pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 3, pp. 194~200 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.3.194

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

LC-MS/MS를 이용한 돼지고기 중 총아플라톡신 및 오크라톡신 A 동시분석법 확립

백옥진 · 박송이 · 박기훈 · 김신희 · 서세정 · 윤혜정[1]*
식품의약품안전평가원 식품위해평가부 오염물질과, [1]식품의약품안전처 식품안전정책국 식품기준과

Simultaneous Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Pork by LC-MS/MS

Ockjin Paek, Songyi Park, Ki Hun Park, Sheen-Hee Kim, Saejung Suh, and Hae Jung Yoon[1]*
Food Contaminants Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, MFDS, 187, Osong Health Technology Administration Complex, Chungbuk 28159, Korea
[1]Food Standard Division, Food Safety Policy Bureau, MFDS, 187, Osong Health Technology Administration Complex, Chungbuk 28159, Korea
(Received March 15, 2016/Revised April 20, 2016/Accepted June 2, 2016)

ABSTRACT - Aflatoxins and ochratoxin A (AFTs and OTA) are secondary fungal metabolites produced by several moulds, mainly by *Aspergillus flavus* by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*, and these toxins can be transferred to animals and humans through the ingestion of contaminated feed and food. This study was to develop the analytical method for determination the levels of AFTs (B_1, B_2, G_1 and G_2) and OTA in pork. The AFTs and OTA were analyzed simultaneously by electrospray ionization in positive ion mode and mass reaction monitoring (MRM) after solid phase extract (SPE) columns clean-up. Performance characteristics, such as accuracy, precision, linear range, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), were also determined. Matrix-matched standard calibration was used for quantification, obtaining the recoveries in the range of 67.3~108.2% with the relative standard deviations of < 20%. Limits of detection and quantification were also estimated, obtaining the limits of quantification ranged in 0.7~1.3 μg/kg. The results of the inter-day study, which was performed with pork samples for 3 days, showed an accuracy of 92.0~109.9%. The precisions (expressed as relative standard deviation values) for the inter day variation were 2.6~17.8%. The method developed in this study was able to carry out the analysis with the satisfactory intensity and accuracy.

Key words : total aflatoxins, ochratoxin A, pork, LC-MS/MS

곰팡이가 생산하는 2차 대사산물인 곰팡이독소는 사람이나 가축에게 세포독성, 발암성, 변이유발원 등 직접적으로 병을 일으키거나 생장을 저하시킬 수 있다. *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속 및 *Fusarium* 속 곰팡이에 의해 주로 생성되며, 현재까지 약 300 여종의 곰팡이독소가 발견되었다[1,2]. 곰팡이독소는 식품 및 사료로 사용되는 원료 농산물의 생장 및 생육, 저장, 보관 그리고 유통에 이르기까지 전 과정에서 예측치 못하게 생성될 가능성이 높다[3]. 아플라톡신 B_1을 포함한 대부분의 곰팡이독소는 위해성이 크고, 열에 안정하며 조리 · 가공 후에도 잘 파괴되지 않는 특성을 가지고 있다. 아플라톡신 B_1, 오크라톡신A 등 일부 곰팡이독소들은 축산물의 조직이나 혈액에 잔존할 수 있어 이를 섭취한 사람에게 유해를 줄 수 있다. 유럽연합의 최근 발표에 따르면, 사료를 통해 오크라톡신 A는 돼지의 신장 및 간장에 축적되어지고, 오염사료를 섭취한 닭의 간장과 신장에서 오크라톡신 A이 발암성을 나타낸다고 보고하였다[4].

식생활 변화로 육류 소비량이 증가되고, 외국산 축산물 수입개방에 대응하기 위하여 품질이 우수한 축산물의 안전관리가 절실히 요구된다. 식육 및 그 가공품은 곰팡이독소의 매개체가 되어 곰팡이독소가 미량으로 잔류할 가능성이 있으며, 특히 돼지고기의 경우는 오크라톡신 A가 소고기, 양고기 등에서는 아플라톡신이 검출되었다고는 보고가 있다[5-8]. 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)가 높은 TLC (Thin Layer Chromatography), ELISA (Enzyme-

*Correspondence to: Hae Jung Yoon, Food Standard Division, Food Safety Policy Bureau, MFDS, 187, Osong Health Technology Administration Complex, Chungbuk 28159, Korea
Tel: 82-43-719-2411, Fax: 82-43-719-2400
E-mail: hjyoon@korea.kr

Linked Immunosorbent Assay), HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) 등의 기존의 방법[9-14]으론 분석의 한계가 있어, 새로운 전처리 및 질량분석기를 이용한 기기분석법 마련이 필요하다[15-16].

따라서, 본 연구는 우리나라 국민들이 많이 소비하고 있는 축산물 중 대표적인 돼지고기 중 총아플라톡신, 오크라톡신 A를 동시에 확인 및 정량할 수 있도록 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기를 이용하며 전처리 및 기기분석 조건 등을 검토하고 그 유효성을 검증하고자 한다.

Materials and Methods

실험재료

축산물 중 대표적인 돼지고기 시료는 충청북도 및 충청남도 소재 대형마트에서 2~2.5 kg을 구입하고, 구입한 돼지고기를 '식품공전 8. 검체의 채취 및 취급방법' 6. 개별검체 채취 및 취급법 (2) 정밀검사용 검체채취 방법에 따라 분쇄기(Food processor HR7625, Philips, N.V., USA)로 균질화 후 실험에 사용하였다.

시약 및 기구

본 실험에 사용된 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2 및 오크라톡신 A의 표준물질은 각각 Sigma-Aldrich (99.9%, St Louis, MO, USA), Romer (99.9%, Union, MO, USA) 및 R-Biopharm (99.9%, Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴, 메탄올은 액체크로마토그래피급(Merck, Darmstadt, Germany)의 용매를 사용하였고, 개미산은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 모든 시약은 특급용을 사용하였고, 증류수는 초순수제조기(Barnstead International, Dubuque, IA, USA)에 의해 정제된 증류수를 사용하였다. 정제에 사용된 고체상추출칼럼(Solid phase extract, SPE)는 Biotage (Isolute, 3 mL, Ystrad Mynach Hengoed, UK)를 구입하여 사용하였다.

표준용액 제조

총 아플라톡신 표준원액은 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, 및 G_2 표준물질을 각각 아세토니트릴을 가하여 100 μg/mL로 제조하고, 오크라톡신 A 표준원액은 톨루엔:아세트산 (99:1, v/v)을 넣어 100 μg/mL로 제조하였다. 아플라톡신 표준용액은 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, 및 G_2 아플라톡신 표준원액을 각각 0.1 mL 취하여 아세토니트릴을 가해 10 μg/mL를 만들었다. 오크라톡신 A 표준용액은 오크라톡신 A 표준원액 0.1 mL 취하여 질소 건고 후에 아세토니트릴 1 mL을 넣어 10 μg/mL를 만들었다. 검량선용 혼합표준용액 및 회수율 측정용 혼합표준용액은 각 아플라톡신 표준용액(0.1 μg/kg) 0.1 mL 및 오크라톡신 A 표준용액(0.1 μg/kg)을 0.2 mL를 취하여 농축 건고하고 각각 매트릭스용액 및 이동상을 넣어서 재용해 한 것을 사용하였다.

총 아플라톡신 및 오크라톡신A 분석

기기분석 방법의 최적화는 돼지고기 중의 총아플라톡신 및 오크라톡신 A를 신속하고 정확하게 정량할 수 있는 효율적인 방법을 마련하고자 돼지고기를 0.1% 개미산을 함유한 50% 아세토니트릴용액를 이용해 추출하고, 고체상추출칼럼을 이용하여 정제 후 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기로 분석하였다. 시료의 추출은 균질화 한 시료 5 g을 정밀하게 달아 0.1% 개미산을 함유한 50% 아세토니트릴용액 20 mL를 가하고 5분간 호모게나이저(OMNI-MIXER2, Kennesaw, GA, USA)를 이용해 균질화하고, 5분간 고속원심분리(3,500 rpm) 후 이를 유리섬유여과지(GF/A)로 여과한다. 여액 4 mL을 취하여 정제수 16 mL을 넣어 20 mL으로 희석한다. 회수율 측정용 시료는 검체를 분쇄하여 균질화 한 시료를 정밀히 달아 저농도는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1 표준용액(0.2 μg/mL)을 0.1 mL, 아플라톡신 G_2는 표준용액(1 μg/mL)을 0.04 mL, 오크라톡신 A는 표준용액(1 μg/mL)을 0.04 mL, 중농도는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1 표준용액(1 μg/mL)을 0.05 mL, 아플라톡신 G_2는 표준용액(1 μg/mL) 0.1 mL, 오크라톡신 A는 표준용액(1 μg/mL) 0.1 mL 고농도는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1 표준용액(1 μg/mL) 0.1 mL, 아플라톡신 G_2는 표준용액(1 μg/mL) 0.2 mL, 오크

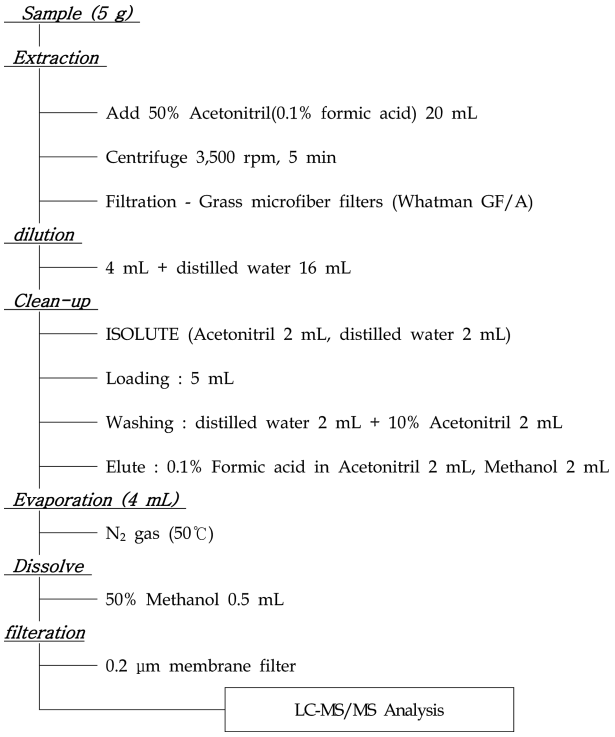

Fig. 1. Flow Chart of LC-MS/MS pre-treatment procedure for total aflatoxins and ochratoxin A in pork.

라톡신 A는 표준용액(1 μg/mL) 0.2 mL을 첨가하고 용매를 날려 보내기 위해 후드 안에서 24시간 동안 방치한다. 이후 추출과정은 시험용액 추출방법과 동일하게 처리하였다. 추출 후 정제는 아세토니트릴 2 mL, 정제수 2 mL로 활성화 시킨 고체상추출칼럼에 희석액 5 mL을 통과시킨 후 정제수 2 mL, 10% 아세토니트릴 2 mL로 세척한다. 이후 0.1% 개미산 함유 아세토니트릴 2 mL과 메탄올 2 mL을 차례대로 흘려 용출액을 합한 후, 50°C에서 질소 건고하여 0.1% 개미산함유 50% 메탄올 1 mL로 재용해한다. 이를 멤브레인 실린지 여과지(0.2 um)로 여과한 것을 시험용액으로 한다. 여과한 시험용액 5 μL을 주입하여 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기로 분석하였다(Fig. 1). 액체크로마토그래피 질량분석기/질량분석기 분석 조건으로 칼럼은 Waters Xbridge C_{18}(100 × 2.1 mm, 3.5 μm, Waters USA)을 사용하고, 칼럼 온도는 35°C로, 유속은 0.2 mL/min로 흘려주었다. 질량분석기의 spray voltage는 양이온 분석모드(positive ionization mode)로 4.0 kV, Capillary 온도는 330°C로 이온화 하였다. 곰팡이독소별 단일 표준액을 1.0 μg/mL을 사용하여 present ion 및 product ion에 대한 분석조건 및 곰팡이독소 MRM (Mass Reacting Monitoring)으로 분석하였다. 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기를 이용한 돼지고기 중 총아플라톡신 및 오크라톡신 A의 동시분석법의 유효성 검증은 오염되지 않은 돼지고기에 표준액을 첨가하여 7회 반복 측정 후, 검출한계(Limit of detection, LOD), 검량한계(Limit of Quantification, LOQ)을 구하고, matrix-matched calibration으로 검량선의 직선성(Linearity)을 산출하였다. 정밀성 및 정확성은 표준액을 첨가한 시료를 전처리방법에 따라 하루에 3번 수행하여 일내(intra-day) 및 3일간 일간(inter-day) 시험을 수행하였다.

Results and Discussion

기기분석 방법의 최적화

돼지고기 중 총아플라톡신류 및 오크라톡신 A를 동시분석하기 위해 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기를 이용하여, ESI (electrospray ionization)의 (+)이온 모드 및 MRM mode로 분석하였다. 이 때 각 곰팡이독소 성분별로 collision cell에서 collision energy를 조절하여 product ion의 response가 최대가 되도록 조정하였으며, 그 결과 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다. 또한 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량 이온(quantitation ion)으로 설정하고 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성 이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다. 총아플라톡신 및 오크라톡신 A 분석을 위한 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기의 분석조건은 Table 1과 Table 2와 같다.

Table 1. Analytical conditions of LC-MS/MS for total aflatoxins and ochratoxin A in pork

Devices	Parameters	Conditions		
HPLC	Column	Waters Xbridge C_{18} (100 × 2.1 mm, 3.5 μm)		
	Mobile Phase	(A) 0.1% formic acid in distilled water (B) 0.1% formic acid in Methanol		
		Time (min)	Mobile phase	
			A (%)	B (%)
		0	90	10
		3	90	10
		13	5	95
		13.1	90	10
		20	90	10
	Flow rate	0.2 mL/min		
	Inject volume	5 μL		
	Ion source temp.	150°C		
MS/MS	electron ionization mode	ESI (electro-spray ionization) Positive ion mode MRM mode		
		Mode	ESI positive mode (MRM)	
		Spray voltage	4.0 kV	
		Sheath gas	40	
		Aux gas	15	
		Capillary temp.	330°C	
		Collision pressure	1.5	

Table 2. The optimal transition parameters of LC-MS/MS for total aflatoxins and ochratoxin A

Compound	MW	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)a		Tube Lens (V)
			Quantitation	Confirmation	
Aflatoxin B_1	312.3	312.98 [M + H]+	285.10 (23)	115.03 (63)	156
Aflatoxin B_2	314.3	314.99 [M + H]+	287.11 (26)	259.05 (30)	167
Aflatoxin G_1	328.3	328.97 [M + H]+	243.04 (27)	215.05 (32)	168
Aflatoxin G_2	330.3	331.07 [M + H]+	245.00 (29)	189.00 (41)	116
Ochratoxin A	403.82	403.99 [M + H]+	238.98 (25)	220.94 (37)	144

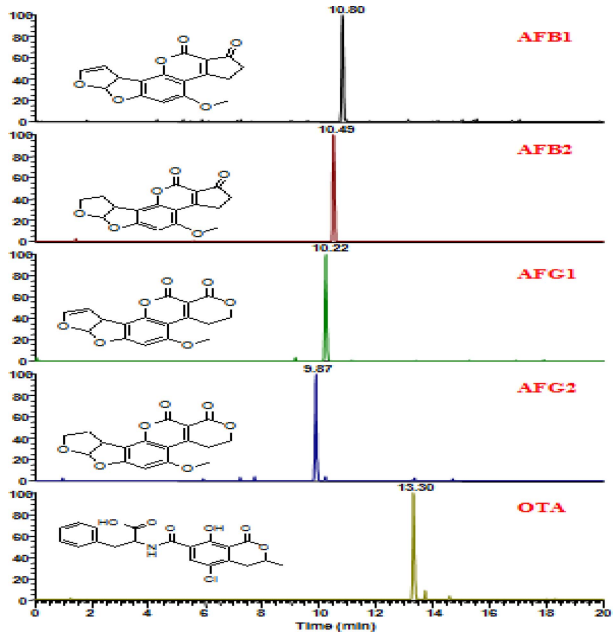

Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of standard solution at 2~10 μg/kg for total aflatoxins and ochratoxin A in pork.

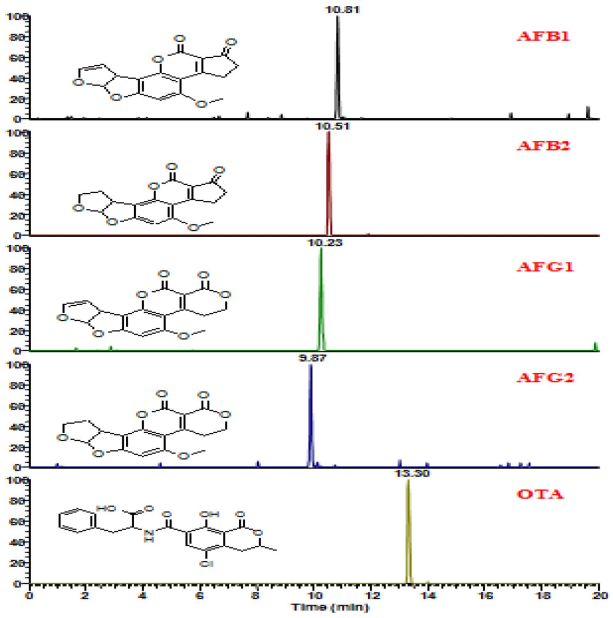

Fig. 3. LC-MS/MS chromatogram of pork spiking at 2~10 μg/kg for total aflatoxins and ochratoxin A in pork.

균질화한 돼지고기에 총아플라톡신류 및 오크라톡신 A 표준용액을 각각 10배 정량한계에 해당하는 농도를 첨가 후, 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기 시험결과를 크로마토그램 상의 각 정성이온의 피크 머무름 시간이 각 표준물질의 정성이온의 피크 머무름 시간과 아플라톡신 B_1은 10.80분, 아플라톡신 B_2은 10.48분, 아플라톡신 G_1은 10.22분, 아플라톡신 G_2 9.87분 및 오크라톡신 A는 13.30분과 일치함을 확인하였다(Fig. 2~Fig. 3).

시료량 및 정제 카트리지 비교

돼지고기는 사료 및 곡류의 구성성분과는 달리 단백질과 지방이 많아 미량으로 잔류하는 곰팡이독소를 추출 및 정제하는 데에 어려움이 예측되며 효율적 분석을 위해 시료채취량 및 정제 카트리지에 따른 차이를 비교하였다. 곰팡이독소 분석을 위한 일반적인 시료채취량인 20 g과 질량분석기의 시료 매트릭스 효과를 최소한으로 줄이기 위해 시료량 5 g을 전처리 한 후 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기로 분석한 결과를 Fig. 4와 Table 3에 나타내었다. 시료 5 g을 취한 경우 각 곰팡이독소별로 회수율이 91.98~110.87%, 시료 20 g을 전처리한 경우 98.4~109.56%로 회수율의 차이는 나타내지 않았으나, 20 g을 전처리한 경우, 크로마토그램에서 시료 매트릭스의 영향을

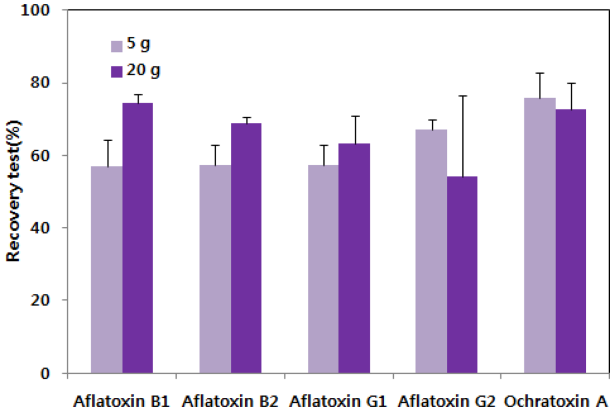

Fig. 4. LC-MS/MS chromatogram of recovery test comparison for total aflatoxins and ochratoxin A in pork.

Table 3. Recovery test (%) comparison of Sampling

Compounds	5 g		20 g	
	Recovery	RSD (%)	Recovery	RSD (%)
Aflatoxin B_1	91.98	7.21	109.56	2.42
Aflatoxin B_2	92.34	5.50	103.99	1.48
Aflatoxin G_1	92.28	5.70	98.4	7.58
Aflatoxin G_2	102.2	2.62	89.28	22.40
Ochratoxin A	109.87	6.95	107.61	7.53

RSD: Relative Standard Deviation

Table 4. Recovery test (%) comparison of purification cartridge

Compounds	CN	MAX	IAC	Isolute
Aflatoxin B_1	2.22	1.20	76.6(5.9)	77.3
Aflatoxin B_2	2.41	1.12	78.5(1.8)	90.0
Aflatoxin G_1	2.47	0.46	93.3(14.0)	108.2
Aflatoxin G_2	2.57	2.31	71.2(1.5)	107.6
Ochratoxin A	0.10	0.17	75.4(5.9)	94.7

CN : Solid Phase (Cyanopropyl) Extraction column
MAX : Strong Anion ion exchange column
IAC : Immunoaffinity column
Isolute : Solid Phase (Polymer) Extraction colum

더 받는 것으로 조사되었다. 따라서 회수율 및 시료매트릭스 영향을 고려하여 본 시험에서는 돼지고기 시료량은 5 g으로 하여 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기 분석에 사용하였다.

축산물 특히, 돼지고기에서 총 아플라톡신 및 오크라톡신 A를 추출하고 정제하기 위한 카트리지는 총아플라톡신 및 오클라톡신 A 동시 정제용 면역친화성칼럼 및 고체상추출카트리지로 -CN, 음이온성교환수지, 고분자 곰팡이독소용 카트리지를 사용하여 비교하였다. 회수율을 비교한 결과 고체상 카트리지인 -CN 및 음이온성교환수지 카트리지의 경우는 곰팡이독소의 회수율이 3%이하로, 면역친화성칼럼의 회수율은 71.2~93.3%, 고분자고체상추출칼럼의 회수율이 77.3~108.2%로 나타내었다(Table 4). 이는 대부분의 기기분석 시에 사용되는 면역친화성칼럼에 비해 유기 용매량 및 칼럼 유지시간과 고분자고체상추출칼럼이 경제성 및 편이성을 고려할 때 시료에서 곰팡이독소를 추출하여 정제하는 카트리지로 적합하다[17].

곰팡이독소 동시시험법 유효성 검증

현재까지 총아플라톡신 및 오크라톡신 A 동시분석은 기준규격이 설정되어있는 고춧가루, 백미 등 농산물을 대상으로 액체크로마토그래피로 연구되어졌으나[9,18], 이 방법은 검출기의 파장 및 이동상의 기울기 용리 변경으로 오크라톡신A의 검출감도가 좋지 않은 결과를 나타낸다. 본 연구의 액체크로마토그래피-질량분석기/질량분석기를 이용한 방법은 5종의 곰팡이독소 정성과 정량을 위한 전처리 및 분석이 동시에 가능한 방법으로 돼지고기 시료에 정량한계 10배의 표준액을 첨가하여 분석한 회수율이 총아플라톡신은 74.1 ± 22.7 ~ 109.3 ± 13.1%, 오크라톡신 A는 88.1 ± 7.2%를 나타내었다. 회수율 및 상대표준편차는 유럽연합 규정의 총아플라톡신 및 오크라톡신 A의 회수율 및 상대표준편차에 대한 기준을 만족하였다.

Table 5. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of total aflatoxins and ochratoxin A

Compounds	Matrix limit of detection (limit of quantification), μg/Kg					
	Pork		Beef		Chicken	
Aflatoxin B_1	0.7	(2.0)	0.7	(2.0)	0.7	(2.0)
Aflatoxin B_2	0.7	(2.0)	0.7	(2.0)	0.7	(2.0)
Aflatoxin G_1	0.7	(2.0)	0.7	(2.0)	0.7	(2.0)
Aflatoxin G_2	1.3	(4.0)	1.3	(4.0)	1.3	(4.0)
Ochratoxin A	1.3	(4.0)	1.3	(4.0)	1.3	(4.0)

LOD = 3.3(δ/S), LOQ = 10.3(δ/S),
δ : Standard deviation of the response, S : slope of the calibration curves

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

정량한계 2배의 곰팡이독소 표준물질을 첨가한 돼지고기 시료 7개를 전처리하여 총아플라톡신 및 오크라톡신A를 분석한 후 결과 값들의 표준편차 및 검량곡선의 기울기를 이용하여 검출한계와 정량한계를 구하였다. 검출한계는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1은 0.7 μg/kg, 아플라톡신 G_2와 오크라톡신 A는 1.3 μg/kg으로 정량한계는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1은 2.0 μg/kg, 아플라톡신 G_2와 오크라톡신 A는 4.0 μg/kg으로 각각 나타내었다(Table 5). 국내 축산물에 대한 곰팡이독소 기준 및 규격은 우유류, 조제우유와 영유아 조제식 등 특수용도 식품 중 유성분을 함유한 제품 대하여 아플라톡신 M_1이 설정·운영되고 있다. 제외국의 경우, 이태리에서 돼지고기 및 그 가공품에 대하여 오크라톡신이 1 ng/g 가이드라인으로, 루마니아에서는 모든 식품에 대하여 5 ng/g, 스웨덴에서 돼지고기에 대해 100 ng/g으로 최대허용기준치를 규정하여 운영하고 있다[19]. 본 연구에서 개발된 시험법으로는 제외국 오크라톡신 A의 기준·규격을 모두 만족할 만한 수준이었다. 기존의 스크리닝 방법으로 사용되는 TLC 및 ELISA 시험법의 경우는 정량성이 떨어지며, 검출될 경우 확인 시험이 필요하고, 액체크로마토그래피 방법은 아플라톡신의 경우는 유도체화가 필요하며, 오크라톡신 A와 동시분석이 어려운 단점이 있다[20].

직선성(Linearity)

LC-MS/MS를 이용하여 돼지고기 중 5종의 곰팡이독소 분석 시 돼지고기 바탕시료의 매트릭스의 영향을 최소화하기 위해 matrix-matched 검량선을 사용하였다. 아플라톡

신 B_1, B_2, G_1은 0.5~10 ng/mL, 아플라톡신 G_2 및 오크라톡신 A는 0.5~20 ng/mL의 농도로 표준곡선을 작성한 결과, 5종 곰팡이독소 모두 검량곡선의 상관계수(R^2)가 0.998 이상으로서 양호한 직선성을 나타내었다(Table 5). 매트릭스 효과(Matric-Suppression/Enhancement Effect)는 용매에 녹인 표준액 검량선과 matrix-matched 검량선의 기울기를 이용한 다음 식에 의해 구하여 본 결과 총 아플라톡신류는 17.6~39.1%로 매트릭스 이온강화 효과를 나타내고, 오크라톡신 A의 경우는 −62.56%의 매트릭스 이온 억제효과를 나타내었다(Table 5).

MSE (Matrix Suppression/Enhancement effect) = $100 \times (Slope_M / Slope_S - 1)\%$

$Slope_M$: the slopes of matrix-matched calibration curves

$Slope_S$: the slopes of solvent-only calibration curves

선택성(Selectivity)

5종의 곰팡이독소가 오염되지 않은 바탕시료를 전처리한 용액과 표준용액을 첨가하여 전처리한 용액의 크로마토그램을 비교해 보면 머무름 시간이 일치하고 다른 어떤 방해 피이크가 없음을 확인하였다. 고체상추출칼럼으로 정제한 후 액체크로마토그래피법을 이용하여 돼지고기 중 총아플라톡신류 및 오크라톡신 A를 분석하기에 선택성 및 분리도가 좋음을 알 수 있었다(Fig. 2~Fig. 3).

정확성과 정밀성(Accuracy and Precision)

돼지고기 바탕시료에 5종의 곰팡이독소 혼합표준용액을 3개의 농도(정량한계 2배, 5배, 10배)를 각각 첨가하고 전처리하여 분석하였다. 3일 동안 반복하여 정밀성과 정확성을 확인한 결과 각 3개 농도의 회수율은 아플라톡신 B_1은 72.1~92.0%, 아플라톡신 B_2은 85.0~92.3%, 아플라톡신 G_1은 92.3~100.0%, 아플라톡신 G_2은 91.0~102.2%, 오크라톡신 A의 경우는 88.6~109.8%를 나타내었다. 한편 EU에서 제시하는 회수율 기준인 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2 70~110%, 오크라톡신 A 70~110%를 만족하며, 3회 반복에 의한 상대표준편차(Relative Standard Deviation)가 최대 18.4% (RSDr)로 나타내 EU 가이드라인의 $RSD_R \leq 30\%$에 적합하였다(Table 6).

유통 돼지고기의 총아플라톡신 및 오크라톡신 A 함량

2014년 충청북도 청주 및 충청남도 조치원 지역에서 유통되고 있는 돼지고기(삽겹살, 목살)을 대상으로 총 20건을 구입하여 총아플라톡신 및 오크라톡신 A의 오염도를 조사한 결과, 모든 시료에서 총아플라톡신 및 오크라톡신 A가 정량한계미만으로 조사되었다. 국내에서 돼지고기에 대한 곰팡이독소 오염도 자료는 2013년 서울시내 유통 돼지고기를 대상으로 조사된 연구가 있으며, 오크라톡신 1

Table 6. Linearity of matrix-matched calibration curves to analyze for total aflatoxins and ochratoxin A

Compounds	Slope	Intercept	R^2	Range (ng/mL)	MSE (%)
Aflatoxin B_1	24119	3266	0.9992	0.5-10	17.6
Aflatoxin B_2	24032	−9150	0.9988	0.5-10	23.3
Aflatoxin G_1	25921	−4867	0.9995	0.5-10	39.1
Aflatoxin G_2	6688	−1216	0.9995	1.0-20	18.1
Ochratoxin A	26587	−5553	0.9992	1.0-20	−62.6

MSE : Matrix Suppression/Enhancement effect

Table 7. Recovery test (%) of aflatoxins and ochratoxin A in pork

	Compounds	Recovery (RSDr)		
		2 × LOQ	5 × LOQ	10 × LOQ
Pork	Aflatoxin B_1	72.06 (17.82)	85.64 (2.14)	91.98 (7.21)
	Aflatoxin B_2	90.42 (11.30)	85.02 (1.24)	92.34 (5.50)
	Aflatoxin G_1	100.01 (14.04)	95.05 (8.85)	92.28 (5.70)
	Aflatoxin G_2	97.41 (10.56)	91.01 (3.92)	102.2 (2.62)
	Ochratoxin A	90.01 (4.46)	88.61 (12.02)	109.87 (6.95)

건이 검출되었고, 정량한계 미만이었다[21]. 프랑스에서 돼지고기 908건을 검사한 결과 평균 0.05 μg/kg, 최대 6.1 μg/kg으로 조사되었고, 독일의 경우 58건의 돼지고기 중 8건이 검출되었으며, 평균 0.01 μg/kg으로 검출되었다. 영국은 돼지고기, 돼지고기 신장에 대하여 분석한 결과 < 정량한계~9.30 μg/kg으로 오염도가 조사되었다[19]. 본 연구의 조사는 충청지역의 돼지고기의 제한된 오염도 조사결과로 국내 유통되고 있는 돼지고기에 대한 추가적인 모니터링이 필요하다.

Acknowledgement

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처의 자체연구개발과제의 연구개발비(14161식품안010) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

돼지고기 중 5종의 곰팡이독소(아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2 및 오크라톡신 A)를 분석하기 위해 0.1% 개미산을 함유한 50% 아세토니트릴용액으로 추출한 후 고체상추출칼럼을 이용하여 정제하고, LC-MS/MS로 동시 정량할 수 있는 시험법을 마련하였다. 분석조건으로 측정한 5종의 곰팡이독소 matrix-matched 표준곡선식에서 모두 상관계수 0.998이상의 상관관계를 나타내었다. 5종의 곰팡이독소 2배의 정량한계에서 10배의 정량한계로 첨가한 시료에서 평균 회수율은 72.1~109.9%로 실험 결과들이 EU 가이드

라인에서 제시하는 유효성 확인을 위한 기준을 만족함으로써 시험법의 신뢰성을 확보할 수 있었다. 충청지역 유통되고 있은 돼지고기 20건에 대한 총아플라톡신 및 오크라톡신A에 대한 오염도 조사결과 정량한계 미만으로 조사되었다.

References

1. WHO (World Health Organization), WHO Food Additives Series: 47. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2001). http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm.
2. Aziz, N.H., Youssef, Y.A.: Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing moulds in fresh and processed meat in Egypt. *Food Addit. Contam.,* **8**(3), 321-331 (1991).
3. Bailly, J.D., Tabuc, C., Querin, A., Guerr, P.: Production and stability of paturlin, ochratoxin A, citrinin and cyclopiazonic acid on dry cured ham. *J. Food Protection.,* **68**, 1516-1520 (2005).
4. Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G.: Transfer of aflatoxin B_1 from feed to milk and curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.,* **88**, 3063-3069 (2005).
5. Jean-Denis B., Phillippe G.: Safey of Meat and Processed Meat, Chapter 4 Mycotoxin in meats and processed meat products, IATA, Burjassot Valencia, Spain, pp 85 (2009).
6. Curtui V.G, Gareis M, Usleber E, Mrtlbauer E.:Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Addit. Contam.,* **18**, 730-738 (2001).
7. Matrella R, Monaci L, Milillo M.A, Palmisano F, Tantillo M.G.: Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control,* **17**, 114-117 (2006).
8. Herzallah S.M.: Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem.,* **114**, 1141-1146 (2009).
9. Kim, D., Jang, H., Kim, Y., Ahn, J.: Survey for contamination and study for reduction of ochratoxin A and aflatoxin in red pepper. *J. Fd Hyg. Safety,* **24**(4), pp. 299-306 (2009).
10. Songsermsakul P, Razzazi-Fazeli E.: A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *J Liq. Chromatogr. Related Technol.,* **31**, 1641-1686 (2008).
11. Jaimea, J., Fente, C.A., Franco, C.M., Cepeda, A., Vazquez, B.I.: A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. *J. Sci Food Agric.,* **87**, 832-840 (2004).
12. Degola, F., Berni, E., Dall'Asta, C., Spotti, E., Marchelli, R., Ferrero, I., Restivo, E.M.: A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of Aspergillus flavus. *J. Appl. Microbiol.,* **103**, 409-417 (2006).
13. Stubblefield, R.D., Honstead, J.P., Shotwell, O.L.: An analytical survery of aflatoxins in tissues from swine grown in regions reporting 1988 aflatoxin-contaminated corn. *J. Assoc. Off Anal Chem.,* **74**(6), 897-899 (1991).
14. Stubblefield, R. D., Pier, A.C., Richard, J.L., and Shotwell, O.L.: Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B_1. *Am J. Vet. Res.,* **44**, 1750-1752 (1983).
15. Sofreza, S., Dall'Asta C., Marchelli, R.: Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass pectrometry Reviews.,* **25**, 54-76 (2006).
16. Chen, D., Cao, X., Tao. Y., Wu, Q., Pan, Y., Huang, L., Wang, X., Wang, Y., Peng, D., Liu, Z., Yuan, Z.: Development of a sensitive and robust liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and a pressurized liquid extraction for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal derived foods. *J. Chromatography A.,* **1253**, 110-119 (2012).
17. Moreno G.E., Lino C.M., Baeta M.L., Pena A.S., Silveira M.I.N., Vinuesa J.M.: A comparative study of extraction apparatus in HPLC analysis of ochratoxin A in muscle, *Ana.l Bioanal. Chem.,* **383**, 570-575 (2005).
18. Park, J.W., Yoo, M.S., Kuk, J.H., Ji, Y.A., Lee, J.H.: Simultaneous Determination and Mornitoring of Aflatoxin and Ochratoxin A in Food, *J. Fd Hyg. Safety*, **28**, 75-82 (2013).
19. Council for agricultural science and technology, Task Force Report no 139, Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Ames, IOWA, USA (2003), http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf
20. Songsermsakul P., Razzazi-Fazeli E.: A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 1641-1686 (2008).
21. Kim, Y. J., Kim, M. R., Choi, T. S., Kim, Y. S., Lee, J. H.: A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.,* **31**, 1641-1686 (2008).