

# 釜山 및 慶南一帶 農産物의 Aflatoxin 汚染에 關한 調査

食品分析科

權 奇 源 · 金 聲 俊 · 徐 容 俊 · 姜 正 美 · 裴 基 哲

## Investigation on Aflatoxin contamination of the agricultural products in Pusan and Kyungnam districts

Food Analysis Division

K.W.Kwon · S.J.Kim · Y.J.Suh · J.M.Kang and K.C.Bae

### Abstract

To investigate the Aflatoxin contamination on the agricultural products in Pusan and Kyungnam districts, rice(4), unhulled barley(4), unhulled wheat(4), corn(4), soybean(4), redbean(4), greenbean(4) and peanut(4) were purchased. As a result of analysis by TLC and HPLC, one (unhulled wheat) out of 32 samples was contaminated with Aflatoxin B<sub>1</sub>(trace), Aflatoxin G<sub>1</sub>(1.3μg/kg) and unidentified fluorescent substance.

### I. 緒 論

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*菌種의 特定株가 生成하는 螢光 代謝生産物로서 사람을 위시하여 여러종류의 動物에 대해 強力한 經口的 發癌을 일으키는 物質로서 1960년 英國에서 發生한 질면조의 大量 廢死事件을 계기로 그 原因을 조사한

결과飼料에 混入된 브라질에서 輸入한 땅콩박에서 發見된 *Aspergillus flavus*의 2차 代謝物質에 起因 한다는 사실을 確認하고 이 곰팡이의 이름을 따서 Aflatoxin<sup>1)</sup> 이라고 命名한 이래 Aflatoxin을 分泌하는 微生物의 종류, Aflatoxin의 分析方法, 生化學的 및 生理的 特性 등이 急速히 糾明되어 왔다.

*Aspergillus*屬 곰팡이는 거의 전 세계에 分布하는 곰팡이로서 이들의 Aflatoxin 生産 最의 條件은 基質 水分 16% 이상, 相對濕度 80~85% 이상, 溫度 25~35℃ 이며 炭水化物이 豊富한 農産物 中에 쌀, 보리 등의 主要穀物을 基質로 한다.<sup>2)</sup>

Aflatoxin은 그 化學的, 物理的 成質이 밝혀진 것만 해도 현재 17種에 이르고 있으나 이 중 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 등이 잘 알려져 있고 이 중 가장 강한 毒性을 가진 것은 Aflatoxin B<sub>1</sub>으로서 LD<sub>50</sub>(半數 致死量)은 約 0.3mg/kg<sup>3)</sup>으로 1級 毒性物質(super toxic)<sup>4)</sup>이며 Wogan<sup>5)</sup>은 每日 12μg씩 245일간 쥐에게 投與 할 경우 肝癌 發生率이 80%이고, 4μ/g씩 주었을 경우는 14% 있다고 報告한 바 있다. Aflatoxin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> 및 M<sub>1</sub>의 構造式은 그림 1<sup>6)</sup>과 같으며 일반적인 性狀은 표 1<sup>7)</sup>과 같다.

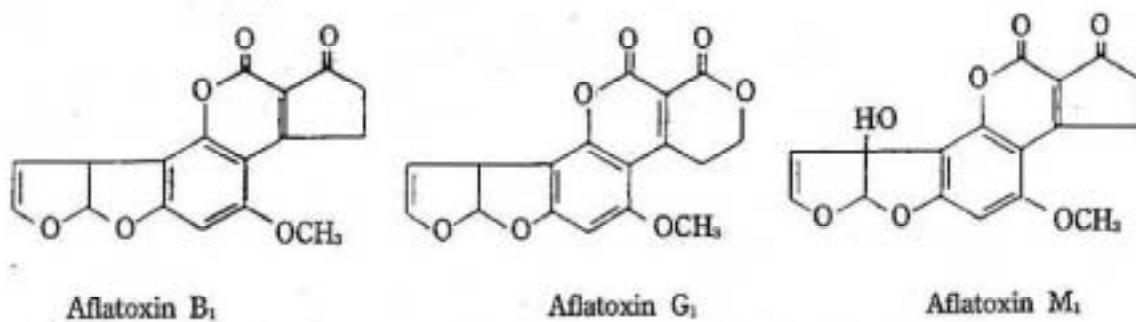


Fig. 1 Structures of Aflatoxin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>

Table 1. Chemical and physical property of Aflatoxin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>

Aflatoxin	Molecular Formular	Molecular weight	Melting point (°C)	Fluorescence under UV
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268~269	Blue
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	328	244~246	Green
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	Blue-Violet

Aflatoxin이 병변을 일으키는 主 標的 器管은 肝이며 動物에 미치는 影響으로는 肝機能

低下, 肝脂肪 變性, 肝細胞의 壞死, 黃疸, 癌發生, 動物의 成長率 低下 및 疾病에 대한 저항력 감소 등을 나타낸다.<sup>1,2,3,6</sup>

따라서 各國의 規制는 매우 엄격하며 WHO / FAO 에서는 國際的 許容基準을 Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>의 總量으로 30 $\mu$ g/kg으로 設定하고 있으며<sup>7</sup> 우리나라에서는 保健社會部 告示 第 89-19호<sup>8</sup>로 식품 중 아플라톡신 許容基準을 10 $\mu$ g/kg(B<sub>1</sub>으로서) 으로 定하고 있다.

국내에서의 Aflatoxin에 관한 연구는 Crane 등<sup>9</sup>이 韓國人의 癌發生率에 대한 臨床 實驗에서 간장과 腎臟에 Aflatoxin 존재 가능성을 示唆한 이래 여러가지 연구결과가 報告되어 있으나<sup>10, 11, 12, 13, 14, 15</sup> 國內 農産物의 汚染現況에 대한 資料가 미흡한 실태라 釜山 및 慶南 일대에서 生産, 流通되고 있는 穀類 4種과 豆類 4種을 각각 4점씩, 총 32점을 購入하여 Aflatoxin 汚染 如不을 調査하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材 料

本 研究에 사용된 試料는 國內産 農産物中 釜山, 慶南一帶에 流通 중인 穀類 4種 (쌀, 보리, 밀, 옥수수), 豆類 4種 (팥, 대두, 녹두, 땅콩)을 1990년 3월에서 8월 사이에 4회에 걸쳐 총 32점을 購入하여 公試재료로 사용하였으며 그 내용은 표 2에 나타내었다. 이 중 보리(B<sub>1</sub>~B<sub>4</sub>)와 밀(W<sub>1</sub>~W<sub>4</sub>)은 껍질을 除去 하지 않은 狀態였다.

Table 2. The kind and Number of Samples

Kinds	Number
Rice	R <sub>1</sub> -R <sub>4</sub> *
Unhulled barley	B <sub>1</sub> -B <sub>4</sub>
Unhulled wheat	W <sub>1</sub> -W <sub>4</sub>
Corn	C <sub>1</sub> -C <sub>4</sub>
Soybean	S <sub>1</sub> -S <sub>4</sub>
Redbean	E <sub>1</sub> -E <sub>4</sub>
Greenbean	G <sub>1</sub> -G <sub>4</sub>
Peanut	P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>
Total	32

- \* 1 : Purchased in Mar.
- 2 :     ◇     May
- 3 :     ◇     Jun
- 4 :     ◇     Aug.

## 2. 方 法

試驗溶液의 抽出, 精製, 定性 및 定量은 보사부 고시 제 89-75호, 아플라톡신 잠정허용기준 시험법<sup>10)</sup>에 준하여 行하였다.

### 1) 試藥 및 試液

Aflatoxin 標準原額 및 標準溶液-Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub>는 Sigma Chemical Co. 에서 구입한 후 각 10mg을 달아서 벤젠:아세트니트릴 (98 : 2) 混液에 각각 녹여 정확히 100 ml로 하여 각 標準原額을 調製하여 알루미늄 박으로 싸서 냉장고에 보존하여 두고 標準原液 1ml 씩을 分取하여 정확히 100ml로 하여 標準溶液으로 사용하였다.

TLC plate-Merck계 Art. 5553 Kieselgel 60 (20×20 cm, layer thickness 0.2mm)를 구입하여 110℃에서 60분간 加熱하여 活性化시킨 후 사용하였다.

칼럼크로마토그래피용 silicagel-wakogel C-200을 구입하여 110℃에서 60분간 加熱하여 活性化시킨 후 放冷한 다음 Decicator에 保管하여 두고 24시간 이내에 사용하였다.

### 2) 試驗溶液의 抽出

試料를 粉碎하여 50g을 秤量하여 분쇄칼대기에 넣고 메탄올 200ml를 가하여 5분간 攪拌, 抽出한후 混合物를 즉시 濾過하여 濾液 100ml를 분쇄칼대기에 옮겨 1% NaCl용액 100ml를 넣어 섞고 hexan 100ml를 넣어 진탕한 후 hexan층은 버리고 메탄올/물층에 클로로포름 50 ml를 넣어 앞의 操作을 反復한 후 클로로포름층을 흡하여 무수황산나트륨으로 脫水하고 Rotary evaporator를 사용하여 20ml로 減壓濃縮하였다. 抽出過程은 그림 2에 要約하여 나타내었다.

### 3) 試驗溶液의 精製

크로마토그래피용 칼럼(22×500mm)에 무수황산나트륨 약 5g을 넣고 클로로포름을 칼럼 높이의 약 반까지 채운 후 실리카겔 10g을 천천히 넣고 소량의 클로로포름으로 씻은 후 그 위에 무수황산나트륨 10g을 넣고 클로로포름이 무수황산나트륨의 上層에 약간 남을 때까지 流出시켰다. 이 칼럼에 2)의 抽出液를 넣어 溶媒를 거의 흘려보낸 후 hexan 150ml, 그 다음에 에틸 150ml를 흘려보내 칼럼을 씻고 계속해서 클로로포름/에탄올 혼액 (97 : 3) 200ml를 약 10~15ml/min. 의 速度로 흘려보내어 Aflatoxin을 溶出시켜 그 溶出液은 Rotary

evaporator로 濃縮乾固 하였다.

精製過程은 그림3에 要約하여 나타내었다.

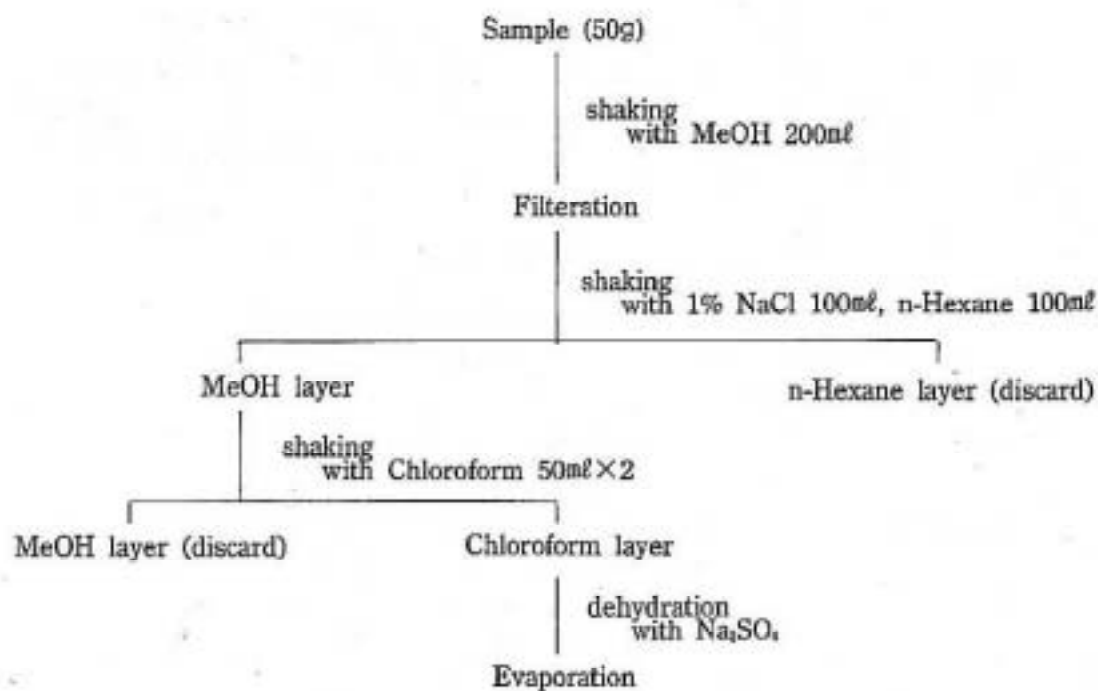


Fig. 2 Extraction of Analysis Solution from Sample

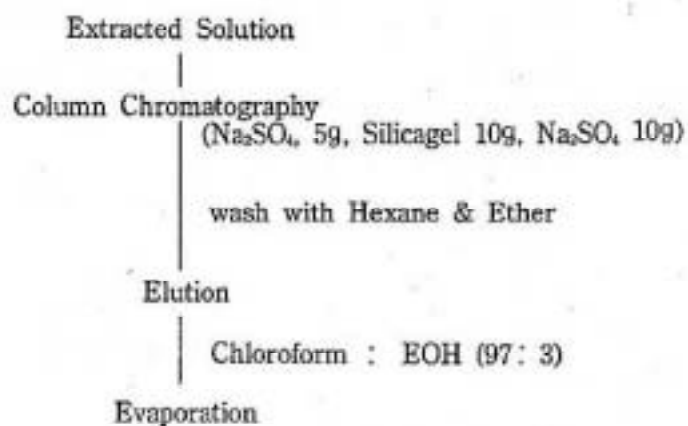


Fig. 3 Clean-Up of Extracted solution from Sample

#### 4) TLC에 의한 Aflatoxin의定性

3)의濃縮乾固物에 0.5ml의 벤젠 / 아세토니트릴혼액 (98 : 2)을 넣어 마개를 하여 심하게 흔들어서 완전히 녹여 TLC plate 下端에서 2cm의 곳을 原線으로 하여 5~20 $\mu$ l씩 spot하고 1cm 간격으로 아플라톡신 標準溶液 2~20 $\mu$ l씩을 spot한 다음 클로로포름 / 아세톤 혼액 (9 : 1)을 展開溶媒로하여 미리 包和한 展開槽에서 약 10cm정도 展開하고 TLC plate의 溶媒를 揮散시킨 후 紫外線(365nm)을 照射하여 TLC plate 상의 아플라톡신 標準溶液과 試驗溶液의 螢光 및 Rf 値를 比較하였다. 이 과정은 그림 4에 要約하여 나타내었다.

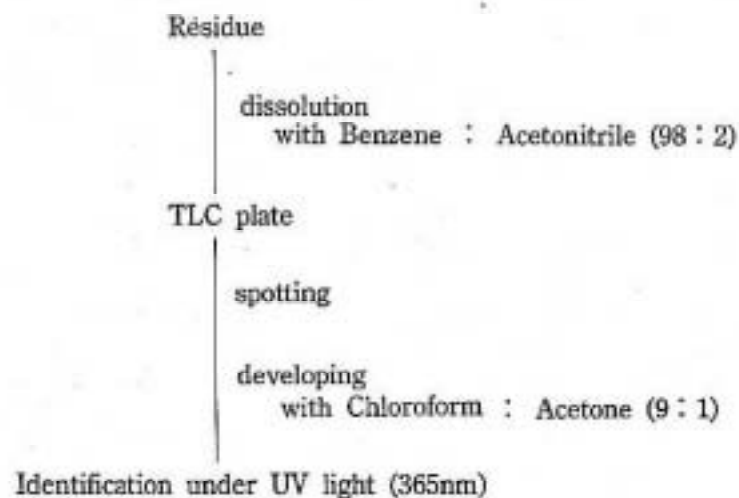


Fig. 4 Identification of Aflatoxin in the Extracted solution from Sample

#### 5) 液體크로마토그래피(HPLC)에 의한 Aflatoxin의 定性 및 定量

##### (가) 檢量線의 作成

아플라톡신 標準溶液 5ml 씩을 取하여 벤젠 / 아세토니트릴 혼액 (98 : 2)으로 精確히 100ml로 하고 이 중 5ml를 취하여 窒素가스로 溶媒를 완전히 留去시킨 후 Trifluoroacetic acid (TEA) 0.1ml를 가하여 Vortex로 1분간 섞고 다시 아세토니트릴 / 물 (1 : 1) 4ml를 넣어 Vortex로 1분간 섞은 후 이 混液에 아세토니트릴 / 물 (1 : 1) 용액을 가하여 5ml로 한 후 Membrane filter로 濾過하여 HPLC에 injection하여 檢量線을 작성하였다.

##### (나) 定性 및 定量

3)의濃縮乾固物을 (가)의 試驗方法에 따라 트리플루오로 아세틸화하여 HPLC에 injection 하였으며 分析時 器機의 條件은 표 3과 같다.

Table 3. Analytical condition of HPLC for Aflatoxin analysis

Model	Waters Associates 440
Column	$\mu$ -Bondapak C18
Detector	Fluorescence detector 420-AC
Wave Length	EX. 365nm, EM.418nm
Gain	8X
Flow Rate	1ml/min.
Mobile Phase	H <sub>2</sub> O : Acetonitrile (3 : 1)

### III. 結果 및 考察

#### 1. TLC에 의한 Aflatoxin의 定性

本 試驗 方法에 의한 Aflatoxin 標準溶液의 전개 結果는 그림 5에 나타난 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 Aflatoxin B<sub>1</sub>의 R<sub>f</sub> 値는 약 0.66, B<sub>2</sub>는 0.52, G<sub>1</sub>은 0.39, G<sub>2</sub>는 0.33 이었다.

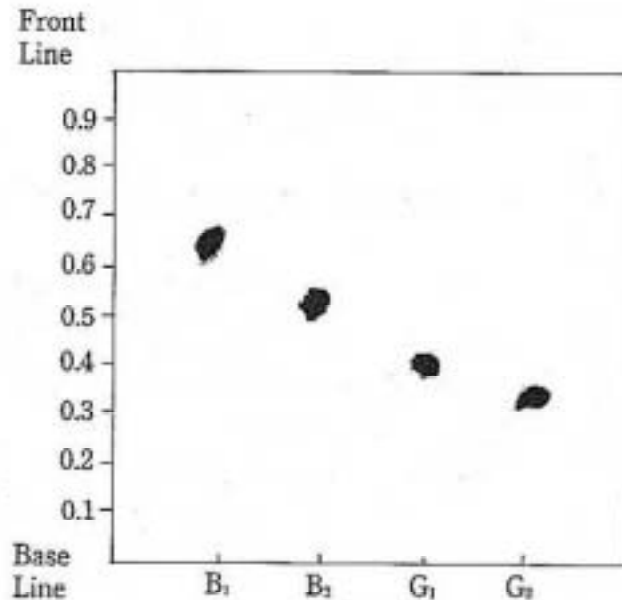


Fig. 5 Thin Layer Chromatogram of Standard Aflatoxins

試料 32점을 전개시킨 結果는 쌀(R<sub>1</sub>~R<sub>4</sub>), 보리(B<sub>1</sub>~B<sub>4</sub>), 옥수수(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>), 대두(S<sub>1</sub>~S<sub>4</sub>), 팥(E<sub>1</sub>~E<sub>4</sub>), 녹두(G<sub>1</sub>~G<sub>4</sub>), 땅콩(P<sub>1</sub>~P<sub>4</sub>) 및 밀 3점(W<sub>1</sub>~W<sub>3</sub>) 에서는 전혀 螢光物質이 檢出되지 않았으며 밀 한점(W<sub>4</sub>) 에서 3가지의 螢光物質이 檢出되었다. 試料 W<sub>4</sub>의 전개 結果는 그림 6에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 標準 Aflatoxin B<sub>1</sub>과 거의 같은 Rf 値에 같은 色照의 螢光 반점이 있었고 標準 Aflatoxin G<sub>1</sub>와 같은 Rf 値에 같은 色照의 螢光 반점이 있었으며 Rf 値 0.45의 위치에 未確認 螢光物質이 發現 되었다.

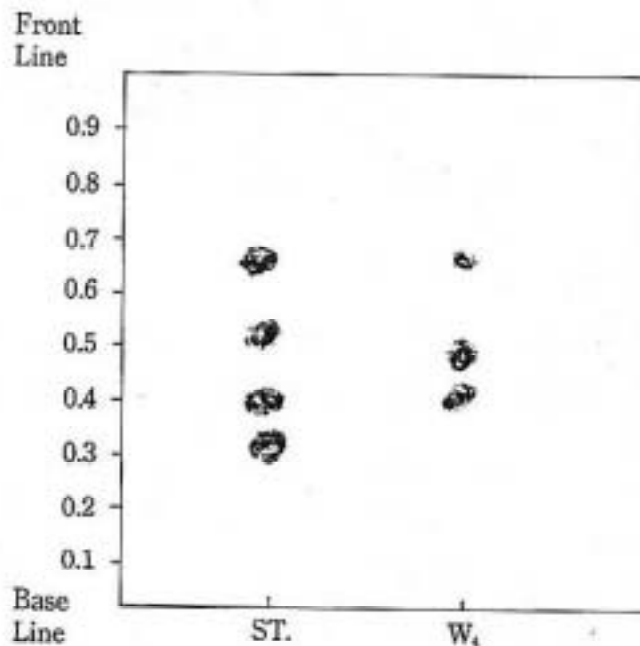


Fig. 6 Thin Layer Chromatogram of Fluorescent Substances from W<sub>4</sub>

李 등<sup>10)</sup>은 TLC상의 Rf 値가 類似한 螢光物質을 발견하였으나 紫外線 吸收 Spectrum이 Aflatoxin 標準品과 일치하지 않았다고 보고 한 바 있고 姜 등<sup>11)</sup>은 제대식편장을 2차원 전개시켜 Rf 値가 類似한 螢光物質을 檢出하였으나 그 揮發性으로 보아 된장중에 존재하는 含N 物質로서 揮發性이며 螢光을 가지는 amine類로 推定하였다. 그러나 本 試驗에서 檢出된 未確認 螢光物質은 곰팡이 菌株에 의해 生産된 物質로 思料되나 그 物理化學的 性質, 毒性與否 등은 確認할 수 없었으며 앞으로 더 많은 研究가 있어야 할 것이다.

## 2. HPLC에 의한 Aflatoxin의 定性 및 定量

HPLC를 이용한 標準 Aflatoxin의 檢量曲線은 그림 7과 같고 HPLC chromatogram은



그림 8과 같다.

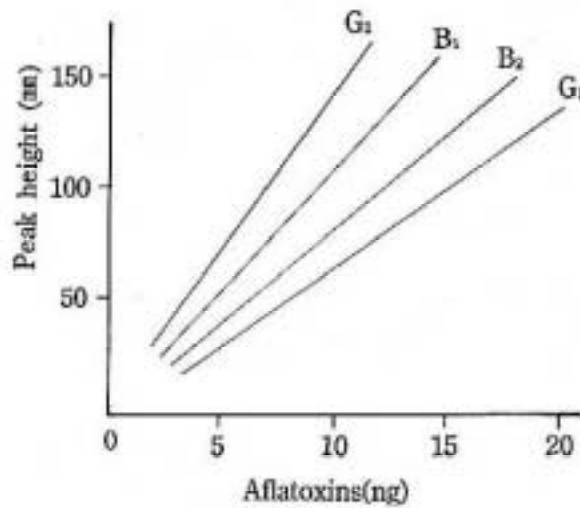


Fig. 7 Calibration curve for quantitative analysis of Aflatoxins

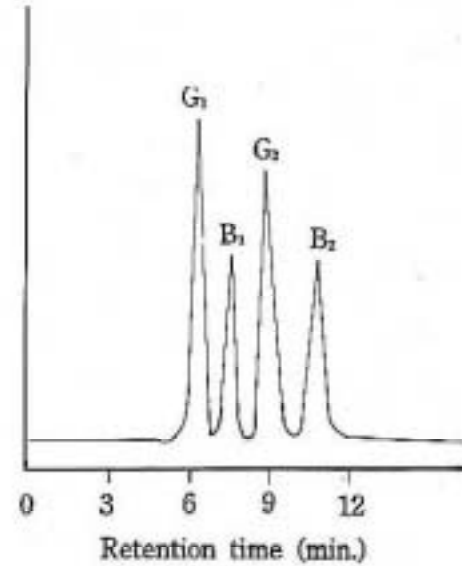


Fig. 8 HPLC chromatogram of standard Aflatoxins

試料 32점의 HPLC 分析結果는 TLC에 의한 定性 結果와 마찬가지로 쌀(R<sub>1</sub>~R<sub>4</sub>) 보리(B<sub>1</sub>~B<sub>4</sub>), 옥수수(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>), 대두(S<sub>1</sub>~S<sub>4</sub>), 팥(E<sub>1</sub>~E<sub>4</sub>), 녹두(G<sub>1</sub>~G<sub>4</sub>), 땅콩(P<sub>1</sub>~P<sub>4</sub>) 및 밀 3점(W<sub>1</sub>~W<sub>3</sub>)에서는 Retention time이 일치하는 Peak가 나타나지 않았으며 試料 W<sub>1</sub>의 HPLC Chromatogram은 그림 9에 나타내었다. 그림9에서 보는 바와 같이 標準 Aflatoxin B<sub>1</sub>과 같은 Retention time에서 약간의 흔적이 나타났으며 標準 Aflatoxin G<sub>1</sub>과 같은 Retention time의 peak 定量値는 1.3μg/kg이었다.

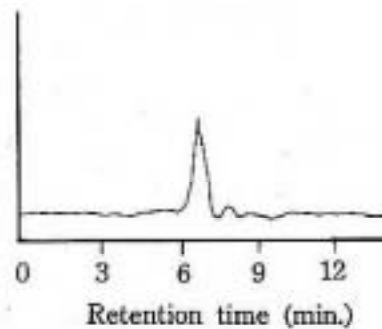


Fig. 9 HPLC chromatogram of W<sub>1</sub>

32점의 試料을 추출, 정제하여 TLC와 HPLC를 이용하여 分析한 結果를 요약하여 표 4에 나타내었다.

Table 4. The result of Aflatoxin analysis for samples

Sample No.	Aflatoxin				Unidentified fluorescent substance
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	
R <sub>1</sub> ~R <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
B <sub>1</sub> ~B <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
W <sub>1</sub> ~W <sub>3</sub>	-	-	-	-	-
W <sub>4</sub>	+(trace)	-	+(1.3μg/kg)	-	+
C <sub>1</sub> ~C <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
S <sub>1</sub> ~S <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
E <sub>1</sub> ~E <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
G <sub>1</sub> ~G <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
P <sub>1</sub> ~P <sub>4</sub>	-	-	-	-	-

Trace is less than 0.1μg/kg.

표4에서 보는 바와같이 총 32점의 試料중 밑 1점(W<sub>4</sub>)에서 Aflatoxin B<sub>1</sub>은 흔적정도, Aflatoxin G<sub>1</sub>은 1.3μg/kg 檢出되었으며, Aflatoxin 標準物質과 Rf 值가 다른 未確認 螢光物質이 檢出되었다. W<sub>4</sub>는 표 2에 나타낸 바와 같이 껌질을 그대로 지닌 알곡이며 購入한 時期가 夏節期인 점 등 Aflatoxin 生産菌株의 汚染, 生長에 적절한 조건 하에 방치되어 있는 것으로 보이며, 또한 2種類의 Aflatoxin과 1種의 未確認 螢光物質이 檢出된 점으로 미루어 보아, 좀 더 많은 菌學的 研究가 따라야 하겠지만 대체로 2種 이상의 곰팡이 菌株에 汚染된 것으로 推定할 수 있어 夏節期 農産物 貯藏에 더 많은 指導, 啓蒙이 있어야 할 것으로 생각된다.

한편 정 등<sup>18)</sup>은 총 342種의 嶺南地方 農産物 試料에서 螢光性 物質을 生成하는 29개의 菌株를 分離하였고, 전체 試料의 1.3%가 Aflatoxin 生成菌에 汚染되어 있었으며 이들은 모두 *Asp. flavus* group에 속하는 것으로 推定하였다. 또 정 등<sup>18)</sup>은 嶺南地方 쌀65종, 보리 116종의 Aflatoxin B<sub>1</sub> 汚染與否를 ELISA법으로 檢索하여 전체 試料의 3.9%가 Aflatoxin B<sub>1</sub>에 汚染되었다고 報告하였다. 정 등의 研究報告와 本 調査研究의 結果로 볼때 釜山, 慶南一帶의 農産物은 대체로 1~3%의 Aflatoxin 汚染度를 나타내고 있으나 그 量은 基準值에 미치지 못하였다. 그러나 Aflatoxin의 猛毒性에 비추어 볼때 무시할 정도는 아니며, 穀物

水분을 14%이하로 유지하고 자주 通氣시키는 등 특히 夏節期의 보관에 유의하여야 할 것이다. 그리고 本 研究에서 다루지는 않았으나 Aflatoxin M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>의 基準도 新設하여 國民 健康 保護에 만전을 기하여야 할 것으로 思料된다.

#### IV. 要 約

釜山, 慶南一帶의 쌀, 보리, 밀, 옥수수, 대두, 팥, 녹두, 땅콩 등을 각 4점씩 總 32점을 1990년 3월에서 8월 사이에 購入하여 Aflatoxin 汚染 與否를 調査한 結果 밀 1종에서 Aflatoxin B<sub>1</sub> 흔적, Aflatoxin G<sub>1</sub> 1.3 $\mu$ g/kg, 未確認 螢光物質 등이 檢出되었으며 그 量은 基準值 以下였다.

#### 參 考 文 獻

1. John Doull, M.D., Curtis D. Klassen, Mary O. Amdur : "Casarett and doull's Toxycology" 2nd edition, Macmillan Publishing Co., New York (1989).
2. 李宰求, 丁鍾甲 : 『食品衛生學』 서울; 高文社 (1989).
3. Ernest Hodgson, Patricia E. Levi : "A Textbook of Mordern Toxycology" Elsevier Science Publishing Co., New York (1987).
4. Wogan, G.W. : "Mycotoxins" Ann. Rev. Pharmacol. 15, 437 (1975).
5. Susan Budavari, Edi. : "The Merk Index" 11th edition, Merk & Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A. (1989).
6. A.S. Arafa, R.J. Bloomer, H.R. Wilson, C.F. Simpson and R.H. Harms : "Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxin" British Poultry Science, 22, 431~436 (1981).
7. 金錫赫, 朴成用, 黃正善 : 『輸入食品 標示制度의 改善方案』 서울; 韓國 消費者 保護院 (1989).
8. 保健社會部 : "保健社會部 告示 第 89-19號. 6) 식품중 아플라톡신 含量허용기준" 保社部 食品 31150-006362 (89. 5. 17).
9. Crane, p.s., S.U. Rhee, and D.J. Sheel : "Experience with 1079 cases of cancer of the stomach seen in Korea from 1960 to 1968" Amer. J. Surgery, 120, 751 (1970).
10. 高春明, 崔泰周, 柳駿 : "각 種 食品중의 有毒性 真菌에 關한 研究" Kor. J. Microbiol. 11 : 63~68 (1973)

11. 金容華, 皇甫丁淑, 李瑞來 : “몇가지 韓國 食品중 Aflatoxin의 檢出” Kor. J. Food Sci. Technol., 9 : 73~80 (1977).
12. 沈明子 : “韓國 醱酵食品중 Aflatoxin 含有에 關하여” 延大婦學, 3 : 32~35 (1969).
13. 李宇鎮, 曹惠鉉 : “韓國 在來式 간장의 醱酵 微生物에 關한 研究” J. Korean Agricultural Chemical Society, 14 : 137~148 (1971).
14. 吳有珍, 李雄洙 : “韓國産 在來式 메주중의 Mycotoxins에 關한 研究” 忠北大學校 論文輯, 第 23輯, 323~334 (1982).
15. 吳有珍, 李雄洙 : “韓國産 在來式 메주중의 Mitcotoxins에 關한 研究” 忠北大學校 論文輯, 第 24輯, 381~393 (1983).
16. 保健社會部 : “保健社會部 告示 第 89-75號, 13. 아플라톡신 잠정허용기준 시험법” 保社部 食品 31150-016769 (89. 12. 29).
17. 李寬寧, 李瑞來 : “國內의 變質米에서 分離된 *Aspergillus flavus*群의 Aflatoxin 生成能” Kor. J. Food Sci. Technol., 6 : 169~176 (1974).
18. 姜信珠, 崔明淑 : “韓國産 在來式 된장의 Aflatoxin 有無의 檢索” 慶北大學校 教育大學院 論文輯, Vol.17, 147~157 (1985).
19. 정덕화, 강호조, 하기수, 김성영, James J. Pestka : “嶺南地方 農産物에 對한 衛生學的 研究(第 1報) -Aflatoxin 生成菌의 分離-” Kor. J. Food Hygien 4(3) 165~170 (1989).
20. 정덕화, 하기수, 정혜경, 김동술, James J. Pestka : “嶺南地方 農産物에 對한 衛生學的 研究(第 2報) -ELISA법에 의한 Aflatoxin B<sub>1</sub> 檢索-” Kor. J. Food Hygien 4(3) 171~176 (1989).