

LC-MS/MS 동시분석법에 의한 시리얼의 곰팡이독소 오염실태 조사

식품의약품부 생활보건팀

신재민 · 윤은선 · 김여숙 · 이정숙 · 최수정 · 이진효 · 오영희

Survey of Mycotoxins in Breakfast Cereals by LC-MS/MS Simultaneous Analysis Method

Life & Health Research Team

Jae-min Shin, Eun-sun Yun, Yeo-sook Kim, Jeong-sook Lee,
Su-jeong Choi, Jin-hyo Lee and Young-hee Oh

Abstract

A simultaneous determination method for deoxynivalenol(DON), aflatoxins(AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂), ochratoxin A(OTA), zearalenone(ZEA), and fumonisins(FB₁ and FB₂) was developed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. The recoveries of mycotoxins in the spiked cereals ranged from 62.99% to 116.28%. The limits of detection and quantification ranged from 0.52 to 4.18 and 1.72 to 13.81 µg/kg, respectively. The developed method was applied to the determination of mycotoxins in 105 breakfast cereals. The analytical results show that 33 samples(31%) were contaminated with at least one of these mycotoxins. DON was detected in the range 125.1 ~ 352.5 µg/kg. No sample was contaminated with aflatoxins, whereas fumonisins showed the highest contamination rates. The OTA contamination level was above the European Union(EU) maximum limit(3.0 µg /kg), ranging from 6.3 to 9.4 µg/kg. Two samples exceeded the maximum limits for ZEA by Korea Food and Drug Administration and EU(50.0 µg/kg). The co-occurrence of mycotoxins was observed in five breakfast cereals.

Key words : Mycotoxin, LC-MS/MS, Breakfast cereals,

서 론

곰팡이독소는 곰팡이가 생성하는 2차 대사산물로 지구의 기후변화 및 곡류제품의 무역으로 인해 곰팡이독소의 생성 및 오염가능성이 높아지고 있다. *Aspergillus flavus*, *Asp. parasiticus* 같은 곰팡이는 간독성, 간암을 일으키는 아플라톡신을 생성하며 *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*에 의해 생성되는 제랄레논은 면역저하 및 내분비계장애를 일으킨다고 알려져 있다(1). 이러한 곰팡이독소는 식품첨가물처럼 고의로 사용하는 물질이 아닌 자연적 오염으로부터 발생하는 비의도적 오염물질로 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 곰팡이독소를 잔류농약이나 식품첨가물보다 더 큰 위험물질로 분류하고 있으며(2), 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)는 아플라톡신의 경우 인간에 대한 발암성이 확인된 I 군(group I), 오크라톡신 A, 푸모니신은 인간에 대한 발암 가능성이 확인된 2B 군(group II)으로 분류하고 있다. 식품을 구매하는 소비자는 안전한 식품을 구매하고자 제품 포장의 성분표시를 읽어 볼 수 있고, 농약을 사용하지 않은 유기농 제품을 선택 할 수 있다. 그러나 구매한 식품이 곰팡이독소에 오염되었는지 여부는 알 수 없고 곰팡이독소는 비교적 열에 안정하여 조리·가공 후에도 소실되지 않고 잔존하기 때문에 위험성이 높다. 또 식품의 저장온도, 습도가 관리되는 시스템에서도 곰팡이독소 오염이 지속적으로 나타나고 있다고 보고되는 등(3) 곰팡이독소는 식품의 가공, 유통, 보관에 이르기까지 다각적인 조사와 연구가 필요하다.

세계 각국은 1990년도까지 곰팡이독소에 대하여 개별적으로 규제를 두었으나 현재는 FAO/WHO 식품첨가물합동전문가위원회(FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nation, JACFA), 유럽식품안전청(Europen Food Safety Authority, EFSA)과 같은 기구의 의견을 바탕으로 곰팡이독소의 기준을 설정하고 있다. 우리나라에서는 식품 및 농산물에 대하여 아플라톡신 B1에 대해서만 기준을 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 규정하고 있었지만 2009년 3월부터 곡

류, 견과류 및 그 가공품에 대한 아플라톡신 기준을 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 합으로서 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 규격을 강화시켰으며 점차 그 대상을 향신료, 밀가루, 전조과실 등으로 확대시켰다. 오크라톡신 A는 곡류, 커피에 각각 $5, 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이하의 기준으로 관리하였으나 대상 식품을 고춧가루, 포도제품으로 확대하는 등(3~5) 곰팡이독소에 대한 관리 기준이 강화되는 추세이다. 현재 식품공전의 분석방법은 독소별 개별분석법으로 많은 비용과 시간이 소요되고 기준이 없는 식품 또한 존재하여(4), 보다 효율적인 관리방안이 필요하다. 곰팡이독소를 분석하는 방법은 TLC(Thin Layer Chromatography), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), GC(Gas Chromatography)를 이용하는 등 계속 발전하고 있는데 주요 곰팡이독소들은 면역친화성컬럼(immunoaffinity column, IAC)을 이용하여 정제하고, HPLC를 이용하여 정량하는 분석법이 여러 연구 및 공인분석법에서 많이 이용되고 있다(6). 이러한 분석법은 매우 정확하고 여러 메트릭스에 적용 가능하나 곰팡이독소별로 분석을 해야 하므로 분석 시간이 길고 고가의 면역친화성 컬럼이 독소별로 필요하다. 또 독소에 따라 유도체화를 해야 하는 번거로움이 있다. 곰팡이독소 오염은 개별 독소별로 발생되지 않고 여러 곰팡이독소들이 동시에 오염되어 발견되는 경향이 있기에(1, 7, 8), LC-MS/MS와 고체상추출컬럼(SPE)을 이용한 곰팡이독소 동시분석을 수행하여 시간과 비용 면에서 경제적인 분석방법을 확립하고자 하였다. 또 기존 연구 및 논문에서 곡물의 곰팡이독소 오염이 빈번하고(1, 7, 9), 우리나라에는 해마다 옥수수, 밀 등 곡물의 수입의존도가 높아지고 있으므로 곡물을 가공하여 만든 시리얼에 동시분석법을 적용하여 곰팡이독소 오염현황을 파악하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 시료는 2016년 5월부터 8월 까지 서울시내 대형마트에서 곡류를 원료로 하는

시리얼 형태의 가공식품 105건을 구매 하였다. 분석대상으로 삼은 시료는 외관상 아침식사대용 시리얼 형태이나 식품의 유형에 따라 시리얼류 36 건, 곡류가공품 27건, 과자 24건, 기타가공품 9 건, 체중조절용 조제식품 6건, 초코릿가공품 2건, 즉석가공품 1건으로 총 105건을 대상으로 하였다. 검사대상 시료는 일정량을 취해 균질화한 후 밀봉, 냉동 보관하여 실험재료로 사용하였다.

2. 시약 및 기구

곰팡이 독소를 정제하기 위하여 ISOLUTE Myco column(60 mg/3 mL)은 Biotage(Sweden)에서 구입하였고, 곰팡이독소 분석을 위한 표준품으로 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂(각 3 µg/mL)는 Supelco (Bellefonte, PA, USA), deoxynivalenol(100 µg/mL), fumonisin mixture(FB₁, FB₂ 각 50 µg/mL), ochratoxin A(10 µg/mL), zearalenone (100 µg/mL)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Methanol(HPLC grade Fisher Scientific Korea), acetic acid는 Fluka 제품을 사용하였다. Luna C₁₈(2)(150 × 3.0 mm, 3 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였고, HPLC(Agilent, Foster City, CA, USA)와 질량분석기는 Qtrap-3200 triple-quadrupole tandem mass spectrometer (AB ACIEC, Framingham, MA, USA)를 연결하여 곰팡이 독소를 확인 및 정량 하였다.

3. 시료전처리 및 분석방법

시료를 맥서에 갈아 균질화 한 후 5 g을 centrifuge tube에 정밀히 달아 중류수 30 mL를 넣고 vertical shaker로 30분간 진탕한 후 3000 g로 10분 원심분리하여 유리섬유여과지(GF/A)로 여과 한 액을 테옥시니발레놀 추출액으로 하였다. 또 다시 5 g을 새로운 centrifuge tube에 취해 염화나트륨 1 g과 60% 메탄올을 25 mL 넣은 후 30분간 진탕한 후 3000 g로 원심분리하여 유리섬유여과지(GF/A)로 여과한 액을 아플라톡신, 푸모니신, 오크라톡신, 제랄레논 추출액으로 하였다. 중류수와 60% 메탄올로 각각 추출한 두 여액은

증류수로 4 : 1로 희석하여 ISOLUTE Myco column를 이용하여 정제하였다. 0.1% 개미산 함유 아세토니트릴 2 mL와 0.1% 개미산 함유 메탄올 2 mL을 이용하여 컬럼에 남아있는 독소를 용출하여 50°C에서 질소로 건조 하였으며 최종 0.1% 아세트산 함유 50% 메탄올 1 mL에 녹여 0.2 µm 맴브레인 여과지로 여과하여 질량 분석을 위한 시험용액으로 사용하였다. 곰팡이독소가 검출되지 않은 시리얼을 증류수와 60% 메탄올을 넣어 각각 추출한 액을 위 과정을 똑같이 거쳐 표준품 희석을 위한 용매로 사용하였다. 시험용액은 HPLC-MS/MS로 분석하였는데, 여러 종류의 곰팡이독소 분리를 위해 농도구배(gradient)조건을 이용하였다(표 1). 이동상은 0.1% 아세트산을 함유하고 있는 증류수와 메탄올을 각각 A와 B 용액으로 하였다. HPLC 컬럼은 Luna C₁₈(2)(150 × 3.0 mm, 3 µm)을 사용하였다. 테옥시니발레놀과 제랄레논은 negative mode에서 다른 독소들은 positive mode에서 분석되었다. 질량분석을 위한 이온화 조건과 MRM쌍은 표 2와 같다.

4. 유효성 검증

곰팡이독소 표준품을 표 3의 범위에서 혼합하여 50°C에서 질소 건고 후 5단계로 희석하여 직선성을 나타내었다. 곰팡이독소에 오염되지 않은 시리얼에 표준액을 첨가하여 7반복 후, 검출한계(LOD), 검량한계(LOQ)를 구하였고, 정확성과 정밀성은 3일간 회수율을 측정하여 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 직선성 및 검량선

각각의 독소들의 스펙트럼을 그림 1에 나타내었고 이를 바탕으로 검량선을 작성하였다. 테옥시니발레놀 표준액을 건고하고, 나머지 곰팡이독소 표준액은 혼합 뒤 건고 후 재용해 및 희석하여 직선성을 확인한 결과를 표 3에 나타내었다. 표준액 희석은 곰팡이독소가 검출되지 않은 시리얼을 증류수와 60% 메탄올로 각각 추출, 정제 및 건고 한 뒤

0.1% 아세트산 함유 50% 메탄올용액으로 재용해한 후 5단계로 희석하였다. 데옥시니발레놀은 4~80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 아플라톡신 B₁, B₂, G₁은 0.6~12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 아플라톡신 G₂는 1.2~24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 푸모니신은 2~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 오크라톡신 A는 1~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 검량선을 작성하였다. 그 결과 데옥시니발레놀, 아플라톡신 G₁의 상관계수(R^2)는 0.9990, 아플라톡신 B₂, G₂, 푸모니신 B₁은 0.9995 이상, 아플라톡신 B₁, 푸모니신 B₂, 제랄레논, 오크라톡신 A는 0.9999로 양호한 직선성을 나타내었다.

2. 검출한계 및 정량한계

곰팡이독소가 검출되지 않은 시리얼에 곰팡이독소를 첨가하여 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 구하였고 그 결과는 표 4와 같다. 아플라톡신의 검출한계는 0.88~1.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 면역친화성컬럼과 HPLC-FLD를 이용하여 구한 정(1)의 검출한계 0.06~0.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Ibáñez-Vea(8)의 검출한계 0.014~0.051 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 보다 높은 수치였다. 푸모니신 B₁, B₂의 검출한계는 각각 4.18, 2.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 오크라톡신 A는 0.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 제랄레논은 1.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 데옥시니발레놀은 4.41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

3. 정확성 및 정밀성

곰팡이독소가 검출되지 않은 시리얼에 곰팡이독소 표준액을 정량한계 2배, 10배로 2개의 농도를 첨가하고 시료전처리 방법으로 분석하였다. 3일 동안 반복하여 정확성과 정밀성을 확인한 결과는 표 4와 같다. 데옥시니발레놀의 회수율은 70.59~111.90%, 아플라톡신은 83.80~94.07%, 푸모니신은 62.99~116.28%, 제랄레논은 90.99~109.83%, 오크라톡신 89.14~108.05%를 나타내었다. 곰팡이독소의 일내, 일간 정밀성을 나타내는 상대표준편차는 최대 13.43%로 이러한 수치는 EU의 가이드 라인(표 5)에 적합하였다.

4. 곰팡이독소별 검사결과

105건의 검체는 옥수수, 밀, 귀리, 쌀, 현미 등의 곡류로 가공한 시리얼로 이 중 33건의 시리얼에서 곰팡이독소가 검출되었다. 데옥시니발레놀은 6건에서 검출되었고 검출량은 125.1~352.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. Montes 등(10)의 결과에선 스페인의 148건 시리얼 중 38건에서 데옥시니발레놀이 검출되었고 검출량은 31.5~468.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 데옥시니발레놀은 곡물에서 주로 발생하는 곰팡이독

Table 1. Operational parameters of LC-MS/MS for analysis of mycotoxins.

Instrument	Parameter	Conditions							
	Column	Luna C18(2)(150 × 3.0 mm, 3 μm)							
	Mobile phase	A : Distilled water(0.1% acetic acid) B : Methanol 0.1% acetic acid)							
LC	Gradient	Time(min)	0	3	5	10	18	23	25
		Solvent A(%)	70	70	60	30	30	20	70
	Flow rate	0.3 mL/min							
	Injection volume	10 μl							
MS	Curtain gas	30.0 psi							
	Ionspray voltage	-4,500 V(Negative), 5,500 V(Positive)							
	Temperature	500°C							
	Ion source gas 1	50 psi							
	Ion source gas 2	50 psi							

소로 Ok 등(9)의 연구에서 우리나라 백미 내 테 옥시니발레놀이 43% 오염된 것으로 분석되었고, Soleimany 등(11)은 말레이시아에서 판매되는 밀과 옥수수에서 50%의 오염율을 보고하였다. 현재 우리나라와 유럽연합의 시리얼류의 테옥시니발레놀 기준은 500 µg/kg, 곡물에서는 1000 µg/kg 이 하이다(4, 12). 시리얼에서 아플라톡신의 오염은

56.3%, 41%, 9% 등으로 보고되었으나(8, 13, 14), 본 연구에선 아플라톡신은 검출되지 않았다. 시리얼의 재료인 곡물의 생산지, 보관 및 유통 상태 등에 따라 혹은 분석방법, 시료 종류, 시료 수 등에 의해 이러한 차이가 있을 수 있다. 아플라톡신은 고온다습한 열대나 아열대지방에서 생성된 농산물에서 주로 보고되고 있고(1), 시리얼에서

Table 2. MS/MS parameters for mycotoxins detection using the multiple reaction monitoring (MRM) method

Analyte	MW ¹⁾	Parent ion ²⁾	Product ion ³⁾	DP ⁴⁾	EP ⁵⁾	CEP ⁶⁾	CE ⁷⁾	CXP ⁸⁾
Deoxynivalenol (DON) ⁹⁾	296.32	355.30	58.8	-20	-3.0	14.0	-34.0	-4.0
			295.1	-20	-3.0	14.0	-12.0	-4.0
Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	312.06	313.03	285.2	71.0	9.0	14.0	29.0	4.0
			241.0	71.0	9.0	14.0	49.0	4.0
Aflatoxin B ₂ (AFB ₂)	314.07	315.04	287.2	66.0	11.0	16.0	35.0	4.0
			259.2	66.0	11.0	16.0	41.0	4.0
Aflatoxin G ₁ (AFG ₁)	328.05	329.05	243.2	66.0	10.0	16.0	35.0	4.0
			200.1	66.0	10.0	16.0	55.0	4.0
Aflatoxin G ₂ (AFG ₂)	330.05	331.08	313.2	61.0	12.0	18.0	31.0	4.0
			128.2	61.0	12.0	18.0	89.0	4.0
Ochratoxin A (OTA)	403.08	404.03	239.1	41.0	8.0	20.0	29.0	4.0
			220.9	41.0	8.0	20.0	47.0	4.0
Zearalenone (ZEA)	318.14	316.99	131.0	-60.0	-4.0	-18.0	-40.0	0.0
			174.9	-60.0	-4.0	-18.0	-34.0	-2.0
Fumonisin B ₁ (FB ₁)	721.38	722.37	334.3	71.0	12.0	32.0	51.0	6.0
			352.3	71.0	12.0	32.0	47.0	6.0
Fumonisin B ₂ (FB ₂)	705.39	706.36	336.4	71.0	12.0	30.0	49.0	6.0
			318.3	71.0	12.0	30.0	55.0	4.0

1) Molecular weight

2) Mass number/charge number(m/z) of precursor ion

3) Mass numver/charge number(m/z) of product ions

4) Declustering potential

5) Enterance potential

6) Collision cell enterance potential

7) Collision energy

8) Collision cell exit potential

9) Abbreviation of mycotoxin

곰팡이독소의 종류와 함량은 각기 다른 곡물 재료와 이들의 혼합비율 차이이며, 시리얼에 부재료로

첨가된 건조파일, 견과류 또한 곰팡이독소 오염의 원인이 될 수 있다.

Table 3. Regression curve of mycotoxins

Mycotoxin	Regression equation	Liner range($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2
DON	$y = 806x + 597$	4 ~ 80	0.9990
AFB ₁	$y = 5630x + 2540$	0.6 ~ 12	0.9999
AFB ₂	$y = 4150x + 243$	0.6 ~ 12	0.9995
AFG ₁	$y = 3120x + 234$	0.6 ~ 12	0.9990
AFG ₂	$y = 2870x + 626$	1.2 ~ 24	0.9997
FB ₁	$y = 1880x + 880$	2 ~ 40	0.9996
FB ₂	$y = 4550x - 440$	2 ~ 40	0.9999
ZEA	$y = 9740x - 1670$	1 ~ 20	0.9999
OTA	$y = 2500x - 599$	1 ~ 20	0.9999

Table 4. Limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) of mycotoxins(n=5)

Mycotoxin	LOD ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery(average \pm RSD, %)			
			2 \times LOQ		10 \times LOQ	
			Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
DON	4.41	14.56	109.62 \pm 2.79	111.90 \pm 2.88	70.89 \pm 3.09	70.59 \pm 0.60
AFB ₁	0.88	2.90	88.85 \pm 2.70	87.27 \pm 1.68	87.05 \pm 1.53	90.42 \pm 5.00
AFB ₂	1.20	3.96	83.80 \pm 3.34	83.90 \pm 1.85	88.90 \pm 2.80	89.30 \pm 3.66
AFG ₁	0.95	3.14	92.60 \pm 5.26	94.07 \pm 1.52	89.35 \pm 3.04	90.62 \pm 3.47
AFG ₂	1.68	5.54	88.80 \pm 3.63	91.37 \pm 2.76	87.05 \pm 2.21	92.15 \pm 5.79
FB ₁	4.18	13.81	62.99 \pm 6.21	67.62 \pm 13.43	104.88 \pm 7.25	114.56 \pm 7.88
FB ₂	2.52	8.32	69.59 \pm 5.81	72.37 \pm 9.77	107.83 \pm 5.01	116.28 \pm 6.31
ZEA	1.37	4.51	108.17 \pm 2.23	109.83 \pm 2.50	91.93 \pm 0.70	90.99 \pm 1.24
OTA	0.52	1.72	106.61 \pm 4.67	108.05 \pm 1.42	89.14 \pm 2.89	91.07 \pm 2.53

1) Limit of detection(LOD) = $3.3 \times 8/S$

2) Limit of quantitation(LOQ) = $10 \times 8/S$

δ : Standard deviation of response, S : slope of the calibration curves

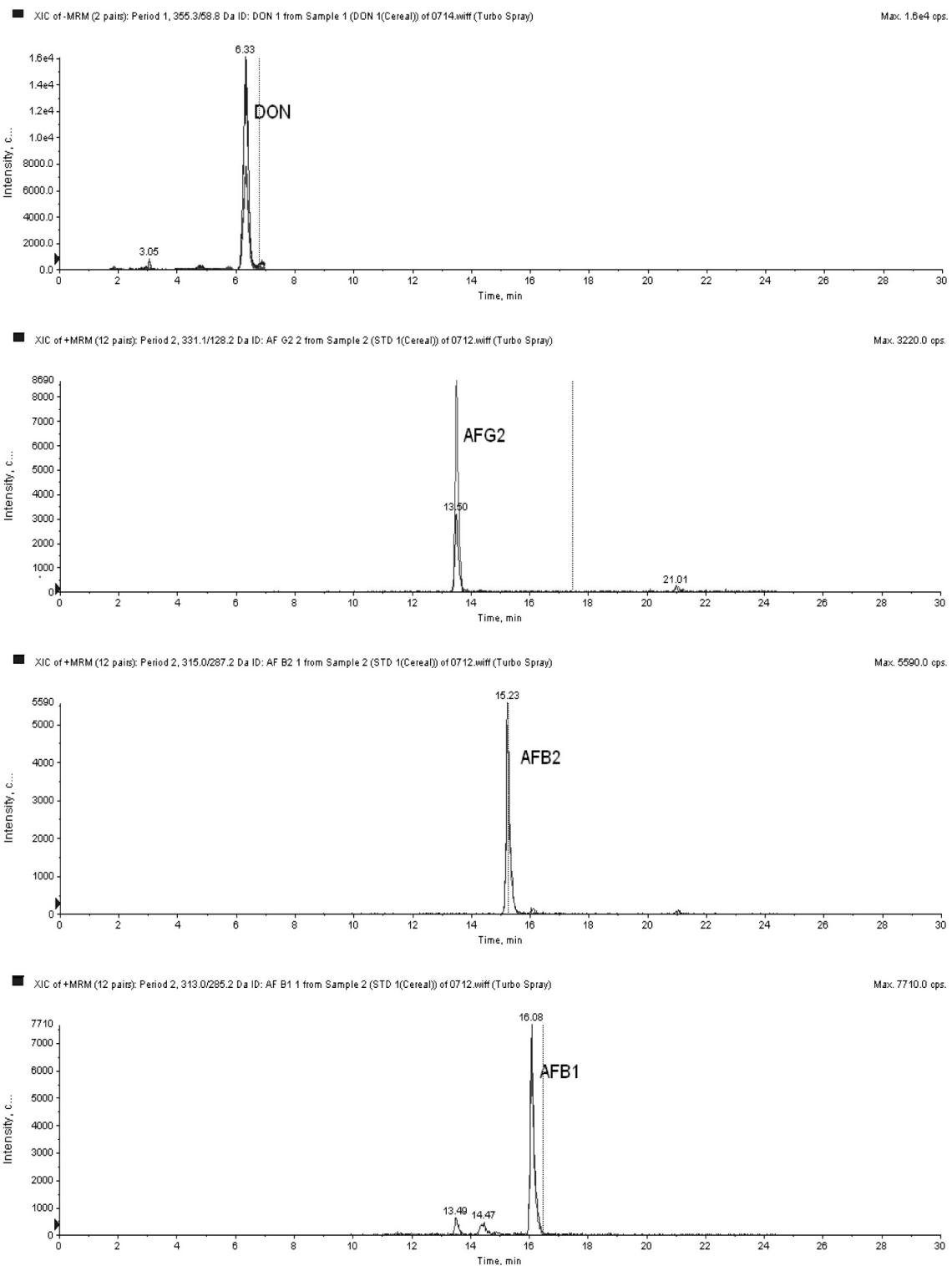


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of mycotoxins(Deoxynivalenol: 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Aflatoxins: 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Fumonisins: 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Zearalenone 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and Ochratoxin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

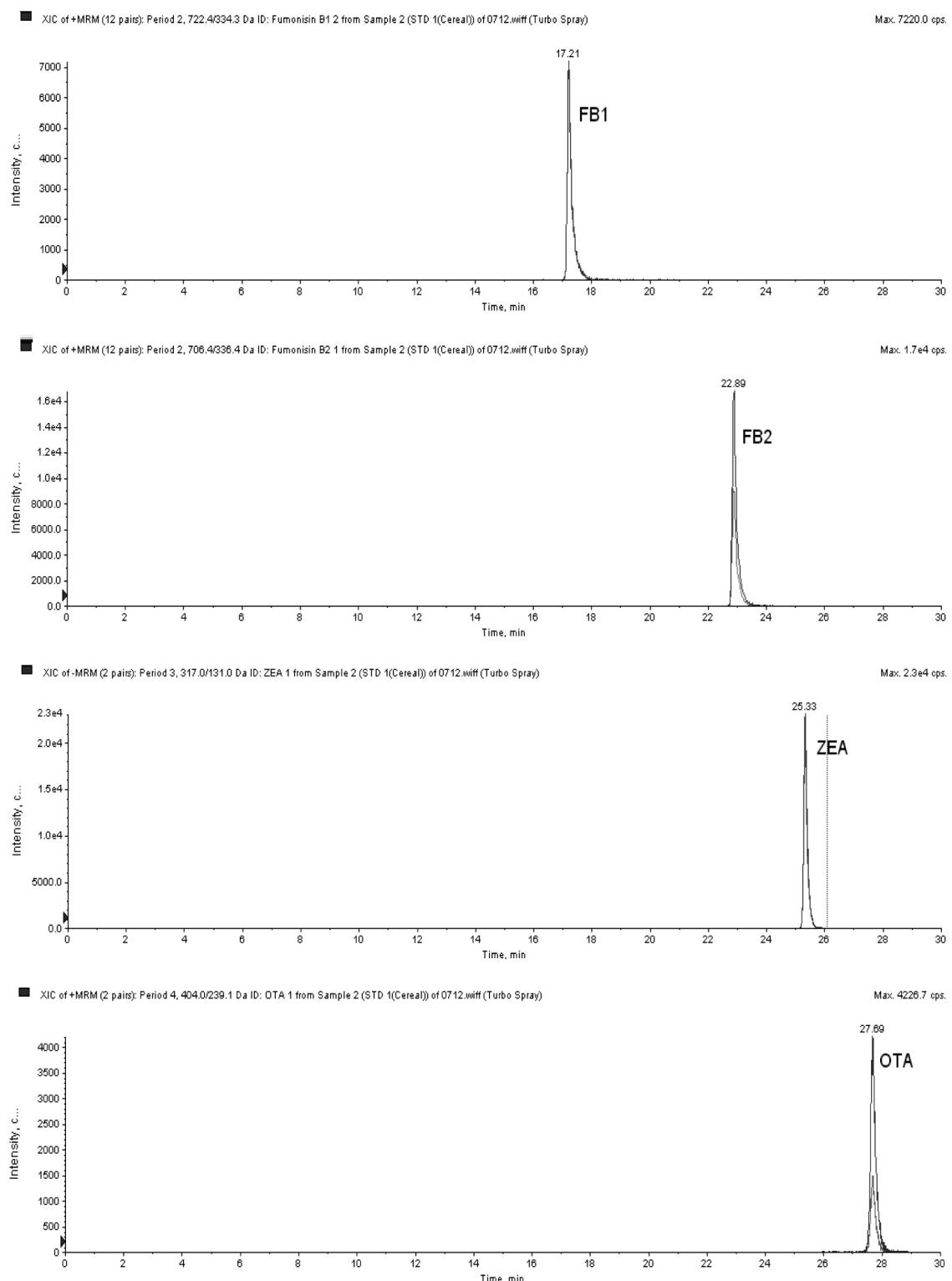


Fig. 1. (Continued)

푸모니신은 24건에서 검출되어 검출빈도가 가장 높았으며 검출량은 13.4~114.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 푸모니신은 옥수수에 오염되기 쉬운 곰팡이독소로서 원료인 옥수수뿐만 아니라 이를 주원료로 가공한 식품에서도 푸모니신이 높게 검출된다. 우리나라의 푸모니신 기준 적용 대상품목은 옥수수 및 옥수수 가공품, 시리얼에 설정되어 있고, 옥수수의 가공 정도, 함유량, 용도 등에 따라 1,000에서 4,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 까지 다양하다(4). 곰팡이독소 기준을 두고 있는 나라 중 유럽연합은 다른 나라들보다 푸모니신 허용치가 상대적으로 엄격하여 200에서 4,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 까지이다(12). 오크라톡신 A는 4건에서 6.3~9.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 검출되었다. Villa and Markaki(13)는 그리스에서 판매되는 55건의 시리얼 중 33건의 시리얼에서 오크라톡신 A가 평균 0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 검출되었다고 보고하였고, Araguás

등(15)은 스페인에서 판매되는 21건의 시리얼 중 19건의 시리얼이 평균 1.84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 검출되었음을 보고하였다. 또 Molinie 등(16)의 연구에선 프랑스에서 판매되는 45건의 시리얼 중 31건의 시리얼에서 오크라톡신 A에 오염되는 등 시리얼에서 오크라톡신 A의 검출률이 본 연구보다 높았다. 우리나라 및 유럽연합의 곡류에서 오크라톡신 A의 기준은 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하이나 곡류를 가공하여 제조한 곡류가공품, 과자, 시리얼류에 대해 우리나라의 기준이 없고 유럽연합은 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 우리나라에서도 기준 미설정 품목에 대한 기준설정이 필요하다. 제랄레논은 7건 검출되었으며 검출량은 9.7~75.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 검출되었다. 우리나라 및 유럽연합에서 제랄레논은 시리얼류 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 기준이 설정되어 있으며 본 실험에서 2건에서 51.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 76.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 시리얼류 기준보다 높게

Table 5. Performance criteria for mycotoxins established by the EU

Mycotoxin	Level($\mu\text{g}/\text{kg}$)	%RSD	Recovery(%)
DON	>100~≤500	≤20	60~110
	>500	≤20	70~120
AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	1~10	-	70~110
	>10	-	80~110
FB ₁ , B ₂	≤500	≤30	60~120
	>500	≤20	70~110
ZEA	≤50	≤40	60~120
	>50	≤25	70~120
OTA	<1.0	≤40	50~120
	1~10	≤20	70~110

Table 6. Occurrence and concentration of mycotoxins in 105 cereals

	DON	AFs	FBS	OTA	ZEA
Detected range($\mu\text{g}/\text{kg}$)	125.1~352.5	-	13.9~114.6	6.3~9.4	9.7~76.6
Ave. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	243.7	-	46.96	8.2	28.5
Positive sample(%)	5.7	-	22.9	3.8	6.7

검출되었다. 105건의 시리얼 중 3건에서는 3가지 곰팡이독소(데옥시니발레놀, 푸모니신, 제랄레논)가 동시 검출되었고, 1건에서 데옥시니발레놀과 푸모니신이, 또 다른 1건에서는 데옥시니발레놀과 제랄레논이 동시 검출되었다. 푸모니신을 생산하는 *Fusarium* species는 데옥시니발레놀과 제랄레논 같은 곰팡이 독소를 생산하므로(1, 7, 8), 동시에 오염될 수 있다. 정(1)의 연구에서도 제랄레논이 검출된 곡류 30건 중 10건에서 푸모니신이 동시 검출되었고, 김(7)은 제랄레논과 푸모니신이 동시에 오염된 곡류에 대해 보고하였다. 곰팡이독소가 2종 이상 검출된 시리얼은 총 5건으로 그 중 3건은 모두 유기농 제품이었다. 유기농 제품이 식품의 안전성 측면에서 우수 할 것이라는 예상과 달리 Nguyen 등(17)은 유기농 시리얼에 오크라톡신이 20% 오염되었다고 보고하였고, Juan 등(18)은 유기농 곡물에서 곰팡이독소 동시검출을, Vidal 등(19)은 유기농 보리에서 데옥시니발레놀 1,111.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 검출을 보고하였다. 진균제나 살충제 같은 농약을 사용하지 않고 재배한 유기농 제품이 일반 제품보다 곰팡이독소 오염이 더 크다는 연구도 있고(17), 반대로 일반 제품의 곰팡이독소 오염이 더 크다는 연구도 있다(20). 본 연구에서는 유기농 시리얼의 개수가 5개, 일반 시리얼의 개수가 100개로 두 군의 차이를 비교하기에는 무리가 있으므로 향후 유기농 곡물, 유기농 곡물 가공식품을 중심으로도 곰팡이독소 오염에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

결 론

LC-MS/MS와 SPE 컬럼을 이용하여 곰팡이독소 동시분석법을 확립하고 이 방법을 시리얼 중 곰팡이독소 모니터링에 적용하였다. 각 곰팡이독소의 상관계수(R^2)는 0.9990 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. 곰팡이독소를 정량한계 2배, 10배로 시리얼에 첨가한 평균 회수율은 62.99~116.28%였고, EU가 제시하는 유효성 검증을 위한 기준을 만족함으로써 시험법의 신뢰성을 확보할 수 있었다. 또 면역친화성 컬럼으로 독소별로

개별분석 했던 것을 한 개의 SPE 컬럼으로 다성분의 곰팡이독소를 분석하여 효율적이었다. 그러나 데옥시니발레놀은 수용성이므로 다른 곰팡이독소와 달리 별도로 추출, 정제해야 하므로 데옥시니발레놀을 제외한 아플라톡신, 푸모니신, 오크라톡신 A, 제랄레논을 동시분석 하는 것이 시간, 경제적 측면에서 더 효율적일 것으로 생각된다.

105건 중 33건(31.4%)에서 곰팡이독소가 검출되었으며 아플라톡신은 검출되지 않았고 푸모니신, 데옥시니발레놀의 검출량은 기준 이내였으나, 제랄레논은 시리얼류 기준(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하)을 초과하는 제품이 2건이었으며, 오크라톡신 A의 경우 4건에서 곡류기준(5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하)보다 높게 검출되어 기준 미설정 품목에 대한 기준설정이 필요하였다.

유기농 제품이 유해요소로부터 안전할 것이라는 인식과 달리 유기농 시리얼에서 두 가지 이상의 곰팡이독소가 검출되어 유기농 곡물을 원료로 한 가공품을 중심으로 모니터링이 필요한 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 정삼주, 조성애, 김동규, 정선옥, 김경식, 한기영 : 농산물 중 곰팡이독소 오염실태 조사, 서울시보건환경연구원보, 48:35~45, 2012.
2. Safety Evaluation of Certain Mycotoxin in Food, WHO Food Additives Series 47/FAO Food and Nutrition paper 74, World Health Organization (WHO)/Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). Geneva, Switzerland, 2001.
3. 박지원, 유명상, 국주희, 지영애, 이진하 : 식품 중 아플라톡신과 오크라톡신 A의 동시분석법 개발 및 모니터링, 2013. 식품의약품안전처, 식품공전, 28:75~82, 2014.
4. 강길진, 김혜정, 이연경, 정경희, 한상배, 박선희, 오혜영 : 식품 중 곰팡이독소 안전기준 관리. 한국식품위생안전학회지, 25:281~

- 288, 2010.
5. Duncan K, Kruger S, Zabe N, Kohn B and Prioli R : Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2 and B3. *J Chromatogr A*, 815:34~41, 1998.
 6. 김동호, 장한섭, 최규일, 김현정, 김호진, 김효린, 조현정, 이찬 : 한국산 곡류에서의 곰팡이독소 오염현황 및 동시분석. *한국식품과학회지*, 45:111~119, 2013.
 7. Ibáñez-Vea M, Martínez R, González-Peña E, Lizarraga E and López de Cerain A : Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. *Food Control*, 22:1949~1955, 2011.
 8. Ok HE, Choi SW, Chang HJ, Chung MS and Chun HS : Occurrence of five 8-ketotrichothecene mycotoxins in organically and conventionally produced cereals collected in Korea. *Food Control*, 22: 1647~1652, 2011.
 9. Rosa Montes, Ramón Segarra and María-Ángeles Castillo : Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. *J. Food Compos. Anal.*, 27:38~44, 2012.
 10. Soleimany F, Jinap S and Abas F : Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, 130:1055~1060, 2012.
 11. European Commision. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Commission Regulation(EC) No. 401/2006. Brussel, Belgium. 2006.
 12. Shahzad Zafar Iqbal, Tehmeena Rabbani, Muhammad Rafique Asi, S.Jinap : Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. *Food Chem.*, 157:257~262, 2014.
 13. Polixeni Villa and Panagiota Markaki : Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurrence and risk assessment. *Food Control*, 20:455~461, 2009.
 14. Araguás C, González-Peña E and López de Cerain A : Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chem.*, 92:459~464, 2005.
 15. Molinié A, Faucet V, Castegnaro M and Pfohl-Leszkowicz A : Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: Development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem.*, 92:391~400, 2005.
 16. Nguyen KTN and Ryu DJ : Concentraion of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States. *Food Control*, 40:140~144, 2014.
 17. Juan C, Ritieni A and Mañes J : Occurence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chem.*, 141:1747~1755, 2013.
 18. Vidal A, Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G and Sanchis V : Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food Chem Toxicol.*, 53:133~138, 2013.
 19. Cirillo T, Ritieni A, Visone M and Cocchieri R A : Evaluation of conventional and organic italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.*, 51:8128~8131, 2003.