-13.26 μg/kg 검출되었다고 보고하였으며, Yentr 등(38)은 땅콩버터에서 총 아플라톡신 8.16-75.7 μg/kg, B₁ 2.06-63.7 μg/kg 검출되었고, Huang 등(39)은 땅콩 35건 중 14건에서 총 아플라톡신 0.3-7.4 μg/kg, B₁은 최대 6.4 μg/kg 검출되었고, 땅콩버터 33건 중 31건에서 총 아플라톡신 0.3-7.4 μg/kg, B₁은 최대 51.4 μg/kg 검출되었다고 보고하였다. 또 2009년 유럽 RASFF(Rapid Alert System for Food and Feed)의 아플라톡신에 대한 검출사례를 보면 총 638건 중 견과류 및 그 가공품이 517건(81.0%)이었고, 그 중 땅콩 및 그 가공품은 218건(42.2%)이 검출되었으며, 총 아플라톡신 0.1-277 μg/kg, B₁ 0.1-243 μg/kg이 검출되었다는 사례(40) 등을 통해 견과류가 높은 검출율과 함량을 나타냄을 알 수 있었다.

본 연구의 건조과실류 11종 98건 중 3건(3.1%)에서 아플라톡신이 검출되었으며, 이 중 수분 함량이 적은 당절임인 건망고, 건파인애플, 건딸기류에서는 아플라톡신이 검출되지 않았는데, 일반적으로 당절임은 수분활성이 낮아 보관 중 곰팡이의 서식이 어려워 아플라톡신이 검출되지 않은 것으로 생각되나, 비교적 수분 함량이 높은 건살구, 건자두, 건포도, 꽃감, 건무화과 중 건무화

Table 3. Recovery and precision of aflatoxins in various foods (n=3)

Item	Spiked level (μg/kg)	Recovery (%)±RSD (%)			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Peanut	1	85.0±2.34	97.2±3.85	80.7±3.37	77.4±4.05
	5	85.8±1.21	91.9±1.10	83.4±3.32	77.7±2.31
	10	85.6±3.80	91.5±0.85	85.7±0.25	71.1±0.90
Dried mango	1	88.0±2.77	95.4±2.55	91.1±4.48	72.5±2.40
	5	85.2±0.41	91.7±0.50	85.9±1.76	73.9±1.28
	10	88.1±3.94	90.1±2.98	83.6±3.81	71.3±2.48
Peanut butter	1	88.8±1.95	95.7±1.82	85.8±3.46	71.8±2.98
	5	86.9±1.04	91.5±2.93	84.5±2.24	74.9±2.94
	10	84.8±1.42	93.0±0.23	84.3±2.85	77.0±2.57
Raisin	1	82.5±1.28	84.9±1.05	82.2±3.99	73.1±0.79
	5	84.3±1.12	82.3±2.53	82.1±0.61	72.6±1.68
	10	80.1±4.50	88.6±0.32	84.5±3.10	75.8±3.73

Table 4. Incidence and range of total aflatoxins level various foods (n=3)

Type of food		Incidence		Range of AFs levels ($\mu\text{g/kg}$)				
		No.	%	AFs	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Nuts and processed nut products	Peanut	1/31	3.2	7.97	6.43	1.54	N.D. ¹⁾	N.D.
	Peanut butter	14/16	87.5	0.10-2.18	0.10-1.64	0.08-0.39	0.07-0.72	0.13
	Walnut	0/17	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Almond	0/20	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Pistachio	0/7	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Cashew nut	0/12	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Pumpkin seed	0/6	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Sunflower seed	0/12	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Pecan	0/4	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Macadamia	0/2	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Sum	15/127	11.8	0.10-7.97	0.10-6.43	0.08-1.54	0.07-0.72	0.13
Fruits	Dried persimmon	0/11	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried jujube	0/12	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried apricot	0/2	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried plum	0/14	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Raisin	0/19	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried fig	3/15	20.0	0.15-13.81	0.11-9.94	0.11-0.52	0.04-3.21	0.06-0.14
	Dried pineapple	0/6	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried mango	0/6	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried cherry	0/3	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried blueberry	0/6	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Dried cranberry	0/4	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Sum	3/98	3.1	0.15-13.81	0.11-9.94	0.11-0.52	0.04-3.21	0.06-0.14
Total		19/225	8.4	0.10-13.81	0.10-9.94	0.08-1.54	0.04-3.21	0.06-0.14

¹⁾N.D.: Not detected

과에서 20%의 검출율을 나타냈다(27). 건무화과에서 얻은 크로마토그램은 Fig. 5와 같다. 검출된 건무화과 중 2건에서는 아플라톡신 4종이 모두 검출되었으며, 그 함량은 총 아플라톡신 0.15-13.81 $\mu\text{g/kg}$, B₁ 0.11-9.94 $\mu\text{g/kg}$, B₂ 0.11-0.52 $\mu\text{g/kg}$, G₁ 0.04-3.21 $\mu\text{g/kg}$, G₂ 0.06-0.14 $\mu\text{g/kg}$ 였다.

건조과실류에 대한 국내 연구사례를 보면 Kang(27) 등은 건무화과 20건 중 3건(15%)에서 검출되었다고 보고하였으며, 그 함량은 최대 0.564 $\mu\text{g/kg}$ 으로 본 연구보다는 낮은 함량을 나타냈다. 본 연구결과에서 검출된 아플라톡신의 오염수준은 국내(총 아플라톡신으로 15 $\mu\text{g/kg}$ 이하, 아플라톡신 B₁으로 10 $\mu\text{g/kg}$ 이하) 및 미국(총 아플라톡신으로 20 $\mu\text{g/kg}$ 이하)과 CODEX(총 아플라톡신으로 15 $\mu\text{g/kg}$ 이하)의 기준규격을 초과하는 것은 없었다. 그러나 Kang(27) 등의 건살구, 건자두, 건포도 및 꽃감에서 총 아플라톡신이 0.184, 1.053, 0.156 및 0.880 $\mu\text{g/kg}$ 이 검출되었다는 보고처럼 비교적 수분함량이 높은 제품의 경우엔 보관상 주의가 필요할 것으로 사료된다.

외국의 연구사례를 보면 Bircan(41)은 건살구, 건포도, 건무화과 171건 중 건무화과에서 총 아플라톡신 0.23-4.28 $\mu\text{g/kg}$ 검출되었고, Juan 등(42)은 건조과실류 중 건포도에서 B₁ 3.2-13.9 $\mu\text{g/kg}$, 건무화과에서 총 아플라톡신이 최대 32.9 $\mu\text{g/kg}$, B₁이 최대 0.28 $\mu\text{g/kg}$ 검출되었다고 보고하였다. 위의 연구결과에서도 비교적 수분함량이 높은 제품에서 아플라톡신이 검출됨을 알 수 있었다. 2009년 유럽 RASFF에서 아플라톡신에 대한 검출사례를 보면 과실류 및 채소류 64건 중 건무화과가 60건(93.8%)으로 매우 빈번하게 검출되는 것을 알 수 있었고, 그 함량은 총 아플라톡신 0.25-86.7 $\mu\text{g/kg}$, B₁ 1.2-47.9 $\mu\text{g/kg}$ 였다(40). Bircan(41)의 연구에서 건무

화과 중 아플라톡신과 오크라톡신이 함께 검출된 제품은 98건 중 2건으로 오크라톡신 0.23-1.02 $\mu\text{g/kg}$ 검출되어, 아플라톡신과 함께 다른 곰팡이 독소에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

모니터링 결과가 국내기준 이하의 안전한 수준으로 검출되었으나 곰팡이독소는 기후, 수확 전 후 관리, 저장, 유통 등의 여러 요인에 영향을 받기 때문에(43) 동일한 시료라도 오염수준이 달리 나타날 수 있어 정확한 노출평가를 위해서는 지속적인 모니터링이 필요하다. 또한 우리나라는 곡류를 주식으로 하고, 많은 식품과 원료 농산물을 수입에 의존하고 있어, 아플라톡신에 오염된 농산물의 수입이 우려되기 때문에(44), 다양한 식품 유형에 대한 지속적인 아플라톡신 모니터링과 함께 다른 곰팡이독소에 대한 연구도 필요할 것이다.

요 약

국내 유통되는 건과류 및 그 가공품, 건조과실류 총 225건을 대상으로 면역친화성칼럼으로 정제한 후 RRLC-MS/MS를 이용하여 아플라톡신에 대한 오염도를 조사하였다. 보다 효율적인 아플라톡신 분석을 위해 RRLC-MS/MS를 이용하여 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계로 분석법의 유효성 검증을 하였다. 상관계수(R²)는 0.9999 이상의 우수한 직선성을 보였고, 아플라톡신의 회수율은 71.1-97.2%였고, RSD는 0.25-4.50%로 우수한 재현성을 나타냈다. 검출한계는 0.02-0.05 $\mu\text{g/kg}$ 였고, 정량한계는 0.05-0.10 $\mu\text{g/kg}$ 였다. 확립된 분석법에 의해 분석한 결과 그 오염수준은 B₁은 0.10-9.94 $\mu\text{g/kg}$, B₂는 0.08-1.54 $\mu\text{g/kg}$, G₁은 0.04-3.21 $\mu\text{g/kg}$, G₂는 0.06-0.14 $\mu\text{g/kg}$ 였다. 본 연구결과에서 나타난 오

염수준은 국내규격 기준 이하였으나, 곰팡이독소의 생성 특이성을 고려한다면 다양한 식품 유형에 대한 지속적인 아플라톡신 함량조사와 함께 다른 곰팡이독소에 대한 연구도 필요하다고 판단된다.

문 헌

- Gourama H, Bullerman LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*; aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds-A review. J. Food Protect. 58: 1395-1404 (1995)
- Kurtzman CD, Horn BW, Hesselitine CC. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. J. Microbiol. 53: 147-158 (1987)
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 82. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. p. 171 (2002)
- European Commission. Commission Regulation No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Communities, L77/1, Luxembourg (2001)
- U.S. FDA. Guidance for Industry, Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. (2000)
- Creppy EE. Update of survey, regulation, and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett. 127: 19-28 (2002)
- Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and nutrition paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy (2004)
- Ministry of Health Labour and Welfare of Japan. Available from: <http://www.mhlw.go.jp/index.html>. Accessed Feb. 23, 2006.
- Korea Food and Drug Administration. Food code. Korea food Industry Association, Namhyung-Munhwa, Seoul, Korea. pp. 2-1-10 (2007)
- KFDA. KFDA's Notification NO. 2010-51, Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea (2010)
- Stroka J, Otterdijk RV, Anklam E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. J. Chromatogr. 904: 241-256 (2000)
- Manetta AC, Giuseppa LD, Giammarco M, Fusaro I, Simonellab A, Gramenzia A, Formigonia A. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M₁ in milk and cheese. J. Chromatogr. A 1083: 219-222 (2005)
- Giray B, Girgina G, Engina AB, Aydin S, Sahin G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. Food Control 18: 23-29 (2007)
- Saha D, Acharya D, Roy D, Shrestha D, Dhar TK. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in chili samples. Anal. Chim. Acta 584: 343 - 349 (2007)
- Holcomb M, Wilson DM, Trucksess MW, Thompson HC Jr. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. J. Chromatogr. 624: 341-352 (1992)
- Hu YY, Zheng P, Zhang ZX, He YZ. Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. J. Agr. Food Chem. 54: 4126-4130 (2006)
- Nilfer D, Boyaciolu D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini. J. Agr. Food Chem. 50: 3375 - 3379 (2002)
- Jaimeza J, Fente CA, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A, Mahuzierb G, Prognonb P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. J. Chromatogr. 882: 1-10 (2000)
- Ip SP, Chea CT. Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup: Improvement of recovery. J. Chromatogr. A 1135: 241-244 (2006)
- Alia N, Hashimb NH, Saad B, Safand K, Nakajimae M, Yoshizawa T. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. Food Chem. Toxicol. 43: 1763-1772 (2005)
- Rena Y, Zhang Y, Shao S, Caia Z, Fenga L, Pana H, Wang Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1143: 48-64 (2007)
- Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Nazzaria M, Samperia R, Lagan A. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 596: 141 - 148 (2007)
- Kokkonen M, Jestoi M, Rizzo A. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. Food Addit. Contam. 22: 449-456 (2005)
- Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernandez-Mendez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. J. Chromatogr. A 1089: 1-17 (2005)
- Cho SH, Lee CH, Jang MR, Son YW, Lee SM, Choi IS, Kim SH, Kim DB. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. Food Chem. 107: 1283-1288 (2008)
- Chun HS, Kim HJ, Ok HE, Hwang JB, Chung DH. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. Food Chem. 102: 385-391 (2007)
- Kang YW, Cho TY, Park HR, Oh KS, Kim DS. Analysis of total aflatoxins in spices and dried fruits. J. Fd. Hyg. Safety 25: 65-72 (2010)
- Gobal R, Rusky K. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zeralenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. J. AOAC Int. 87: 411-416 (2004)
- Devi KT, Mayo MA, Reddy KL, Delfosse P, Reddy G, Reddy SV, Reddy DV. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B₁. Lett. Appl. Microbiol. 29: 284-288 (1999)
- Codex Alimentarius Commission. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex stan 193. pp. 13-14 (1995)
- Jang MR, Lee CH, Cho SH, Park JS, Kwon EY, Lee EJ, Kim SH, Kim DB. 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). Korea J. Food Sci. Technol. 39: 488-493 (2007)
- Park JW. Analysis of peanut and peanut butter retailed in Korea for aflatoxin B₁. Korea J. Food Sci. Technol. 38: 309-312 (2006)
- Chan D, MacDonald SJ, 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 detection. J. Chromatogr. A 1059: 13-16 (2004)
- Mphande FA, Siame BA, Taylor JE. Fungi, aflatoxins and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Boswana. J. Food Protect. 67: 96-102 (2004)
- Escobar A, Regueiro OS. Determination of aflatoxin B₁ in food and feedstuffs in Cuba (1990 through 1996) using an immunoenzymatic reagent kit (Aflacen). J. Food Protect. 65: 219-221 (2002)
- Leong YH, Ismail N, Latif AA, Ahmad R. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. Food Control 21: 334-338 (2010)
- Abdulkadar AHW, Al-Ali A, Al-Jedah J. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. Food Control 11: 157-160 (2000)
- Yentr G, Er B, Zkan MG, Ktem AB. Determination of aflatoxins in peanut butter and sesame samples using high-performance liquid chromatography method. Eur. Food Res. Technol. 224: 167-170 (2006)
- Huang B, Han Z, Cai Z, Wu Y, Ren Y. Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 662: 62-68

- (2010)
40. European Commission: The rapid alert system for food and feed (RASFF) annual report. pp. 13-14 (2009)
41. Bircan C. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxin in dride figs. Food Chem. Toxicol. 47: 1996-2001 (2009)
42. Juan C, Zinedine A, Molto JC, Idrissi L, Manes J. Aflatoxin levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salarea, Morocco. Food Control 19: 849-853 (2008)
43. Magan N, Olsen M. Mycotoxin in Food Detection and Control. Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England. pp. 353-366 (2004)
44. KFDA. Yearbook of Imported Foods Inspection No.12, Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea. pp. 14-24 (2010)