곰팡이독소 다중분석법

Multi Mycotoxin Analysis

Danrey Toth

Technical services, VICAM A Waters Business

서론

지난 10년간 곰팡이독소에 대한 감시와 규제의 증가로 인해 곰팡이독소의 다중성분 분석법이 급격히 증가하여 왔다. 면역친화성 컬럼은 각종 곰팡이독소를 HPLC, LC/MS 및 GC를 이용한 분석법의 시료 전처리과정과 농축에 사용되고 있다. 주요 곰팡이독소인 아플라톡신과 오크라톡신을 포함하여 6-7 종의 곰팡이독소의 분석 수요가 증가되고 있다.

곰팡이독소는 거의 모든 농작물과 이를 이용한 식품에서 똑같이 문제가 된다. 특히 가축용 사료에서 곰팡이독소의 피해가 가장 명확하게 나타날 뿐만 아니라 한 번에 광범위한 피해를 입힐 수 있으며, 인체에서는 오염된 식품을 장기간 섭취할 경우 낮은 함량으로도 건강을 해치거나 간에 손상을 입을 수 있다[1]. 특히 유아용 우유 및 이유식 등과 같은 식품은 단일식품으로 전용되기 때문에 곰팡이독소의 피해를 더 우려하게 된다. 우리나라에서도 사료용 밀과 옥수수 등에서 아플라톡신 (AFs), 데옥시니발레놀 (DON), 그리고 제랄레논 (ZEN) 곰팡이독소로 인해 야기된 가축 피해가 종종 있었다. 특히, 중국과 기타 인도를 포함한 열대기후대인 동남아시아 아프리카 및 중근동 지방에서 수입되는 옥수수, 밀, 땅콩박 등의 곡류 및 그 가공식품에서 많은 오염문제가 발생하고 있다. 뿐만 아니라 견과류, 한약재원료를 필두로 양념류, 장류, 맥주, 포도주 등의 주류 및 커피 등 모든 식품류에서 규제 이상의 곰팡이독소 검출로 인해 수입상품이 폐기되거나 반려되는 경우도 있다. 그래서 곰팡이독소의 오염을 다음의 단계별로 추적할 필요가 있다.

- 수확시의 선별 확인 작업
- 저장관리시의 확인분리 및 가공 전 품질관리 검사
- 제조된 상품에 관한 실험실적 확인 및 수출입 전 확인 검사

그 한 예로, 유럽 집행위원회는 유럽식품사료신속경보시스템 (RASFF)로 인해 많은 식품 안전 위해가 방비 또는 완화되고, 안전 관리가 보장되었다는 내용의 보고서를 매년 발표하고 있다. RASFF 시스템을 통해 최근 발생한 다이옥신,

Corresponding author: Danrey Toth
Technical services, VICAM A Waters Business, 34 Maple Street, Milford MA 01757
Tel: 1-800-338-4381 Fax: 1-508-482-4972
E-mail: dtoth@vicam.com

Table 1. Mycotoxin regulation in Korea

Mycotoxins	Target food	Maximum level (㎍/kg)
Aflatoxins	Grain, beans, peanut, nuts & their processed food	15 (B1, 10)
	Processed cereal product & processed bean product	
	Nutmeg, turmeric, dried pepper, dried paprika & spice products containing them	15 (B1, 10)
	Wheat flour/dried fruits	15 (B1, 10)
	Confectionaries (peanut or nut-contaning food)	15 (B1, 10)
	Processed corn products for popcorn	15 (B1, 10)
	Soybean, paste, red pepper paste, curry powder	15 (B1, 10)
	Other food (Meju, steamed rice)	
	Infant formulae & follow-on formulae, processed cereal-based foods for infants and young children	0.5 (B1, 0.1)
Aflatoxin M1	Raw milk, & milks before manufacturing processing	0.5
Ochratoxin A	Grian & their processed food (grinding & cutting, etc.)	5
	Coffee beans & roasted coffee	5
	Instant coffee	10
	Meju	20
	Red pepper powder	7
	Grape juice, concentrated grape juice as reconstituted, wine	2
	Raisins	10
Deoxynivalenol	Grian & their processed food (grinding & cutting, etc.)	1000
	Corn & their peocessed foods (grinding & cutting, etc.)	2000
	Cereals	500
	Infant formulae & follow-on formulae, processed cereal-based foods for infants and young children	200
	Noodles	750
Fumonisins (B1+B2)	Corn	4000
	Corn processed food (grinding, cutting etc.)/corn powder	2000
	Grain products and cereals (contaning >50% corn, corn processed products, corn powder), Processed corn products for popcorn	1000
Zearalenone	Grain & their processed foods (grinding, cutting, etc.)	200
	Confectionaries	50
	Infant formulae & follow-on formulae, processed cereal-based foods for infants and young children	20
	Cereals	50

대장균 위기 등의 집단 식중독 발생 사고를 완화시키는데 활용한 바 있으며, 2011년, RASFF는 대형 식품 사고였던 일본 후쿠시마 원전 사고와 대장균 위기 관리에 중요한 역할을 수행하였다. 이러한 RASFF의 활동으로 위해 식품에 대한 위해관리 시스템의 협력 강화 및 효율성의 증대를 기대할 수 있다[2].

곰팡이독소는 세계 각국에서 규제하고 있으며 규제 수준은 여러 형태로 다르나 대표적인 예로서 유럽연합 (EU), 미국 및 한국의 곰팡이독소 규제현황은 다음과 같다 (Table 1). 먼저, 우리나라에서의 곰팡이독소 규제현황을 살펴보면 아플라톡신은 곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그 단순가공품, 곡류가공품 및 두류가공품, 장류 및 고춧가루 및 카레분, 육두구, 심황, 건조고추, 건조파프리카 및 이를 함유한 천연향신료, 밀가루, 건조과실류, 영아용 조제식, 성장기용 조제식 등에서 아플라톡신의 합으로 15 ㎍/kg 이하 (B1은 10 이하)로 규정하고 있다. 아플라톡신 M1 (AFM1)은 제조 · 가공 직전

Table 2. US FDA action and advisory levels

Mycotoxins	Food item	Maximum level (㎍/kg)
Aflatoxins	Brazil nuts, peanuts & peanut products, pistachio nuts Foods	20
Aflatoxin M1	Raw milk, & milks before manufacturing processing	0.5
Deoxynivalenol	Grain and grain products used for food	1000
Ochratoxin	In process	
Fumonisins (B1+B2+B3)	Degermed dry milled corn products	2000
	Whole or partially degermed dry milled corn products, dry milled corn bran & cleaned corn intended for masa production	4000
	Processed corn products for popcorn	3000

의 원유 및 우유류에서 0.5 ㎍/kg 이하, 파툴린 (PAT)은 사과쥬스, 사과쥬스농축액에서 50 ㎍/kg 이하로, 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 기타 영 · 유아식에서는 10.0 ㎍/kg 이하로 규제하고 있다. 푸모니신 (FUB)은 옥수수에서 4 mg/kg 이하, 옥수수 단순가공품, 옥수수가루에서 2 mg/kg 이하, 그리고 옥수수 단순가공품 또는 옥수수가루를 합하여 50% 이상 함유한 곡류가공품 및 시리얼류와 팝콘용 옥수수가공품에서 1 mg/kg 이하로 규제하고 있다. 오크라톡신 (OTA)은 곡류 및 그 단순가공품, 커피콩 및 볶은 커피, 인스턴트커피, 메주, 고춧가루, 포도쥬스, 포도쥬스농축액, 포도주, 건포도, 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영 · 유아용 곡류조제식, 기타 영 · 유아식에서 0.5 ~ 20 ㎍/kg 이하로 규제하고 있다. 데옥시니발레놀 (DON)은 곡류 및 그 단순가공품, 옥수수 및 그 단순가공품, 시리얼류, 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영 · 유아용 곡류조제식, 기타 영 · 유아식, 그리고 면류에서 0.2 ~ 2 mg/kg 이하로 규제하고 있다. 마지막으로, 제랄레논 (ZEN)은 곡류 및 그 단순가공품, 과자, 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영 · 유아용 곡류조제식, 기타 영 · 유아식, 시리얼류에서 20 ~ 200 ㎍/kg 이하로 규제하고 있다[3].

다음으로 미국 FDA의 조치 및 권장 기준은 다음과 같다 (Table 2). 식품에서의 아플라톡신은 그 합으로 20 ㎍/kg로 규제하고 있고 아플라톡신 M1은 우유에서 0.5 ㎍/kg로 규제하고 있다. 데옥시니발레놀은 식용인 곡물 및 그 제품에서 1 mg/kg으로 규제하고 있으며 푸모니신은 그 합으로 옥수수 및 그 제품에서 2 ~ 4 mg/kg수준으로 규제하고 있다. 오크라톡신에 대한 규제치 설정은 현재 진행 중이다[4].

Table 3. Mycotoxin regulation in EU

Mycotoxins	Food item	Maximum level (㎍/kg)
Aflatoxins	Some tree nuts	15
	Cereals	4
	Spices	10
	Baby food	0.1
	Infant formula	0.025
Afaltoxin M1	Raw milk & milks before manufacturing processing	0.050
	Infant formulae and follow-on formulae, dietary foods for special medical purposes intended specially for infants	0.0025
Ochratoxin A	Wine	2
	Cereals	5
	Dried wine fruits	10
	Spices	30
	Liquorice	20
	Baby food	0.5
T2 and HT2		More data needed before maximum level can be set
Deoxynivalenol	Unprocessed cereals	1250
	Flour	750
	Bread, biscuits & pastries	500
	Cereal-based baby food	200
Fumonisins	Maize	2000
	Maize flour	1000
	Maize based food	400
	Maize based baby food	200
Zearalenone	Unprocessed cereals	100
	Flour	75
	Bread, biscuits and pastries	50
	Cereal based baby food	20

유럽연합은 가장 세부적인 품목적용으로 규제를 운영하고 있고 그 내용은 다음과 같다 (Table 3). 유럽연합은 땅콩 외

견과류에 대한 총 아플라톡신 기준을 15 ㎍/kg로 설정하였으며, 곡류와 향신류에서도 4 ㎍/kg와 10 ㎍/kg로 규제하고 있다. 유럽연합은 우리나라와 마찬가지로 영유아용 식품에 대해 0.1 ~ 0.025 ㎍/kg 이하로 별도의 기준을 마련하였다. 아플라톡신 M1의 기준은 원유 및 우유에 대해 동일한 기준을 적용하고 있으며 더 나아가 영유아용 식품에 대해 0.0025 ㎍/kg이하로 규제하고 있다. 오크라톡신 A에 대한 곡류 및 곡류 가공품의 기준은 5 ㎍/kg로 설정하였고 커피콩, 인스턴트 커피, 건포도, 향신류, 와인 그리고 주류에서도 2 ~ 30 ㎍/kg이하로 규제하고 있다. 특히, 유아용 식품에 대해 0.5 ㎍/kg수준으로 규제치를 설정하고 있다. 한편, T-2/HT-2는 규제치 설정을 위한 보다 많은 자료가 필요한 상황이다. 데옥시니발레놀은 곡류가 주요 오염대상으로 유럽연합에서는 곡류의 종류별로 1250 ~ 1750 ㎍/kg까지 설정하였고, 직접 섭취용 곡류 및 곡류 가공품에는 이보다 낮은 허용치를 적용하고 있다. 가공식품인 빵, 비스킷, 페스트리 등은 500 ㎍/kg이하로, 곡류를 기초로 한 유아식품은 200 ㎍/kg이하로 규제하고 있다. 푸모니신은 옥수수에 오염되기 쉬운 곰팡이독소로서 원료인 옥수수뿐만 아니라 이를 주원료로 한 가공식품에서도 푸모니신이 높게 검출되었다. 유럽연합에서는 푸모니신 기준을 푸모니신 B1과 B2의 합으로 규정하고 있고 옥수수의 가공 정도, 함유량, 용도에 따라 400 ~ 2000 ㎍/kg까지 설정하고 있다. 특히 옥수수를 이용한 영유아용 식품에 대한 기준을 200 ㎍/kg로 별도로 설정하고 있다. 마지막으로 제랄레논은 비가공 곡류에서는 100 ㎍/kg, 가루분은 75 ㎍/kg, 빵, 비스킷 그리고 페스트리는 50 ㎍/kg, 유아용 곡류가공품은 20 ㎍/kg수준으로 안전관리를 강화하여 규제하고 있다[5].

이러한 일련의 활동이 활발히 이루어지고 있는 상황에서 각 곰팡이독소를 보다 신속하고 정확하게 분석하고자 하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 특히 정제과정의 신속성과 정확성을 높이기 위한 일환으로 면역친화성 컬럼의 연구 및 상품화가 이루지고 있고 이에 VICAM에서 생산되고 있는 다양한 면역친화성 컬럼을 소개하고자 한다.

본론

전 세계적으로 발생하는 여러 곰팡이독소를 분석함에 있어 효율적이고 신속한 전처리과정을 위해 다양한 면역친화성 컬럼이 이용되고 있다. 한 가지 매트릭스에서 발현 가능한 다양한 곰팡이독소를 한 번의 추출과정으로 분석가능한 컬럼도 생산되고 있다. Myco6in1 면역친화성 컬럼은 하나의 컬럼으로 여섯 가지의 곰팡이독소를 동시다중분석을 할 수 있도록 한 것으로 분석기술상 하나의 혁신이라고 하겠다. VICAM은 1990년부터 곰팡이독소 분석 면역친화성 컬럼을 전문으로 생산하기 시작하였고 2007년 Waters사에 흡수 합병되어 현재에 이루고 있으며 다음과 같은 곰팡이독소 분석용 컬럼과 독소를 간편하게 검출할 수 있는 소형 검출기를 생산하고 있다 (Fig. 1).

1. 곰팡이독소 분석용 컬럼의 종류

면역친화성 컬럼은 검출기법에 따라 세분화되어 있고 각 곰팡이독소별 다양한 컬럼이 있다 (Table 4). HPLC/UPLC/MS의 분석에 용이한 분석용 컬럼, 형광성을 띠는 곰팡이독소의 신속검출을 위한 fluorometric test에 적합한 컬럼 그리고 신속한 정성분석을 위한 stripe 형식의 제품이 있다.

2. 다성분 분석용 컬럼 및 활용 예

점증하는 곰팡이독소 분석 요구량에 따라 일일이 하나의

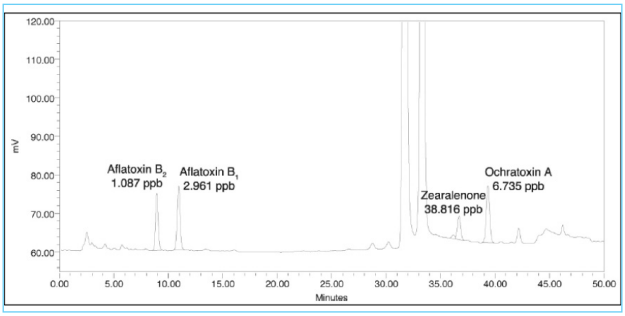
<Fig. 1> A various types of mycotoxins testing solution

Table 4. VICAM's portfolio of mycotoxin testing systems

Mycotoxins	Method	Single-analysis columns	Multi-analysis columns
Aflatoxins	HPLC/UPLC/MS	AflaTest WB AflaTest WB SR Afla M1 HPLC	AflaOchra HPLC AOZ HPLC Myco6in1 LC/MS/MS
	Fluorometric tests	Afla Test Afla B Afla M1 FL+	
	Qualitative strips	AflaCheck	
	Quantitative strips	Afla-V	
Citrinin	HPLC/UPLC/MS	CitriTest HPLC	
Deoxynivalenol	HPLC/UPLC/MS	DONtest HPLC DONtest WB	DON-NIV WB, Myco6in1 LC/MS/MS
	Qualitative strips	DONCheck	
	Quantitative strips	DON-V	
Fumonisin	HPLC/UPLC/MS	FumoniTest WB	Myco6in1 LC/MS/MS
	Fluorometric tests	FumoniTest FumoniTest 200	
	Quantitative strips	Fumo-V	
Ochratoxin	HPLC/UPLC/MS	OchraTest WB	Myco6in1 LC/MS/MS
	Fluorometric tests	OchraTest	
T-2/HT-2	HPLC/UPLC/MS	T-2test HPLC T-2/HT-2 HPLC	Myco6in1 LC/MS/MS
Zearalenone	HPLC/UPLC/MS	ZearalaTest WB	AOZ HPLC, Myco6in1 LC/MS/MS
	Fluorometric tests	ZearalaTest	

곰팡이독소만을 분석한다는 것은 시간적으로나 비용 면에서 매우 비효율적인 문제를 수반하게 된다. 이에 따라 하나의 컬럼으로 2개 이상의 mycotoxin 의 분석기술의 필요성이 요구되었고 VICAM에서는 다음과 같은 다중분석 컬럼을 개발하였다.

AflaOchra HPLC는 아플라톡신과 오크라톡신을 동시에 검출가능하고 인삼과 생강에서 아플라톡신과 오크라톡신 A를 AflaOchra HPLC 컬럼을 이용한 방법이 AOAC Official method 2008.02로 2008년에 올랐으며[6] 이유식과 우유에서 아플라톡신과 아플라톡신 M1 그리고 오크라톡신 A를 UHPLC-MS/MS로 분석하는 방법도 최근에 발표되었다. Beltrán[7] 등은 곡류 영아식, 영아용 조제식, 우유, 분유에서 아플라톡신과 오크라톡신을 첨가하여 검출한계, 정량한계 및 회수율을 측정한 결과 모든 매트릭스에서



<Fig. 2> Mycotoxin positives identified in jujube seed extract.

각 아플라톡신의 검출한계는 1 ~ 8 ng/kg이었고 정량한계는 3 ~ 25 ng/kg이었고 회수율은 81 ~ 107%범위였다. 오크라톡신은 곡류 영아식과 영아용 조제식에서 아플라톡신과 유사한 검출, 정량한계를 보였고 회수율은 84 ~ 101%였다. 이러한 결과는 유럽연합의 분석법 검증결과의 허용기준치에

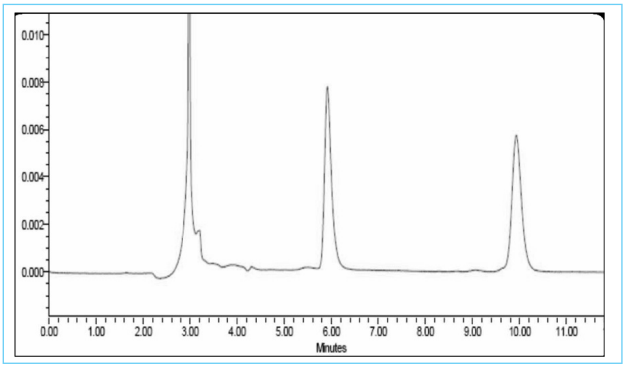
적합한 결과이다.

한 단계 더 나아가 AOZ HPLC는 아플라톡신, 오크라톡신과 더불어 제랄레논도 분석가능한 컬럼으로 컬럼을 통과한 용출액은 형광검출기로 검출된다. Hengst[8] 등은 생약보충제와 식물추출물에서의 아플라톡신, 제랄레논 및 오크라톡신 A의 분석을 실시하였고 그 크로마토그램은 Fig. 2에 나타내었다.

T-2/HT-2 독소는 type A의 trichothecene독소로 주로 귀리에서 많이 발생된다. Meister[9]는 귀리와 다른 곡류에서 T-2/HT-2 컬럼으로 정제한 다음 형광검출기로 분석하였고 중국의 생약제에서 T-2독소를 다양한 정제 컬럼을 이용하여 GC-ECD로 분석하기도 하였다. 그결과 고체상 정제 컬럼인 Florisil, Mycosep 225, Bond Elot mycotoxin을 이용한 것보다 면역친화성 컬럼을 이용하여 얻은 결과값이 더 좋았음을 발표하였다[10].

다음으로 온대지역에서 주로 발생하는 trichothecene 중 type B독소는 니발레놀, 데옥시니발레놀, 푸사레논 X, 3-아세틸-데옥시니발레놀, 15-아세틸-데옥시니발레놀이 있으며 아시아에서는 니발레놀의 발현이 데옥시니발레놀보다 높은 경향을 보이고 있다. 그래서, 니발레놀과 데옥시니발레놀을 동시에 분석할 수 있는 컬럼이 2012년에 출시되었고 두 독소의 동시분석 방법은 다음과 같다.

- Extraction, with water, or methanol, or acetonitrile blend at high speed for 3 min.
- Filter sample to separate liquid and solid
- Diluted filtrate for clean up
- Wash column with 10 ml PBS and then 10 ml water, one time each
- Elute column with organic solvent
- Completely blowing out the residues from column, and only the eluate
- Reconstitute dried sample eluate and standards with 300 ㎕ of HPLC mobile phase (add 300 ㎕ mobile phase, let it set for 5 min and vortex well)



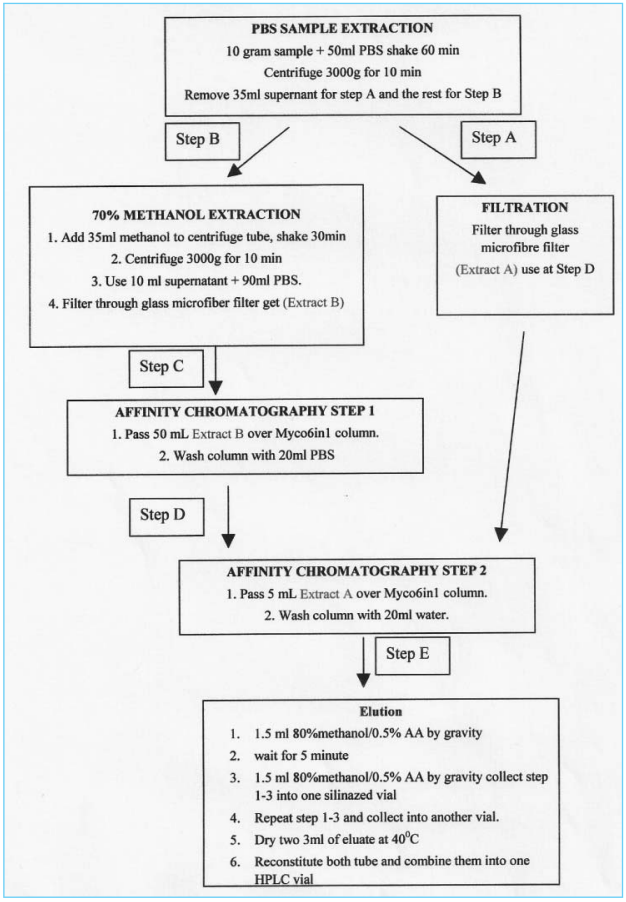
<Fig. 3> Chromatogram of DON and NIV spiked with 1 mg/kg in wheat.

- Inject 50 ㎕ of each reconstituted sample and standards for analysis.

기기조건은 다음과 같이 실행하였다; 컬럼, Waters Nova-Pak C18 (3.9×300 mm, 4㎛), 오븐온도, 25°C; 이동상, water/ACN (V/V) = 90/10, isocratic; 유속, 0.6 ml/min; 주입량, 50 ㎕; 검출기, 218 nm, photod; 분석시간, 12 분; 유출시간, NIV 6-7 분, DON 10-11 분. 이러한 분석법으로 실행하여 얻은 크로마토그램은 Fig. 3과 같았다.

밀에 데옥시니발레놀과 니발레놀을 0.1, 0.5, 1, 2, 5 그리고 8 mg/kg 농도로 첨가하여 회수율과 반복성을 알아본 결과 데옥시니발레놀의 회수율과 상대표준편차는 각각 91.84 ~ 143.25 ㎍/kg과 4.80 ~ 11.00%수준이었고 낮은 농도일수록 회수율과 상대표준편차값이 커지는 경향을 보였다. 니발레놀의 회수율과 상대표준편차는 각각 81.4 ~ 118.2 ㎍/kg과 0.41 ~ 15.37%수준으로 데옥시니발레놀보다 낮은 농도에서도 다소 안정적인 수준을 나타내었다. 0.5 mg/kg과 4.88 mg/kg수준에서의 정밀성과 반복성은 각각 0.6 mg/kg과 6.63%, 그리고 4.18 mg/kg과 3.80%수준으로 농도가 높아질수록 정밀성이 좋아지고 농도가 낮아질수록 과대평가되는 경향을 보였다.

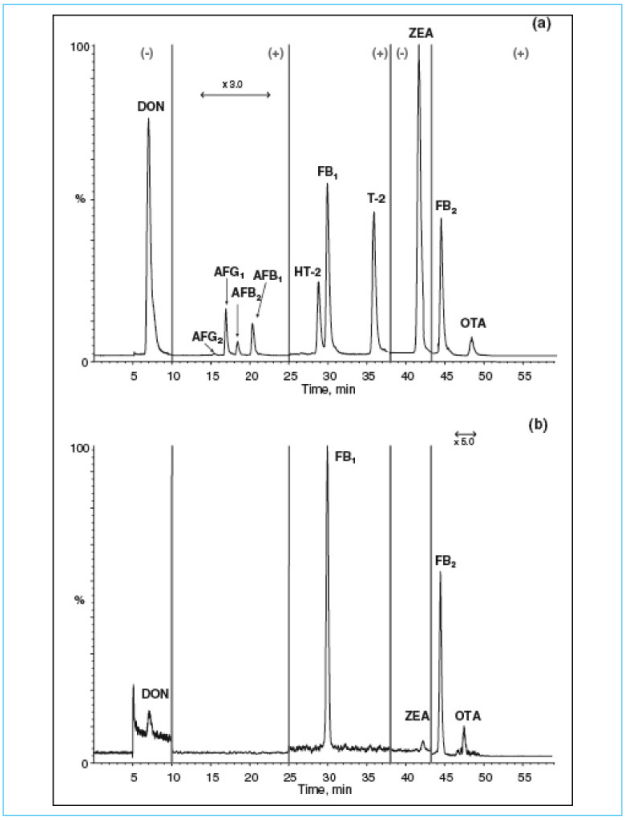
데옥시니발레놀과 니발레놀을 추출함에 있어 추출용매의 효율성을 알아보고자 실험한 결과 3차 증류수와 50% 메탄올로 추출할 경우 데옥시니발레놀과 니발레놀의 회수율은 각각 88%와 91%로 적합하였고, 84% ACN으로 추출한 다음 5배와 10배 희석하는 방법을 비교해 보았을 때 10배 희석



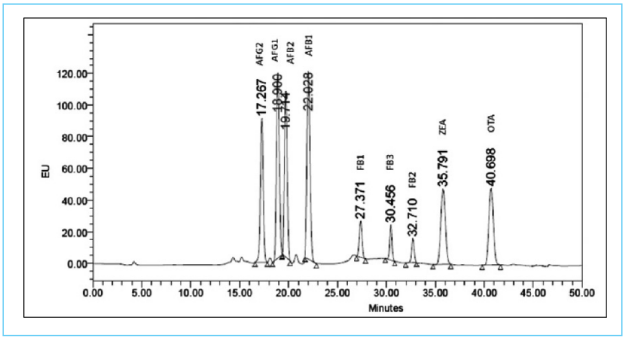
<Fig. 4> Overview of MYCO6IN1 LC/MS/MS procedure.

하는 것이 회수율이 더 높았다. 84% ACN으로 추출한 다음 5배 희석하는 방법의 회수율은 데옥시니발레놀의 경우 77%, 니발레놀의 경우 84%였다.

마지막으로 한 번의 추출로 6종의 곰팡이독소를 분석할 수 있는 Myco6in1 컬럼을 소개하고자 한다(Fig. 4). 이 컬럼은 아플라톡신(4종), 오크라톡신 A, T-2/HT-2, 제랄레논, 푸모니신 B1과 B2 그리고 데옥시니발레놀을 분석할 수 있다. Lattanzio[11] 등은 이 컬럼을 이용하여 LC-MS/MS로 옥수수에서 6종의 곰팡이독소 동시분석 실험을 하였다. MS/MS parameter와 크로마토그램은 아래에 제시하였다 (Fig. 6 및 7, Table 5). 옥수수에서의 검출한계 (S/N=3)는 DON 5, AFG2 2, AFG1 0.2, AFB2 0.2, AFB1 0.2, FB1 3, FB2 1.3, HT-2 1.5, T-2 1.8, ZEN 0.4 그리고 OTA 0.3 μg/kg이었다. 회수율과 반복성은 4회 반복 실



<Fig. 5> Total ion chromatogram (TIC of MRM) of (a) extract of maize sample spiked at levels: 500 mg/kg DON; 2 mg/kg AFG2, AFB2 6 mg/kg AFG1 10 mg/kg AFB1 500 mg/kg FB1 250 mg/kg FB2 100 mg/kg HT-2, T-2, ZEA; 20 mg/kg OTA; (b) extract of maize sample naturally contaminated with 5 mg/kg DON; 72 mg/kg FB1, 16 mg/kg FB2, 0.5 mg/kg ZEA; 0.3 mg/kg OTA. The experimental conditions are reported in the Experimental section. Vertical lines indicate the periods of ion source polarity switching.



<Fig. 6> FLD chromatogram of nine separate mycotoxins under optimal HPLC conditions (10 ng/g AFB1 and AFG1; 3 ng/g AFB2 and AFG2; 25 ng/g OTA; 250 ng/g ZEN, FB1, FB2 and FB3).

험으로 얻은 결과, 회수율은 79%에서 104%범위로 검출되었고 다만 HT-2인 경우 HT-2와 가수분해된 T-2의 합으로서 회수율이 180%였다. 이 연구에서 실시한 전처리과정은 PBS로 추출한 후 70% 메탄올로 추출한 방법으로 각 독소별 화학적 특성을 고려한 방법이다.

또, Soleimany[12] 등은 LC-MS/MS보다 좀 더 보편적으로 이용될 수 있는 (PDA)와 형광검출기 (FLD)를 이용하여 분석하는 방법을 발표하였다. 전처리 과정은 다음과 같다.

Table 5. MS/MS parameters for mycotoxin detection by the nultiple reaction monitoring (MRM) method

Analyte	Precursor ion	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
			295.0			17	-2.5
DON	$[DON+CH_3COO]^-$	355.1	265.0	-23	-4.5	20	-2.7
			59.0*			40	-7.0
			313.2*			30	4
AFG2	$[AFG2+H]^+$	331.1	245.3	60	9	35	3.5
			217.0			43	3.5
			311.2			23	4.5
AFG1	$[AFG1+H]^+$	329.1	243.1*	54	10	33	3.5
			215.2			40	3.5
			287.2			30	3.7
AFB2	$[AFB2+H]^+$	315.0	259.0*	60	9	35	3.5
			243.2			50	3.5
			241.0			50	3.5
AFB1	$[AFB1+H]^+$	313.2	213.4	55	11	60	3.5
			185.2			67	3.5
			263.2*			17	4.0
HT-2	$[HT-2+NH4]^+$	442.0	245.2	20	5	15	3.3
			215.0			17	3.4
			245.2			20	3.6
T-2	$[T-2+NH4]^+$	483.9	215.2*	20	7	25	3.3
			185.2			25	2.9
			352.2			53	4.5
FB1	$[FB1+H]^+$	722.0	334.1*	70	9	53	4.5
			316.1			53	4.0
			354.4			45	15.0
FB2	$[FB2+H]^+$	706.2	336.4*	70	9	47	4.0
			318.3			53	4.0
			357.9			23	15.0
OTA	$[OTA+H]^+$	404.0	239.0	30	5	30	4.0
			221.1			45	4.0
			273.0			25	-3
ZEN	$[ZEN-H]^-$	317.0	175.1	-70	-7	30	-3
			130.9			40	-2

* Transitions used for quantitation
Q1 First quadrupole; Q3 third quadrupole; DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential.

Table 6. Conditions of HPLC for 6 mycotoxin analysis

Column	Symmetry C18, 3.5 ㎛, WAT200632
Flow rate	1.0 ml/min
Column Temp.	30°C
Injection volume	100 ㎕
Absorbance wavelength	208 nm

Fluorescence detector

Time (min)	Mycotoxin	Excitation	Emission
0.1-20	Aflatoxins	365 nm	455 nm
20-25.5	Fumonisins	329 nm	465 nm
25.5-28.6	Zearalenone	276 nm	460 nm
28.6-30	OchratoxinA	329 nm	460 nm

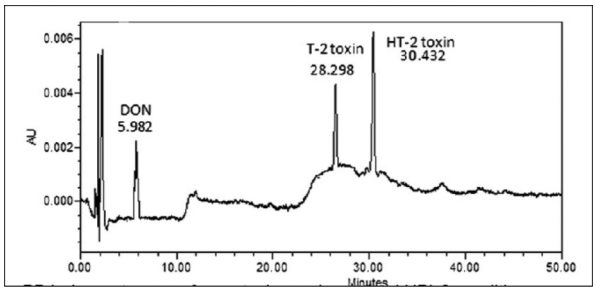
Mobile phase gradient

(A) Methanol, (B) 0.1% H_3PO_4, (C) Acetonitrile

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
	1.00	0.0	85.0	15.0	6
4	1.00	0.0	85.0	15.0	6
5	1.00	25.0	60.0	15.0	6
16	1.00	25.0	60.0	15.0	6
17	1.00	30.0	40.0	30.0	6
30.01	1.00	0.0	85.0	15.0	11

- 10g sample + 1g NaCl + 50ml water blend at high speed 1min
- Sit for 5min then blend 1min at high speed peed
- Sit for 5-10min, then remove 20ml supernant, dilution 1:1 with 2%PEG in PBS → filtered by GF/A (Extract A)
- Add 70ml 100% methanol to blender jar. B lend another 2min
- Sit for 10min, before remove 10ml of supernant and dilution 1:9 with PBS then filtered by GF/A (Extract B)
- Pass 50ml Extract B through column → wash with 10ml PBS
- Fill the column head space with 2%PEG/PBS → load 5ml Extract A in syringe barrel, drop by gravity.
- Wash column with ~7ml of water in column head space
- Elute with 80% methanol + 0.5% Acetic acid (1.5ml, 4 times)
- Dry at medium temperature under vacuum
- Reconstitute in 250 ul 50% methanol in water
- Inject 100ul

기기조건은 아래 Table 6에 나타내었다. HPLC-PDA-FLD방법의 직선성과 민감성은 AFB1과 AFG1은 0.25 – 10 ng/g범위에서 0.9977이상의 상관성을 보였고 검출한계와 정량한계는 0.025와 0.075 – 0.085 ng/g이었다. AFB2과 AFG2은 0.075 – 3 ng/g범위에서 0.9981이상의 상관성을 보였고 검출한계와 정량한계는 0.012와 0.037 ng/g이었다. ZEN, FB1, FB2, FB3 그리고 HT-2는 6.25 – 250 ng/g범위에서 0.9924이상의 상관성을 나타내었고 검출한계는 1.562 – 9.365 ng/g수준이었고 정량한계는 4.500 – 31.210 ng/g수준이었다. DON과 T-2 는 12.5 -500 ng/g범위에서 좋은 직선성을 보였고 검출한계는 18.73과 6.25 ng/g, 정량한계는 62.43과 20.83 ng/g이었다. 각 곰팡이독소별 옥수수에서의 회수율과 반복성은 다음과 같다. 즉 각 곰팡이독소의 특성에 적합



<Fig. 7> PDA chromatogram of mycotoxins under optimal HPLC conditions (HT-2 toxin 250 ng/g, T-2 toxin and DON 500 ng/g)

한 농도로 독소를 첨가하여 측정한 결과 회수율은 72.67 ~ 106.51%수준이었고 반복성은 5.07 ~ 18.67% 수준이었다.

결론

면역친화성 컬럼은 곰팡이 독소의 분석을 위한 HPLC, GCMS, ELISA와 다른 분석법을 위한 시료전처리용 clean-up column으로 복잡하고 까다로운 HPLC, GCMS 등의 기기분석용 시료 전처리를 쉽고 빠르게 수행 할 수 있다. 또한, 회수율이 우수하여 기기분석 실험의 정확도를 높이고, 다양한 시료에 적용 가능하다. 이러한 면역친화성 컬럼을 이용하여 여러 food chain 단계에서 신속한 위해관리가 이루어질 수 있으며, 더 나아가 안전한 식품과 사료의 공급으로 가축과 인류의 건강을 도모하는데 일조할 수 있을 것이다.

참고 문헌

1. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Task force report No. 139: Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems, Ames, Iowa, USA (2003).

2. The rapid alert system for food and feed (RASFF). Annual report 2011. Directorate-general for health & consumers, European Commission (2012).

3. Korea Food and Drug Administrator. Food code. 2011-76, Chungcheongbok-do, Korea (2011).

4. USA: US Food and Drug Administration Compliance policy Guides, Chapter 5 - Foods, Colors and Cosmetics. http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm119194.htm.

5. Commission Regulation (EC). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. L364, 20.December (2006).

6. AOAC Official Method 2008.02. Aflatoxins B1, B2 , G1, and G2 and Ochratoxin A in ginseng and ginger. Multitoxin immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic quantitation First Action 2008.

7. Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Cortés, M.,Á., Yusá, V., and Hernández, F. UHPLC-MS/MS higly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chem*. 126, 737-744 (2011).

8. Hengst, D., and Habek, S. HPLC analysis of mycotoxins in herbal supplements and botanical extracts. presented at the 121st AOAC annual meeting & exposition Anaheim, California, 16-20 September (2007).

9. Meister, U. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in oats and other cereals by means of HPLC with fluorescence detection. *Mycotoxin Research*, 24(1), 31-39 (2008).

10. Yue, Y.-T., Zhang, X.-F., Ou-Yang, Z., Gao, W.-W., Wu, J., and Yang, M.-H. Determination of T-2 toxin in traditional chinese herbal medicines by GC-ECD. *Chromatographia*, 70, 1495-1499 (2009).

11. Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M., Powers, S.,and 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 Spectrum*. 21, 3253-3261 (2007).

12. Soleimany, F., Jinap, S., Rahmani, A and Khatib, A. Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRE and a post-column derivatization system. *Food Addit. Contam*. 28(4), 494-501 (2011).