우유 중 아플라톡신 M₁ 오염도 조사연구

박성국 · 강영운 · 권기성 · 이광호 · 김미혜*
 식품의약품안전청 식품위해평가부 오염물질과

Analysis and Monitoring of Aflatoxin M₁ in Milks

Sung Kug Park, YoungWoon Kang, Kisung Kwon, GwangHo Lee, and Meehye Kim*

Food Contaminants Division, Food Safety Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration

Abstract Raw milk samples (n=28) obtained from milk tanks in 3 dairy plants of different regions and commercial milks (n=100) were collected from six cities. These samples were analyzed for the level of aflatoxin M₁ contamination using immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detectors. Confirmation of aflatoxin M₁ (AFM₁) identified in positive samples was based on the formation of the hemiacetal derivative (AFM_{2a}) after derivatization with trifluoroacetic acid. The average concentrations of aflatoxin M₁ in the raw milks were 25.1 ng/kg, and those values in commercial milks were 29.8 ng/kg. The highest level of aflatoxin M₁ in milk was 72.7 ng/kg. These results showed that the contamination of aflatoxin M₁ in milks consumed in the Korea was quite low compared to the standard in Korea Food Code (aflatoxin M₁ 500 ng/kg).

Keywords: aflatoxin M₁, contamination, milk

서 론

우유 및 유제품은 주요 영양성분인 단백질, 칼슘, 비타민을 공급하는 대표적인 식품인 동시에 섭취 시 아플라톡신에 노출되는 주요 원인 식품이 될 수도 있다(1). 아플라톡신은 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* 등의 곰팡이 대사산물로서 동물에서 발암성, 돌연변이성, 최기형성 등을 나타내는 강력한 독성물질로 보고되었다. 아플라톡신의 주요한 형태는 B₁, B₂, G₁, G₂ 등이 있으며, 그 중 가장 독성이 강한 아플라톡신 B₁은 IARC에서 Group 1로 분류된 인체 발암물질이다(2,3).

아플라톡신 M₁(Fig. 1)은 아플라톡신 B₁의 주요 대사산물로 주로 우유에서 검출되는 것으로 보고되고 있다(4). 아플라톡신 B₁은 흡수되면 cytochrome P₄₅₀에 유전독성 epoxide인 아플라톡신 M₁으로 전환된 후 N₇-guanine adduct을 형성하는 DNA 반응 대사가 되어 단백질과 결합할 수 있다(5). 아플라톡신 M₁은 아플라톡신 B₁보다 독성은 낮으나 간독성 및 발암성을 나타내며 IARC에서는 Group 2B로 분류하고 있다(3).

아플라톡신에 오염된 사료를 섭취한 소의 유 및 유제품 섭취 시 건강에 유해한 영향을 미칠 수 있어 많은 국가에서 식품에 아플라톡신 M의 기준설정, 분석법 마련 및 오염도 실태조사를 통해 자국의 국민건강 보호를 위해 노력하고 있다. CODEX, 미국

Fig. 1. Chemical structure of Aflatoxin M.

에서는 우유 중 아플라톡신 M₁ 기준을 0.5 µg/kg으로 설정하여 운용하고 있으며(6,7), 유럽연합은 0.05 µg/kg(8)으로 설정하고 있고 우리나라는 국제기준과의 조화를 위해 2003년 ‘제조·가공직전의 원유 및 우유류’에 0.5 µg/kg로 설정하여 운용하고 있다.

본 연구에서는 우유에 대한 아플라톡신 M₁에 대한 실태조사 자료가 거의 없는 실정임을 감안하여 우유 중 아플라톡신 M₁ 시험법을 검토하고 국내에 유통되는 우유의 오염도 실태조사를 파악하고 국내외의 오염도 수준과 비교·평가하여 우유 중 아플라톡신 M₁에 대한 안전성을 평가하였다.

*Corresponding author: Meehye Kim, Food Contaminants Division, Food Safety Department, Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Chungbuk 363-951, Korea
 Tel: 82-43-719-4251
 Fax: 82-43-719-4250
 E-mail: meehkim@korea.kr

Received November 25, 2011; revised December 26, 2011;
 accepted December 26, 2011

재료 및 방법

대상시료

국내에서 시판되고 있는 시유를 2003년 1월부터 11월까지 시중 할인마트, 백화점 등에서 구입하였으며 원유는 유가공 회사 3곳에서 공급받아 시료로 사용하였고 시료에 대한 정보는 Table 1과 같다. 이들 시료는 분석하기 전까지 냉장(4°C)에서 보관하였다.

시약 및 기구

실험에 시험에 사용한 아플라톡신 표준물질은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 아플라톡신 표준원액은 아플라톡신 M₁, M₂ 각 10 mg을 달아서 benzene:acetonitrile(98:2, v/v) 혼합액에 녹여 정확히 각 100 mL로 정용하고, 아플라톡신 혼합표준용액은 각 원액 1 mL씩 분취하여 앞의 혼합액 benzene:acetonitrile(98:2, v/v)으로 정확히 100 mL로 제조한 후 적당량을 취하여 methanol로 희석하여 사용하였다. 그리고, acetonitrile(Merck, HPLC용), methanol(Merck, HPLC용), trifluoroacetic acid(Sigma-Aldrich Chemical Co.), 정제에 사용한 cartridge는 immunoaffinity column(Vicam Co., Watertown, MA, USA)을 사용하였다.

시험용액의 조제

우유 100 g을 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 지방층을 제거하였다. vacuum manifold에 immunoaffinity column을 장착하고 지방층이 제거된 우유 시료 10 g을 3 mL/min의 속도로 시료가

column을 통과하도록 진공을 걸어주고 통과된 것을 확인한 후 같은 속도로 20 mL의 증류수로 세척하였다. 세척 후 column에서 물기를 제거하여 2 mL의 acetonitrile을 사용하여 1-3 mL/min의 속도로 용출시켰다. 용출액은 질소로 농축하여 hexane 200 µL와 trifluoroacetic acid 200 µL를 사용하여 아플라톡신 M₁을 M₂로 유도체화시켜 이에 HPLC 이동상(water:acetonitrile:isopropanol=80:8:12)을 첨가하여 1 mL되게 용해시킨 후 0.45 µm 필터를 통과시켜 시험용액으로 사용하였다.

기기분석

아플라톡신을 정량분석하기 위해 HPLC system(Shiseido Co. Japan)을 사용하였고 column은 SUPELCOSIL LC-18(250×4.6 mm, I. d. 5 µm), 이동상은 water:acetonitrile:isopropanol=80:8:12 용액을 사용하였으며, 검출기는 Fluorescence detector(Ex 365 nm, Em 440 nm)를 사용하였다. 아플라톡신을 분석하기 위한 실험조건은 Table 3과 같다.

시험법 검증

시험법 검증을 위해 유에 아플라톡신 M₁을 0.5, 0.8, 5.0 µg/kg 첨가시켜 시험용액 조제방법에 따라 시료를 조제하여 HPLC를 사용하여 회수율을 3회 반복하여 농도별로 측정하였다.

결과 및 고찰

시험법 검증

시험법의 적합성을 검토하기 위해 회수율을 조사한 결과 회수율은 97.4-122.5%(Table 3)로 Rodriguez 등(9)이 보고한 회수율 80.7-97.9%와 유사한 수준을 보였으며 상대표준편차(RSD)는 6% 이내로서 적합한 시험법임을 확인하였다.

CODEX(10)에서 시험법 검증 시 허용하는 회수율은 농도별로 차이가 있으나 1 µg/kg 농도에서는 40-120%의 회수율을 제시하였으며 이 기준을 토대로 시험법을 판단하였을 때 적합한 것으로 판단된다. 표준용액과 시료의 chromatogram에서 방해물질은 관찰되지 않았으며 전체 분석시간은 10분이고 아플라톡신 M₁은 3분대에 나타났다(Fig. 2).

실태조사 결과

국내에 유통되고 있는 원유 등 총 우유시료에 대한 아플라톡신 M₁의 오염도를 조사한 결과(Table 4) 아플라톡신 M₁에 대한 검출농도 분포는 5 ng/kg 이하는 3.1%, 5-50 ng/kg 범위에서 95.3%, 50-500 ng/kg 범위에서 1.6%로 조사되었으며 평균 검출농도는 29.6 ng/kg 수준으로 나타났다. 이 결과는 2009년 Lee 등(11)이 우리나라에서 생산되는 100개의 원유시료에서 조사한 검출율 48%, 검출범위 2-80 ng/kg, 평균 26 ng/kg의 결과와 비교하였을 때 유사한 수준을 나타냈다. 본 연구결과로부터 2003년 이후 최근까지 우리나라에서 생산되는 원유에 대한 아플라톡신 M₁에 대한 정부의 관리가 비교적 잘 되고 있음을 유추해볼 수 있다.

원유 중 아플라톡신 M₁의 오염도를 조사한 결과는 Table 5와

Table 1. Sample information for analysis of aflatoxin M₁

Location	No. of samples	Type of milk samples
Pyongtaek	8	Raw milk
Hoengseong	15	Raw milk
Yangju	5	Raw milk
Daejeon	20	Commercial milk
Jeonju	15	Commercial milk
Wonju	20	Commercial milk
Yeongju	15	Commercial milk
Cheongju	15	Commercial milk
Chuncheon	15	Commercial milk
Total	128	Raw milk : 28, Commercial milk : 100

Table 2. Operation conditions of HPLC for aflatoxin M₁ analysis

Item	Conditions
Instrument	HPLC (Shiseido)
Column	SUPELCOSIL LC-18
Flow rate	1 mL/min
Mobile Phase	water:acetonitrile:isopropanol=80:8:12
Detector	Fluorescence detector (Ex 365 nm, Em 440 nm)

Table 3. Method performance of aflatoxin M₁ on the artificially contaminated samples

Sample	Fortification level (µg/kg)	No. of samples	Recovery (%)	RSD (%)
Milk	0.5	3	122.5	0.7
	0.8	3	106.6	6.0
	5.0	3	97.4	6.0

Fig. 2. Chromatogram of Aflatoxin M in standard and sample.

Table 4. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples

Range (ng/kg)	No. of Positive samples (%)
<5	4(3.1)
5-50	122(95.3)
50<-500	2(1.6)
Total	128(100)
Average concentration	29.6 ng/kg

Table 5. Occurrence and average concentration of aflatoxin M₁ in raw milk samples

Range (ng/kg)	No. of Positive samples (%)
<5	3(10.7)
5 - 50	24(85.7)
50 = 500	1(3.6)
Total	28(100)
Average concentration	25.1 ng/kg

같다. 아플라톡신 M₁에 대한 검출농도 분포는 5 ng/kg 이하 10.7%, 5-50 ng/kg 범위가 85.7%, 50-500 ng/kg 범위가 3.6%로 나타났다. 그리스와 포르투갈에서 Markakit와 Melissari(12)와 Martins와 Martins(13)이 보고한 원유의 오염도 90%와 유사한 수준으로 나타났다. 조사된 원유 중 아플라톡신 M₁의 평균 검출농도는 25 ng/kg 으로 나타났다.

시유 중 아플라톡신 M₁의 오염도를 조사한 결과는 Table 6에 나타났다. 아플라톡신 M₁에 대한 검출농도 분포는 5 ng/kg 이하 1.0%, 5-50 ng/kg 범위가 98.0%, 50-500 ng/kg 범위가 1.0%로 나

Table 6. Occurrence and average concentration of aflatoxin M₁ in commercial milk samples

Range (ng/kg)	No. of Positive samples (%)
<5	1(1.0)
5-50	98(98.0)
50<-500	1(1.0)
Total	100(100)
Average concentration	29.8 ng/kg

타났다. 조사된 시유 중 아플라톡신 M₁의 평균 검출농도는 30 ng/kg로 나타나 Bahk 등(14)과 Kim 등(15)이 보고한 우리나라에서 유통되고 있는 시유 중 아플라톡신 M₁의 평균 검출농도 31-47 ng/kg과 유사한 수준을 보였다.

조사된 우유의 아플라톡신 M₁ 평균값은 2001 JECFA 보고서(4)에 보고된 세계 지역별 평균값 유럽 23 ng/kg, 남미 22 ng/kg, 극동아시아 360 ng/kg, 중앙아시아 5 ng/kg, 아프리카 1.8 ng/kg 보다 낮거나 유사한 수준이었으며 특히 극동아시아지역과 비교하였을 때는 12배 낮은 수준을 나타내었다. 또한, 조사된 원유 및 시유 중 aflatoxin M₁의 최대 오염농도 72.7 ng/kg의 수준도 현행 식품공전에서 정한 허용기준치(아플라톡신 M₁으로서 500 ng/kg) 보다 매우 낮은 안전한 수준이었으나, 식품의 안전성 확보차원에서 아플라톡신 M₁에 대한 오염도 조사는 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서 적용한 시험법의 회수율은 97.4-122.5%, 상대표준 편차(RSD)는 6%이내로서 적합한 시험법임을 확인하였다. 조사된 원유 및 시유의 검출농도는 아플라톡신 M₁이 평균 29.6 ng/kg(5.4-72.7 ng/kg)로 나타났으며, 원유 및 시유에 대한 아플라톡신 M₁ 오염수준은 현행 식품공전에서 정한 허용기준치인 500 ng/kg 보다 낮은 안전한 수준인 것으로 판단된다.

문 헌

- Galvano F, Galofaro V, De Angelis A, Galvano M, Bognanno M, Galvano G. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. J. Food Protect. 61: 738-741 (1998)
- Sweeney MJ, Dobson AD. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. Int. J. Food Microbiol. 43: 141-158 (1998)
- IARC. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. IARC Monograph 56: 245-395 (1993)
- JECFA, Joint Expert Committee on Food Additive. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Food Additives Series 47: pp. 22-23 (2001)
- Cupid BC, Lightfoot TJ, Russel D, Grant SJ, Turner PC, Dingley KH, Curtis KD, Leveson SH, Turteltaub KW, Garner RC. The formation of AFB₁-macromolecular adducts in rat ad human ad dietary levels of exposure. Food Chem. Toxicol. 42: 559-569 (2004)
- Van Egmond HP. Aflatoxin M₁: Occurrence, toxicity, regulation. pp. 11-15 In: Mycotoxins in Dairy Products. Hans P. van Egmond (ed.). Elsevier Applied Science, New York, NY, USA (1989)
- Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M₁ in milk. Codex Committee on Food Additives and Contaminants 33rd Session. Codex Alimentarius Commission, Hague, Netherlands. pp. 19-20 (2001)

8. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December. Official J. EU. European Commission, European Union. pp. 16-17 (2006)
9. Rodriguez Velasco ML, Calonge Delso MM, Ordonez Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow's milk. Food Addit. Contam. 20: 276-280 (2003)
10. Procedural Manual 19th ed. Codex Alimentarius Commission, Joint WHO/FAO Food Standard Programme, Rome. pp. 52-53 (2010)
11. Lee JE, Kwak BM, Ahn JH, Jeon TH. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Food Control 20: 136-138 (2009)
12. Markaki P, Melissari E. Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. Food Addit. Contam. 14: 451-456 (1997)
13. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M₁ in raw and ultra-high temperature-treated milk commercialized in Portugal. Food Addit. Contam. 17: 871-874 (2000)
14. Bahk GJ, Lee MY, Roh WS, Chun SJ, Shim WC, Kim CN, Shin EH, Shon DW. Occurrence and estimation using Monte-carlo simulation of aflatoxin M₁ in Domestic cow's milk and milk products. J. Fd. Hyg. Safety 16: 200-205 (2001)
15. Kim EK, Shon DH, Ryu D, Park JW, Hwang HJ, Kim YB. Occurrence and aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Addit. Contam. 17: 59-64 (2000)