J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 3, pp. 214~221 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

HPLC를 이용한 사료 중 Deoxynivalenol, Zearalenone의 분석과 오염도 조사

김동호* · 최규일 · 홍경숙 · 김현정 · 송영진 · 강승훈 · 장한섭 · 조현정 · 한계수
국립농산물품질관리원 시험연구소

Analysis and Survey for Contamination of Deoxynivalenol and Zearalenone in Feed by High Performance Liquid Chromatography

Dong-Ho Kim*, Kyu-Il Choi, Kyung-Suk Hong, Hyun-Jung Kim, Han-Sub Jang, Hyun-Jung Cho, and Gye-Su Han
National Agricultural Products Quality Management Service, Seoul Korea
(Received May 17, 2011/Revised June 21, 2011/Accepted July 9, 2011)

ABSTRACT - Deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) are mainly contaminated mycotoxins in feeds. The study was carried out to analyze and survey the contamination of DON and ZEN in one hundred thirteen samples of feeds. After cleaning all samples with immunoaffinity column, the mycotoxins were analysed by using high performance liquid chromatography/fluorescence with diode array detector (HPLC /FLD with DAD). The average recoveries of DON were 88.76 and 95.40% at the levels of 200 and 1,000 μg/kg and 87.09 and 98.40% of ZEN were recovered at the levels of 100 and 500 μg/kg, respectively. The limit of detection (LOD) were 6.0 and 3.0 μg/kg for DON and ZEN, respectively. The average concentrations of DON were 372.1, 324.0 and 990.9 μg/kg in chicken, pig and cattle feed, respectively. Those of ZEN were 76.1, 43.7 and 196.2 μg/kg for them, individually.

Key words: Mycotoxin, feed, deoxynivalenol, zearalenone

곰팡이독소(mycotoxin)는 곰팡이에 의해서 발생되는 2차 대사산물이다[1,8,18-19]. 수많은 곰팡이 유래 2차 대사산물에 대한 연구가 이루어져 현재까지 아플라톡신(Aflatoxin, AFs), 오크라톡신(Ochratoxin A, OTA), 푸모니신(Fumonisin, FUM), 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON), 제랄레논(Zearalenone, ZEN) 등 약 400여종의 곰팡이독소가 밝혀 졌다[3,8]. 곰팡이독소는 곡류, 두류, 서류 같은 농작물에서 생산, 수확, 저장 과정 중 주로 발생하고, 열에 매우 안정하여 가공과정에서도 잘 파괴되지 않는다.

사료는 옥수수, 보리 등 곡류와 옥수수글루텐, 단백피, 대두박 등 곡류 부산물을 주원료로 만들어진다. 일반적으로 식품이나 식품가공용보다 저급한 원료를 사용하게 되기 때문에 곰팡이독소에 노출될 우려가 크다. 또한, 최근 기후온난화로 식물의 생산 환경이 곰팡이가 번식하기 좋은 고온다습한 조건으로 변화되고 있고, 옥수수 등 곡물의 에너지화에 따른 가격 상승으로 곰팡이독소에 오염된 농산물이 식품 및 사료 원료로 사용될 가능성이 높아지고 있다. 이러한 환경속에서 독소에 오염된 사료를 소, 닭, 돼지 등의 가축들이 섭취하게 되면 각종 질병 유발, 생산량 감소 등을 일으키게 된다. 또한 이러한 가축에 의해 생산된 축산물을 인간이 소비하게 될 때 인간의 건강을 위협하는 요인이 된다.

따라서, 세계 각국은 이러한 곰팡이독소에 대하여 그 관리를 강화하고 있는 추세이며, EU나 CODEX에서도 공통된 규격을 도출하고자 계속하여 노력하고 있다[18]. 우리나라도 사료관리법과 식품위생법에 따라 주요 곰팡이독소에 대하여 최대기준을 설정하여 관리하고 있는 상태이다.

DON과 ZEN은 *Fusarium. graminearum*과 *F. culmorum*과 같은 7~8종의 곰팡이에 의해서 생산되는 독소이며, 일반적으로 밀, 보리 옥수수 같은 곡류에서 주로 발생하고, 푸모니신, 니발레놀 등 다른 푸사리움 독소(*Fusarium* toxins)들과 같이 발생하는 경향이 있다[1,21]. DON에 노출되면 식욕감퇴, 사료거부, 구토 증상 등이 나타나게 되며 결국 증체량 감소로 이어진다[1,9,20]. 낮은 농도에서는 사료섭취 감소 같은 증상이 유발하는 반면 높은 농도에서는 구토 같은 증상이 유발된다. 돼지가 이러한 영향에 대하여 가장 민감하게 작용하는 것으로 알려져 있다[1,22]. ZEN은 포유류에서 에스트로겐 리셉터(oestrogen receptor) 로 작용하여 생식력 저하 등 고에스트로겐증(hyperoestrogenism)을 나타내게 된다[19,21]. 암퇘지는 동물들 중에서 가장 민감한 것으로 생각

*Correspondence to: Dong-Ho Kim, 560. 3-Ga, Dangsan-Dong, Youngdeungpo-Gu, Seoul, Korea
Tel: 82-2-2165-6140, Fax: 82-2-2165-6008
E-mail: anoldmu@naqs.go.kr

되며, 소나 닭은 돼지에 비하여 제랄레논에 대한 반응성이 적다고 할 수 있다[1].

이러한 독소들의 분석을 위하여 대부분 고출상추출(Solid Phase Extraction SPE)나 면역친화컬럼(ImmunoAffinity Column, IAC)를 이용한 정제를 하게 되며, GC, GC/MS, LC/UV, LC/FLD, LC/MS/MS 등을 이용하는 방법들이 있다[19,22]. ELISA는 일반적으로 매우 감도가 좋으나, 동시에 결과의 불확실성이 다소 높은 경향이 있다[19]. 이러한 다양한 분석법에도 불구하고, 사료에서는 아직 공인분석법이 마련되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 HPLC를 이용한 사료 중 DON과 ZEN 분석법을 정립·검증하여 표준분석법으로 활용하고자 하였다. 비록, 수용성인 DON과 지용성인 ZEN의 물질특성 때문에 전처리를 동시에 할 수는 없었으나, 기기분석 조건은 동일한 방법을 사용하여 분석효율을 증대시키고자 하였다. 또한, 동 분석법을 이용하여 사료 중 곰팡이독소 오염도 조사를 실시하였으며, 사료에서 매우 높은 오염도를 보인 2009년도 조사결과와 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

시료

모두 113점의 사료를 시료로 사용하였다. 배합사료의 경우 닭사료, 돼지사료, 소사료를 사육단계에 따라 각각 30점씩 준비하였다. 단미사료의 경우 총 23점을 시료로 사용하였다.

시약

표준물질은 sigma사의 DON (200 μg/kg, 2 mL and 5 mg, USA), ZEN (200 μg/kg, 2 mL and 5 mg, USA)을 사용하였으며, 전처리용 시약은 sigma사의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4, USA), 인산(phosporic acid, 85%, USA), merck사의 HPLC급 acetonitrile (ACN, 4 L, Germany)와 methanol (MeOH, 4 L, Germany)을 사용하였다. 정제용 면역 칼럼은 R-Biopharm사의 immunoaffinity column인 DONPREP (50/box, Sweden), EASY ZEARALENONE(50/box, Sweden)을 사용하였다.

표준용액

200 μg/mL 농도의 DON, ZEN 상용표준물질을 ACN으로 희석하여 각각 10 μg/mL와 5 μg/mL가 되도록 하였다. 각각의 액에서 0.1 mL를 취한 후 증류수(distilled water, DW) 0.8 mL와 혼합하여 가장 고농도의 표준물질을 만들었다. 이 액 500 ul와 20% ACN 500 ul를 정확히 분취하여 섞은 후, 다시 이 혼합액의 200, 100 ul와 희석액 800과 900 ul를 각각 혼합하여 나머지 표준용액을 조제하였다. 최종 검량선 작성 용액의 농도는 DON과 ZEN이 각각 50, 100, 500, 1,000 μg/L 와 25, 50, 250, 500 μg/L이었다.

기기 및 장치

DON, ZEN의 HPLC 정량분석을 위하여 agilent 1100 series (G1322 degasser, G1312A quaternary pump, binary pump, G1313A autosampler, G1316A column oven, G1321A fluorescence detector) 를 사용하였다. 시료 분쇄 및 추출을 위하여 시료분쇄기(perten, Sweden), homogenizer (OMNI, USA)를 사용하였으며, 농축을 위하여 질소농축기(창명, KOR)를 사용하였다. 기타장비로는 화학천칭(sartorius, USA), 원심분리기(한일, Korea), 시험관 교반기, vacuum system (agilent, USA), Mili-Q RiOs/Elix water purification system (Millipore, USA) 등을 사용하였다.

실험방법

전처리

데옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON)

잘 분쇄된 시료 20 g에 DW 100 mL를 넣고, homogenizer를 10,000 rpm으로 2분간 회전하여 DON을 추출하였다. 여과지(Whatman No. 4)를 이용하여 추출액을 여과한 후 여과액 3 mL을 취하여 immunoaffinity column에 유속이 2~3 mL/min되도록 통과 시켰다. 5 mL DW로 column을 세척한 후

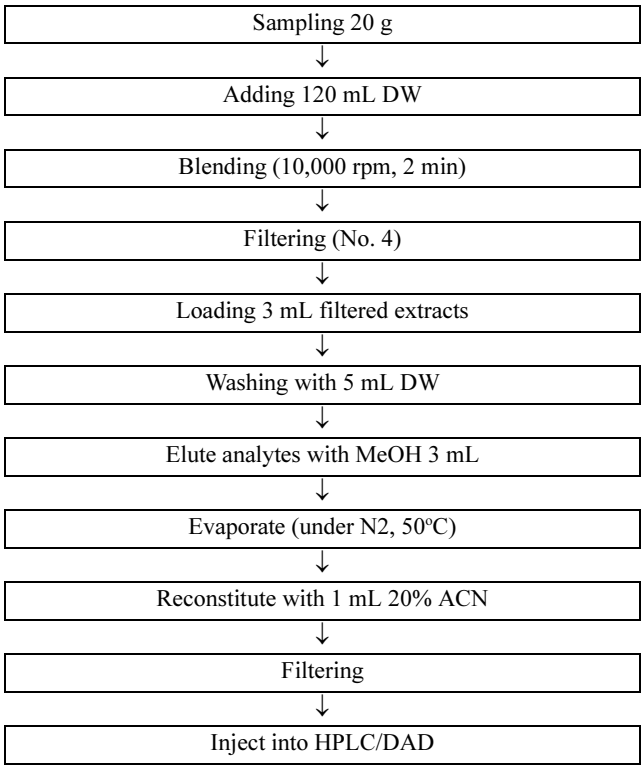

Fig. 1. Flow sheet for DON analysis.

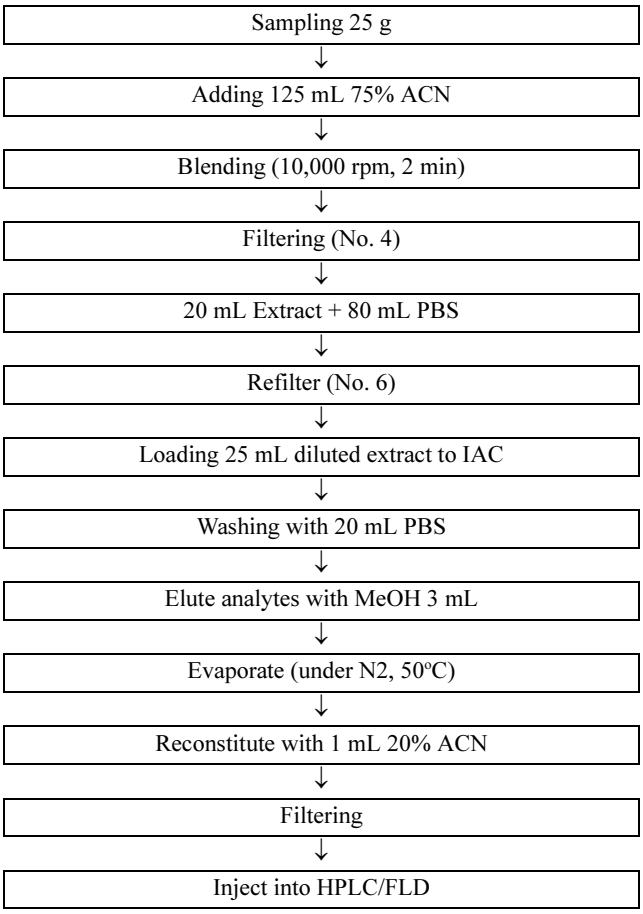

Fig. 2. Flow sheet for ZEN analysis.

3 mL MeOH로 backflushing을 3회 실시하면서 중력에 의해 DON을 용출시켰다. 이어서, 이 액을 50°C에서 질소로 건고시켰으며, ACN:DW = 20:80 1 mL로 다시 녹여 시액으로 사용하였다. 분석흐름도는 Fig. 1과 같다.

제랄레논(Zearalenone, ZEN)

잘 분쇄된 시료 25 g에 추출액(ACN:DW = 75:25) 125 mL를 넣고, homoginizer를 10,000 rpm으로 2분간 회전하여 ZEN을 추출하였다. 여과지(Whatman No. 4)를 이용하여 추출액을 여과한 후 20 mL을 취하여 80 mL의 PBS 액과 혼합하였다. 이 혼합액을 다시 한번 여과하고 그 중 25 mL을 immunoaffinity column에 유속이 2~3 mL/min되도록 통과 시켰다. 20 mL PBS 액으로 column을 세척한 후 3 mL MeOH로 backflushing을 3회 실시하면서 중력에 의해 ZEN을 용출시켰다. 이어서, 이 액을 50°C에서 질소로 건고시켰으며, ACN:DW = 20:80 1 mL로 다시 녹여 시액으로 사용하였다. 분석흐름도는 Fig. 2과 같다.

기기 분석 조건

DON과 ZEN 분석을 위하여 ZORBAX 80Å Extend-C18 column (reversed-phased column, 4.6 × 250 mm, 5 μm)과 guard column (C18, 5 μm)을 사용하였고, 30°C에서 20분간 분석하였다. ACN과 DW를 이동상으로 하여 구배조건(gradient)을 사용하였고(Table 1), 유속은 1.0 mL/min로 설정하였다. 주입량은 50 μl로 하였으며, DON과 ZEN의 분석을 위하여 흡광검출기(diode array detector, DAD, 220 nm)와 형광검출기(fluorescence detector, FLD, Ex = 275 nm, Em = 450 nm)를 각각 사용하였다. 이때 DON의 머무름 시간은 대략 6.7분 정도이었으며, ZEN의 머무름 시간은 대략 14분 정도이었다. DON과 ZEN의 분석 시 이동상을 달리하여 따로 따로 단성분 분석할 수도 있다. 이때 DON은 이동상조건을 85% 혹은 88% ACN으로 하여 분석시간을 10분 정도로 하여 분석할 수 있다. 이때 많은 양의 시료를 분석할 때에는 컬럼에 오염물질이 충분히 제거될 수 있도록 하는 조치가 필요하다. ZEN은 60% ACN을 이동상 조건으로 하여 분석하는 등 필요에 따라 다양한 조건으로 분석가능하다. 본 실험에서는 DON과 ZEN의 동시분석법을 사용하였으며, 전체 분석시간이 20분이며 또한 기기의 autosampler기능을 사용했을 때 DON 시료와 ZEN 시료의 일정량을 취하여 혼합한 후 한번에 분석가능하도록 기기조건을 설정할 수 있다. 비록 전처리방법이 같지 않아 완전한 동시분석법은 아니나 하나의 분석조건으로 두 성분을 분석하고, 자연스럽게 컬럼세척을 할수 있으며, 위에서 설명하였듯이 두 시료를 동시에 분석할 수도 있는 장점이 있다.

이동상조건과 크로마토그램은 다음과 같다.

Table 1. Conditions of mobile phase

Time	A (DW)	B (ACN)
0	88	12
6	88	12
10	20	80
14	20	80
16	88	12
20	88	12

회수율 실험

DON과 ZEN의 회수율 실험을 위하여 독소가 오염되지

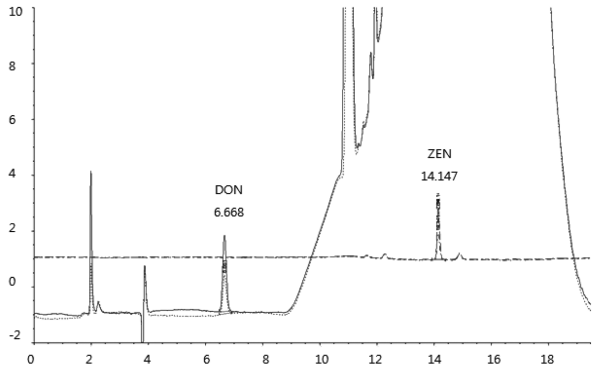

Fig. 3. Chromatogram of STD (DON: 1,000 μg/kg, ZEN: 500 μg/kg).

않은 시료가 필요하나, 일반배합사료에서는 그러한 사료를 찾기가 힘들다. 그래서 비교적 오염이 덜 된 닭사료를 선정하여 5회분석하여 평균을 구했다. 이 시료에 DON 과 ZEN 을 각각 200과 1,000, 100과 500 μg/kg 수준이 되도록 표준물질을 가한 후 앞의 방법에 따라 5회 반복하여 측정하였다. 나중에 측정값에서 blank값을 뺀 후 회수율 계산에 사용하였다.

검출한계 및 정량한계 측정

DON과 ZEN의 검출한계는 signal/noise (S/N) 비율이 3:1 기준으로 측정하였으며 정량한계는 S/N 비율이 10:1 기준으로 측정하였다.

검량과 계산

준비된 표준용액을 HPLC에 주입하여, DAD와 FLD로 검출하였고, 각각의 농도에 따른 피크의 면적을 그래프로 계산함으로써 검량선을 작성하였다.

결 과

분석법 검증

DON과 ZEN의 검량선 작성을 위하여 각각의 표준품을 50, 100, 500, 1,000 μg/L과 25, 50, 250, 500 μg/L의 농도로 희석하여 사용하였다. 각각의 독소 양에 대한 peak 의 면적으로 검량선을 작성하였으며(Fig. 4), 검량식은 DON과 ZEN이 각각 $y = 0.0714x + 0.1282$와 $y = 0.053x + 0.035$이었다. 결정계수(R^2)는 모두 0.9999 이었다.

DON의 회수율은 200과 1000 μg/kg 수준에서 95.4와 88.8% 이었으며, 상대표준편차(%RSD)는 4.0과 1.4%이었다. ZEN은 100과 500 μg/kg 수준에서 회수율과 상대표준편차(%RSD)가 각각 87.1과 98.4%, 9.1과 2.8%로 나타났다.

자세한 결과는 Table 2와 같다.

피크의 넓이가 S/N = 3일때를 기준으로 검출한계를 설정하였고 S/N = 10일때를 기준으로 정량한계를 설정하였다. DON의 경우 정성한계 6.0 μg/kg, 정량한계 20.0 μg/kg 이었다. ZEN은 각각 3.0 μg/kg 과 10.0 μg/kg 의 검출, 정량한계를 나타내었다.

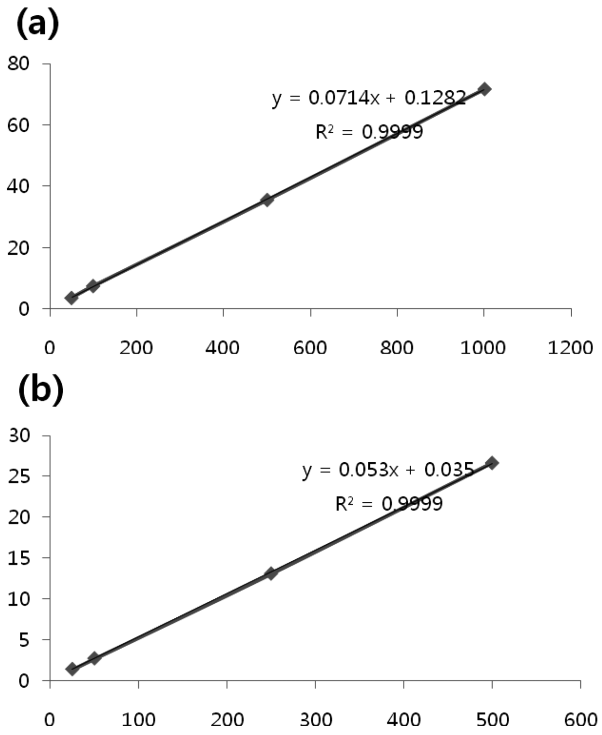

Fig. 4. Calibration curve (a: DON, b: ZEN).

Table 2. Accuracy and precision of DON and ZEN determined in fortified feed at two concentrations

Toxins	Level (μg/kg)	Average recovery (%)	Results(μg/kg) ± SD	%RSD
DON (n=3)	200	95.4	190.8 ± 7.7	4.0
	1000	88.8	887.6 ± 12.4	1.4
ZEN (n=3)	100	87.1	87.1 ± 7.9	9.1
	500	98.4	492.0 ± 13.8	2.8

오염도 조사 결과

배합사료

닭사료의 경우 2009년도에 DON과 ZEN이 평균 212.3과 31.2 μg/kg의 오염 수준을 보인 것에 비하여[1] 2010년에는 372.1과 76.1 μg/kg으로 거의 2배정도의 오염정도를 나타내었다. 세계 곡물가 상승에 따라2010년도가 전년도에 비하

Table 3. Incidence and levels of mycotoxins in compound feed

Toxin	Feed	Sample number		Average(μg/kg)		Maxium(μg/kg)		Contamination rate(%)	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
DON	Chicken	40	30	212.3	372.1	908.0	938.7	100	100
	Pig	40	30	207.8	324.0	1566.0	1128.8	100	100
	Cattle	60	30	812.1	990.9	2940.0	1941.2	100	100
ZEN	Chicken	40	30	31.2	76.1	141.8	556.6	100	100
	Pig	40	30	35.6	43.7	262.0	175.8	100	100
	Cattle	60	30	147.2	196.2	558.0	608.0	100	100

여 저급의 원료가 사용되고 있음을 예측할 수 있었으며, 역시 모든 시료에서 오염이 확인되었다. 돼지사료의 경우 2009년도에 DON과 ZEN이 평균 207.8과 35.6 μg/kg의 오염수준을 보인것에 비하여 2010년에는 324.0과 43.7 μg/kg의 오염수준을 나타내어 닭사료와 비슷한 경향을 나타내었다. 소사료의 경우 2009년도에 DON과 ZEN이 각각 812.1과 147.2 μg/kg의 오염상태를 보인것에 비하여 2010년에는 평균990.9과 196.2 μg/kg으로 역시 닭사료나 돼지사료처럼 2010년도의 유통사료가 전년도에 비하여 상대적으로 높은 곰팡이독소 오염도를 나타내었다. 자세한 분석결과는 Table 3과 같다.

소사료

총 30점의 소사료에 대하여 오염도 조사를 실시하였다. 사료의 종류에 따라서 9종으로 구분하여 분석을 실시하였다. 임신우사료와 비임신우사료와의 오염도 관계, 비육용사료와 젖소용사료와의 독소 오염도 관계를 살펴보았다. 2009년도에는 임신우사료에서 다소 높은 값을 나타내었으나[1], 2010년에는 반대로 더 낮은 분석값을 나타내어, 어떤 상관관계를 찾을 수 없었다. 젖소용사료가 두 해 모두 비육용 사료에 비하여 낮은 수치의 독소가 확인되었으며, 미국 등 일부국가에서 비육용 사료와 젖소 사료를 구분하여 허용기준치를 설정하고 있는 점을 주목하여야 한다. 가장 높은 오염도를 나타낸 그룹은 큰소비육전기용사료로써 DON과 ZEN이 평균 1598.9와 471.4 μg/kg으로 2009년의 687.9와 104.2 μg/kg와 비교하여 볼 때 상당히 높은 값을 나타내었다. 자세한 조사결과는 Table 4와 같다.

돼지사료

돼지사료의 경우 임신돼지용 사료에서 DON이 486.0 μg/

Table 4. Incidence and levels of mycotoxins in cattle feed

Toxin	Feed	Sample number		Average (μg/kg)		Maxium (μg/kg)		Contamination rate (%)	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
DON	Beef cattle, pregnant	14	7	1173.5	914.4	2940.0	1941.2	100	100
	Dairy cow, pregnant	-	3	-	749.7	-	914.3	-	100
	Cattle, fatting, early	9	2	687.9	1598.9	1504.0	1769.1	100	100
	Cattle, fatting, middle	-	3	-	1121.7	-	1941.2	-	100
	Cattle, fatting, last	9	4	1020.5	1004.8	2840.0	1696.5	100	100
	Dairy cow, early	10	2	445.8	735.6	1294.0	851.4	100	100
	Dairy cow, middle	5	2	851.2	1093.5	1296.0	1346.3	100	100
	Dairy calf, middle	4	3	446.2	1078.0	1104.0	1502.7	100	100
	Dairy calf, last	4	4	991.0	724.7	2420.0	1030.9	100	100
ZEN	Beef cattle, pregnant	14	7	223.1	160.6	558.0	559.4	100	100
	Dairy cow, pregnant	-	3	-	122.1	-	185.7	-	100
	Cattle, fatting, early	9	2	104.2	471.4	179.4	608.0	100	100
	Cattle, fatting, middle	-	3	-	223.4	-	353.3	-	100
	Cattle, fatting, last	9	4	212.0	191.8	478.0	332.6	100	100
	Dairy cow, early	10	2	72.1	114.6	149.8	122.0	100	100
	Dairy cow, middle	5	2	166.6	297.0	193.8	480.2	100	100
	Dairy calf, middle	4	3	79.0	231.2	159.6	397.6	100	100
	Dairy calf, last	4	4	118.7	124.6	142.4	225.3	100	100

Table 5. Incidence and levels of mycotoxins in pig feed

Toxin	Feed	Sample number		Average (μg/kg)		Maxium (μg/kg)		Contamination rate(%)	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
DON	Pregnant	10	10	364.9	486.0	1566.0	1128.8	100	100
	Fatting, early	5	5	156.0	234.5	472.0	359.4	100	100
	Fatting, last	5	5	227.5	267.4	366.0	487.1	100	100
	Piglet over 5 kg	5	5	139.7	288.1	360.0	383.0	100	100
	Lactating	5	5	251.2	182.1	556.0	268.9	100	100
ZEN	Pregnant	10	10	56.7	42.3	262.0	57.7	100	100
	Fatting, early	5	5	28.4	32.6	79.6	50.5	100	100
	Fatting, last	5	5	41.1	90.0	63.0	175.8	100	100
	Piglet over 5 kg	5	5	24.3	21.0	68.0	25.7	100	100
	Lactating	5	5	44.1	76.0	81.4	175.8	100	100

kg로 가장 높은 오염수치를 나타내었다. 나머지 사료들은 182.1~288.1 μg/kg으로 임신돼지와는 상당한 차이를 보였다. ZEN은 육성돈후기용사료, 포유돼지용사료, 임신돼지용사료 순으로 오염되어 있었다. 임신돼지사료의 경우 DON과 ZEN의 평균 합이 500 μg/kg가 넘고, DON이 최대 1128.8 μg/kg의 수치를 보이는 시료도 확인되었다.

닭사료

닭사료의 경우도 Table 6에서 보듯이 전년도에 비하여 2010년도에 상대적으로 높은 수준의 오염도를 나타내었다. DON은 2009년도에 산란용 사료에서 207.9~437.6 μg/kg의 오염수준을 보인데 비하여 2010년에는 427.5~485.5 μg/kg 정도의 오염수준을 나타내었다. 육계사료에서는 육계전기용 사료의 경우 2009년도에 116.0 μg/kg의 오염도를 보인데 비하여 2010년도에 361.1 μg/kg로 3배정도 높은 오염도를 보였다. 육계후기용사료는 188.6과 186.3 μg/kg으로 비슷한 오염정도를 나타내였다. ZEN의 경우도 DON과 마찬가지로 2010년도 사료에서 높은 오염수치를 나타내었으며, 특히 산란초기사료에서 높았다.

사료 종류에 따라서는 산란용 사료가 육계사료보다 더 높은 곰팡이독소 오염도를 나타내었다. 두 해 모두 2배 정도 산란용 사료가 더 높은 결과를 나타내었으며, DON이 938.7 μg/kg, ZEN이 556.6 μg/kg로 동시에 높게 검출되는 시료도 확인되었다.

단미사료

옥수수의 경우 2009년에 DON과 ZEN이 평균 70.1과 9.2 μg/kg의 오염수준을 나타내었고, 2010년에는 각각 224.6과 77.8 μg/kg의 오염수준을 나타내어 상대적으로 전년보다 독소 오염이 심한 옥수수가 사료원료로 사용됐음을 확인할 수 있었다. 단백피의 경우 2009년도에 DON과 ZEN이 각각 4551.1과 812.1 μg/kg의 평균오염 수준을 나타낸데 비하여 이번에는 3150.4와 308.5 μg/kg의 오염수준을 나타내었다. 역시 항상 높은 오염도를 나타내고 있었으나, ZEN은

Table 6. Incidence and levels of mycotoxins in chicken feed

Toxin	Feed	Sample number		Average (μg/kg)		Maxium (μg/kg)		Contamination rate(%)	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
DON	Chick, laying, young	3	3	207.9	427.5	314.0	560.3	100	100
	Chick, laying, middle	4	7	403.5	485.5	908.0	724.1	100	100
	Laying, early	5	6	437.6	441.3	664.0	938.7	100	100
	Fatting, early	12	7	116.0	361.1	220.0	610.9	100	100
	Fatting, last	12	7	188.6	186.5	304.0	234.6	100	100
	breeding	4	-	102.5	-	119.2	-	100	-
ZEN	Chick, laying, young	3	3	23.3	67.3	56.0	117.4	100	100
	Chick, laying, middle	4	7	39.0	63.6	65.6	118.1	100	100
	Laying, early	5	6	93.7	150.0	141.8	556.6	100	100
	Fatting, early	12	7	20.7	72.2	66.8	184.3	100	100
	Fatting, last	12	7	23.4	33.0	45.4	46.0	100	100
	breeding	4	-	6.2	-	8.2	-	100	-

Table 7. Incidence and levels of mycotoxins in components

Toxin	Feed	Sample number		Average (μg/kg)		Maxium (μg/kg)		Contamination rate(%)	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
DON	Corn	7	4*	70.1	224.6	214.0	329.8	85.7	100
	Corn gluten feed	9	5**	4551.1	3150.4	8480.0	5541.2	100	100
	Corn germs meal	4	4	350.3	37.8	656.0	209.8	100	100
	Corn gluten	10	5	69.3	207.3	170.8	1184.8	100	60
	Distillers grains	2	5	335.0	721.5	670.0	2881.6	50	60
	(Corn distillers grains)	(-)	(3)	(-)	(2405.0)	(-)	(2881.6)	(-)	(100)
ZEN	Corn	7	4*	9.2	77.8	25.2	277.3	100	100
	Corn gluten feed	9	5**	812.2	308.5	1072.0	519.7	100	100
	Corn germs meal	4	4	455.2	116.9	872.0	187.2	100	100
	Corn gluten	10	5	75.2	510.8	284.0	1329.9	100	100
	Distillers grains	2	5	95.4	163.1	190.8	374.0	50	80
	(Corn distillers grains)	(-)	(3)	(-)	(264.4)	(-)	(374.0)	(-)	(100)

*:Imported from USA
**:Imported from china

2009년에 비하여 상당히 낮은 수치를 나타내었다. 이것은 두 해 모두 중국산 수입 단백피이었음에도 불구하고, 2009년도에는 독소 고오염배합사료 제조회사에서 직접 수거한 단백피 시료이었고[1], 2010년도에 사용한 시료는 사료검정을 위하여 각 지방자치 단체에서 무작위로 수거된 시료이기 때문인 것으로 생각된다.

2009년도의 경우 옥수수와 단백피와의 독소 오염 수준이 현격히 차이가 나기 때문에 옥수수에 오염되어 있던 독소가 단백피로 농축되어 고농도의 독소 오염 단백피가 생성된다고 판단하기에 그 근거가 부족하였으나, 2010년의 경우 옥수수에서 Table 7과 같은 오염도를 보임에 따라 단백피의 독소오염을 설명할 수 있다.

옥수수글루텐의 경우 2009년에 DON과 ZEN이 평균 69.3와 75.2 μg/kg의 오염수준을 나타내었으며, 2010년도에는 207.3와 510.8 μg/kg의 오염 수준을 나타내어 역시 2010년도에 더 높은 오염도를 나타내었다. 또한 대부분의 시료에서 DON이 ZEN보다 높은 오염도를 보이는 것이 일반적인데 옥수수글루텐에서는 ZEN이 DON보다 상당히 높게 검출되었다. 옥수수배아박은 2009년도에 DON과 ZEN이 69.3과 75.2 μg/kg, 2010년에 37.8과 116.9 μg/kg의 수치를 보였으며, 옥수수글루텐과 마찬가지로 ZEN이 DON보다 높은 값을 나타내었다[1]. 주정박의 경우 원료별로 구분하여 5점을 분석하였다. 그 결과 현미 등 다른 곡류를 이용한 주정박에서는 독소가 검출되지 않거나 아주 낮은 수준으로 검출되는 반면에 옥수수주정박에서는 DON과 ZEN이 각각 2,405.03과 264.42 μg/kg의 평균오염도를 나타내었다. 각각의 단미사료에 대한 자세한 분석결과는 Table 7과 같다.

고 찰

2009년도에 이어 2010년도에 사료 중 곰팡이독소 오염도 조사를 계속하였다. 곰팡이독소 중 2009년도에 많이 오염된 것으로 확인된 DON과 ZEN에 대하여 오염도 조사를 계속하였으며, 사료관리법에 유해물질로 지정될 것에 대비하여 공정법으로 사용할 수 있는 분석법을 정립하고 검증하였다.

면역친화컬럼(IAC)을 이용하여 정제하였으며, HPLC/DAD와 FLD로 분석하였다. 비록 정제방법이 다르나, 같은 기기조건으로 분석할 수 있도록 하여 DON과 ZEN을 동시에 분석하여야 할 경우 편리하게 이용할 수 있도록 하였다.

오염도 조사결과 닭사료, 돼지사료, 소사료에서 DON과 ZEN이 각각 372.1, 324.0, 990.9 μg/kg와 76.1, 43.7, 196.2 μg/kg의 평균오염도를 나타내었다.

닭이나 돼지사료의 경우 산란계나 임신돼지용에서 보다 높은 독소 오염을 나타냄에 따라 산란과 계란으로의 전이, 임신 및 출산에 미치는 영향 등에 대하여 자세히 살펴볼 필요가 있다. 소사료는 다른 축종에 비하여 보통 2~3배 높은 수준으로 검출되고 있으나, 푸사리움 독소의 감수성은 돼지에서 가장 높고, 외국(EU, 미국, 캐나다, 일본)의 DON 관리기준(돼지사료: 1,000 μg/kg, 소사료와 닭사료: 5,000 μg/kg)이나 ZEN 관리기준(돼지사료: 250 μg/kg, 소사료: 500~1,000 μg/kg)과 비교하여 볼 때 위험한 수준은 아니었다. 그러나, 이러한 결과는 2009년도의 분석값과 비교했을 때 상당히 높은 수준으로, 2010년도에 곰팡이독소가 많이 오염된 저급농산물이 사료원료로 사용되었다고 생각할 수 있었다.

또한, 이러한 배합사료의 오염은 대부분 옥수수와 그 부산물로 만들어지는 단미사료에 기인하는 것으로 단백피, 옥수수배아박, 옥수수주정박 등이 주요한 오염원임을 확인할 수 있었다.

이러한 곰팡이독소에 대하여 우리 나라를 포함한 세계 각국은 계속해서 그 관리를 강화해 나가고 있는 추세이나 아직 관련자료는 충분치 않으며, 소비자들은 항상 곰팡이독소 노출의 위험에 빠져 있다. 따라서 다양한 시료 및 독소에 대한 광범위한 오염실태조사 및 독성평가, 분석법 개발 등 다각적인 연구를 통하여 사료 및 식품에 대한 안전성을 확보하여야 할 것이다.

요 약

2010년 유통사료 113점에 대하여 곰팡이독소 오염도 조사를 실시하였다.

면역친화컬럼(IAC)을 이용하여 각각 정제하였으며, HPLC/DAD와 FLD를 연결하여 동시분석하였다. DON은 200과 1,000 μg/kg수준에서 각각 95.40과 88.76%의 회수율과 4.03과 1.40%의 상대표준편차(%RSD)를 나타내었다. ZEN은 100과 500 μg/kg 수준에서 각각 87.09과 98.40%의 회수율과 9.01과 2.81%의 상대표준편차(%RSD)를 나타내었다.

배합사료인 닭사료, 돼지사료, 소사료에서 DON과 ZEN이 각각 372.1, 324.0, 990.9 μg/kg와 76.1, 43.7, 196.2 μg/kg의 평균오염도를 보여 2009년도 조사결과보다 높은 오염수준을 나타내었다. 옥수수, 단백피, 주정박, 옥수수배아박, 옥수수글루텐에서는 DON과 ZEN이 각각 224.6, 3150.4, 721.5, 37.8, 207.3 μg/kg와 77.8, 308.5, 163.1, 116.9, 510.8 μg/kg로 나타남에 따라 역시 배합사료에 곰팡이독소를 오염시키는 주 원인물질로 확인되었다.

참고문헌

1. Kim, D.H., Kim, H.J., Jang H.S., Kim, Y.M., Choi, H.B., Ahn, J.S.: Simultaneous Analysis and Contamination of Nivalenol, Deoxynivalenol, T-2 toxin and Zearalenone in Feed. *J. Fd Hyg. Safety*, **26**(1), 1-11 (2011).
2. Ahn, J., Kim, D., Kim, H., Jahng, K.Y.: Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam.*, **27**(12), 1674-82 (2010).

3. Kim, D.H., Jang, H.S., Kim, Y.M., Ahn, J.S.: Survey for Contamination and Study for Reduction of Ochratoxin A and Aflatoxin in Red Pepper. *J. Fd Hyg. Safety*, **24**(4), 299-306 (2009).
4. Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C., Dumoulin F., Van De Velde M., Schoeters E., Van Dyck S., Averkieva O., Van Peteghem C., De Saeger S.: Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem*., **58**, 66-71 (2010).
5. Chiara, C., Patrizia, F., Elisabetta, P., Roberto, S., Aldo, L.: Development of a multiresidue method for analysis of major Fusarium mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **19**, 2085-2093 (2005).
6. Michael, S., Franz, B., Rudolf, K., Rainer, S.: Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **20**, 2649-2659 (2006).
7. Driehuis, F., Spanjer, MC., Scholten, JM., te Giffel, MC.: Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J. Dairy Sci*., **91**(11), 4261-71 (2008).
8. Monbaliu, S., Van Poucke, C., Van Peteghem, C., Van Poucke, K., Heungens, K., De Saeger, S.: Development of a multimycotoxin liquid chromatograph/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Commun. Mass Spetrom*., **23**, 3-11 (2009).
9. Klötzel, M., Lauber, U., Humpf, HU.: A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS. *Mol. Nutr. Food Res*., **50**, 261-269 (2006).
10. Lattanzio, VM., Solfrizzo, M., Powers, S., Visconti, A.: Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **21**, 3253-3261 (2007).
11. Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K.: Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol. Nutr. Food Res*., **51**, 1547-1553 (2007).
12. Scudamore, KA., Patel, S.: Occurrence of Fusarium mycotoxins in maize imported into the UK, 2004-2007. *Food Addit. Contam.*, **26**(3), 363-71 (2009).
13. Cigić, IK., Prosen, H.: An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci*., **10**(1), 62-115 (2009).
14. Frenich, AG., Martínez Vidal, JL., Romero-González, R., Aguilera-Luiz, MM.: Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem*., **117**(4), 705-712 (2009).
15. Veronica, MT., Michelangelo, P., Angelo, V.: Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends Analyt. Chem*., **28**(6), 758-768 (2009).
16. Pérez-Torrado, E., Blesaa, J., Moltóa, JC., Font, G.: Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for determination of zearalenone in cereal flours. *Food Cont*., **21**(4), 399-402 (2009).
17. Kim, JC., Kang, HJ., Lee, DH., Lee, YW., Yoshizawa, T.: Natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Appl. Environ. Microbiol*., **59**(11), 3798-3802 (1993).
18. Wang, Y., Chai, T., Lu, G., Quan, C., Duan, H., Yao, M., Zucker, BA., Schlenker, G.: Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environ. Res.*, **107**(2), 139-44 (2008).
19. Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, 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**(1-2), 48-64 (2006).
20. Sugita-Konsihi, Y., Tanaka, T., Tabata, S., Nakajima, M., Nouno, M., Nakaie, Y., Chonan, T., Aoyagi, M., Kibune, N., Mizuno, K., Ishikuro, E., Kanamaru, N., Minamisawa, M., Aita, N., Kushiro, M., Tanaka, K., Takatori, K.: Validation of an HPLC analytical method coupled to a multifunctional clean-up column for the determination of deoxynivalenol. *Mycopathologia.*, **161**(4), 239-43 (2006).
21. Seeling, K., Dänicke, S., Ueberschär, KH., Lebzien, P., Flachowsky, G.: On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. *Food Addit. Contam.*, **22**(9), 847-55 (2005).
22. Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Van Egmond, HP., Schothorst, RC., Jekel, AA., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E., Flachowsky, G.: Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit. Contam.*, **23**(10), 1008-20 (2006).
23. Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krska, R.: Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*., **1062**(2), 209-16 (2005).
24. Hepworth, SJ., Hardie, LJ., Fraser, LK., Burley, VJ., Mijal, RS., Wild, CP., Azad, R., McKinney, PA., Turner, PC.: Deoxynivalenol exposure assessment in a cohort of pregnant women from Bradford, UK. *Food Addit. Contam*., 1-8 (2011).
25. Jin, PG., Han, Z., Cai, ZX., Wu, YJ., Ren, YP.: Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using $^{13}C_{15}$-deoxynivalenol as internal standard. *Food Addit. Contam*., **27**(12), 1701-13 (2010).