

사료 중 Nivalenol, Deoxynivalenol, T-2 toxin과 Zearalenone의 동시분석과 오염도조사

김동호 · 김현정 · 장한섭 · 김영민 · 최홍보 · 안중성*
국립농산물품질관리원 시험연구소

Simultaneous Analysis and Survey for Contamination of Nivalenol, Deoxynivalenol, T-2 toxin and Zearalenone in Feed

Dong-ho Kim, Hyun-jung Kim, Han-sub Jang, Yeong-min Kim, Heng-bo Choi, and Jong-sung Ahn*
National Agricultural Products Quality Management Service, Seoul Korea
(Received August 30, 2010/Revised October 7, 2010/Accepted January 17, 2011)

ABSTRACT - Nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), T-2 toxin (T-2) and zearalenone (ZEN) are mycotoxins produced by some *Fusarium* species known to be very frequently contaminated in feed. The study for simultaneous analysis and contamination survey in animal feed carried out. All mycotoxins were analysed by using high performance liquid chromatography tandem mass with internal standard. The limits of detection (LOD) were 2.0 µg/kg, 1.0 µg/kg, 1.0 µg/kg and 0.1 µg/kg for NIV, DON, T-2 and ZEN, respectively. Two hundred and thirty nine samples of feed were collected. The average concentration of DON was 212.3 µg/kg, 207.8 µg/kg and 812.1 µg/kg in chicken, pig and cattle feed, respectively. The average concentration of ZEN was 31.2 µg/kg, 35.6 µg/kg and 147.2 µg/kg for them, respectively. Especially, the levels of contamination for DON and ZEN were higher than those of NIV or T-2. And, the levels of contamination for four *Fusarium* mycotoxins in cattle feed appeared higher than those of pig and chicken feed. It was investigated that the high level of mycotoxin contamination in cattle feed was caused by corn gluten feed of ingredients for feed, mainly.

Key words : Mycotoxin, Nivalenol, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 toxin, Feed

곰팡이독소(Mycotoxin)는 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 사람과 동물에게 급성 또는 만성 장애를 일으키는 유해물질이다^{1,17,18}. 곡류, 두류, 서류 등 농산물의 생산, 수확, 저장, 유통과정에서 생성되며, 현재까지 aflatoxins (AFs), ochratoxin A (OTA), fumonisins (FUMs), nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), zearalenone(ZEN), T-2 toxin (T-2) 등 400여 종이 알려져 있다^{1,6}.

이러한 곰팡이독소가 발생되면 농산물의 생산량과 품질이 떨어지고, 이에 노출된 농산물 또는 사료를 사람이나 가축이 섭취하게 되면 그 독성으로 인하여 간장, 신장, 신경 등에 장애를 일으키고 심하면 사망에 이르게 된다¹¹. 우리나라에서는 식품 중에 AFs 과 patulin을 규제독소로 지정하여 관리해 오다 최근 곰팡이독소에 대한 연구가 활발해 지고 세계각국이 그 관리를 강화해 나가는 추세에 따라, OTA,

FUMs, DON, ZEN으로 그 관리항목을 증가시켰다. 사료 중에서는 현재 AFs과 OTA만이 유해물질로 지정되어 관리되고 있다. 하지만, 사료는 식품에 비해 독소오염 우려가 높은 저급 곡물을 주원료로 사용할 뿐만 아니라, 이러한 곰팡이독소는 그 특성상 여러 가지 성분이 동시에 발생되어 상승작용을 일으키게 된다³. 따라서 다양한 곰팡이독소에 대한 동시 오염 실태 파악 등 연구가 필요하다. 특히 푸사리움 독소들은 이미 옥수수, 사료 등 여러 시료에서 동시다발 오염이 확인되고 있으며, 국내외적으로 관리를 강화해 나가고 있는 곰팡이독소들이다¹⁸. 이에 따라 푸사리움 독소 중 trichothecene계열인 NIV, DON, T-2와 ZEN에 대하여 사료 중 그 오염실태 조사를 실시하였다.

NIV과 DON은 B type trichothecenes으로 물에 잘 녹고 주로 밀, 옥수수, 사탕수수, 보리 등에 *Fusarium graminearum* 과 *F. culmorum*에 오염되어 생성되는 곰팡이독소이다³. 외국에서는 맥류에서 NIV의 오염도가 DON보다 낮은 것으로 보고되고 있으나 우리나라에서는 더 높은 오염도를 보이는 것으로 보고되고 있다. DON이 오염된 사료를 먹인 가

*Correspondence to: Jong-sung Ahn, 560. 3-Ga, Dangsan-Dong, Youngdeungpo-Gu, Seoul Korea
Tel: 82-2-2165-6141, Fax: 82-2-2165-6008
E-mail: Ajhn@naqs.go.kr

축에서 사료섭취 거부, 증체량 감소, 면역기능 저하 뿐만 아니라 구토증상(vomit)이 나타나 vomitoxin으로 불리기도 한다^{2,18-20}. DON은 인축의 면역을 저하시키는 곰팡이독소로 발효 등 식품가공 과정에서 파괴되지 않아 맥주 등에서도 종종 검출되기도 한다³. 돼지에 가장 민감한 것으로 보고되고 있으며, 반추동물에는 상대적으로 저항성이 있는 것으로 보고 되고 있다^{3,19,20}.

T-2는 A type trichothecene으로 B type보다 독성이 더 강하다. 2차 대전 전후 소련에서 겨울이 지난 곡물로 만든 빵을 섭취한 사람들이 장기에서 내출혈을 일으키고, 무백혈구증(alimentary toxic alenkia, ATA)과 관련 있는 물질이 T-2로 밝혀졌다¹⁸.

ZEN은 밀, 옥수수, 사탕수수, 보리 등에 *F. graminearum*과 *F. culmorum*에 오염되어 생성되는 곰팡이 독소이다³. ZEN의 화학구조는 여성 호르몬인 에스트로겐과 비슷하여 이 독소를 섭취한 가축은 발정증후군(estrogenic syndrome)을 일으켜 주로 불임, 유선종대, 고환위축 등 생식기관에 대하여 독성을 나타낸다¹⁸. 특히 돼지에 민감하며⁴, 암퇘지는 매우 적은 양으로도 발정지연, 불임, 미숙아 생산, 유산 등의 증상을 보이는 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 239점의 국내 제조 사료에서 위의 4가지 푸사리움 독소(NIV, DON, T-2, ZEN)를 HPLC/MS/MS (high performance liquid chromatography/mass/mass)를 이용하여 동시 분석하였다. 기존의 곰팡이독소 분석에는 주로 면역친화컬럼(immunoaffinity column)을 이용한 HPLC법을 이용하였으나, 이 방법은 정제효율은 좋으나 대부분 단 성분 분석에 적합하고 고가이기 때문에 비용이 많이 소요되는 등의 문제가 있다. 최근 LC/MS/MS기술의 발전에 따라 일반 정제용 SPE (solid phase extraction) 컬럼으로 정제한 후 바로 질량분석기로 동시 분석하는 기술이 더욱 더 발전하고 있다^{3,5,10,19}. 본 연구에서도 베리안(Varian)사의 SPE 컬럼(bond elut mycotoxin)으로 4종의 곰팡이독소를 정제한 후 내부 표준법을 이용한 질량분석법으로 동시 분석하였으며, 그 조사결과를 바탕으로 안전사료 생산 및 곰팡이독소 오염 저감화에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

시료

2009년도에 생산된 국내 유통사료 239점을 시료로 사용하였다. 사료검사기관인 우리나라의 16개 시·도에서 농산물품질관리원에 사료관리법에 따라 검정을 의뢰한 시료 중 206점과 배합 사료공장에서 직접 수거한 단미 사료 33점이었다. 206점은 시·도 구분 없이 소 사료 60점, 돼지 사료 60점, 닭 사료 40점과 식물성 단미 사료 46점이 무작위로

선정되었다. 자체 수거한 단미 사료 33점은 배합 사료 분석결과 DON과 ZEN이 각각 1,000 µg/kg와 200 µg/kg 이상 검출된 사료 (시료 6점)를 생산한 업체에서 직접 채취한 것이었다.

시약 및 기기

(1) 시약

표준물질로 sigma사의 nivalenol (200 µg/ml, 2 ml and 5 mg, USA), deoxynivalenol (200 µg/ml, 2 ml and 5 mg, USA), T-2 toxin (5 mg, USA), zearalenone (5 mg, USA)을 사용하였으며, 내부 표준물질로 deoxynivalenol의 대사산물인 deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1, 200 µg/ml, 2 ml, USA)와 zearalenone의 대사산물인 zearalanone (ZAN, 200 µg/ml, 2 ml, USA)을 sigma사에서 구입하였다. 시료 추출용 시약으로 merck사의 HPLC급 acetonitrile (Germany), 시료 정제용 SPE cartridge로 varian사의 bond elut mycotoxin (USA) 컬럼을 사용하였다. 이동상 제조시 sigma사의 ammonium acetate (1 kg, USA)를 추가하여 사용하였다.

(2) 표준용액

동시분석용 표준용액으로 NIV, DON, T-2 toxin, ZEN 각각을 acetonitrile을 사용하여 1,000 µg/ml, 5,000 µg/ml, 5,000 µg/ml, 1,000 µg/ml로 만든 후 적당량을 혼합하여 조제하였다. 이 액과 증류수(dw)를 이용하여 복합 표준물질을 만든 후 다시 20% acetonitrile로 희석하여 사용하였다. 검량선 작성 표준용액의 농도는 NIV, DON, T-2 toxin이 10, 50, 250, 500 µg/l, ZEN은 0.5, 2.5, 12.5, 25 µg/l수준으로 조정하여 사용하였으며, 내부 표준물질은 DOM-1과 ZAN이 시약에서 각각 500 µg/l와 20 µg/l가 되도록 첨가하여 사용하였다.

(3) 기기 및 장치

4종의 푸사리움 독소 동시 분석을 위하여 agilent 1200 series HPLC가 부착된 applied biosystems사의 Q TRAP 3200 질량분석기를 사용하였다. YMC C18 컬럼(4.6 × 150 mm, 3 µm)과 guard 컬럼(C18, 3.5 µm)을 사용하였으며, 기 타장비로 시료분쇄기(Perten, Sweden), homogenizer (OMNI, USA), 화학천칭(Sartorius, USA), 원심분리기 (한일, Korea), 시험관 교반기, vacuum system (Agilent, USA), Mili-Q RiOs/Elix water purification system (Millipore, USA)를 사용하였다.

실험방법

시료의 전처리

시료 25 g을 잘 분쇄하여 100 ml의 acetonitrile:dw (80:20; v/v)을 넣고, homogenizer를 10,000rpm으로 2분간 회전시켜 NIV, DON, T-2, ZEN을 추출하였다. 추출액을 whatman No. 4여과지로 여과한 후 여과액 2 ml를 12 ml 유리관에 옮겨

담았다. 이 액에 내부 표준물질인 DOM-1과 ZAN을 시액에서 500 µg/l와 20 µg/l가 되도록 50 µg/ml DOM-1 10 µl와 1 µg/ml ZAN 20 µl를 각각 넣었다. 이 액 2 ml를 bond elut mycotoxin에 통과시키고, 다시 추가로 2 ml의 80% acetonitrile 액을 통과시켰다. 중력에 의한 자유낙하가 잘 안되는 경우 진공을 걸어 추출하였으며, 컬럼을 통과한 액 모두를 50°C에서 질소로 증발 건조시켰다. 1 ml의 20% acetonitrile로 다시 녹여 0.22 µm 시린지 필터로 여과한 후 시액으로 사용하였다.

분석흐름도는 Fig. 1과 같다.

기기분석 조건

Agilent HPLC가 연결된 LC/MS/MS를 사용하였다. 컬럼은 YMC-Pack pro C18 RS (150 × 3.0 mm, 3 µm)를 사용하였으며, 이동상은 A용액(5 mM ammonium acetate/dw)과 B용액(5 mM ammonium acetate/acetonitrile)의 구배조건 (gradient)을 사용하였다. 유속은 0.3 ml/min, 컬럼 온도 25°C, 주입량 10 µl로 하였다. FIA (flow injection analysis)를 통하여 각각의 성분에 대한 최적의 compound parameter를 선택하였다. NIV, DON, ZEN은 negative mode에서 더 좋은 이온화를 보였으며, T-2 toxin은 positive mode에서 최적의 이온화 경향을 보였다. 따라서 분석물질의 성질에 따라 retention time 11분까지는 negative모드로 NIV와 DON을 분석하였고 11분에서 12.6분까지는 positive mode로 T-2 toxin을 분석하였으며, 다시 12.6분 이후에는 negative 모드로 변환하여 ZEN을 분석하였다. negative mode의 ion source 조건은 curtain gas (CUR):20, collision gas (CAD):medium, ion spray voltage (IS):-4500, tem:500, ion GS1:50, ion GS2:50이었으며, positive mode의 ion source 조건은 ion spray voltage (IS)만이 5500V로 negative mode와 달라하였다. 각각의 성분에 대한 MRM쌍과 compound parameter는 Table 1과 같다.

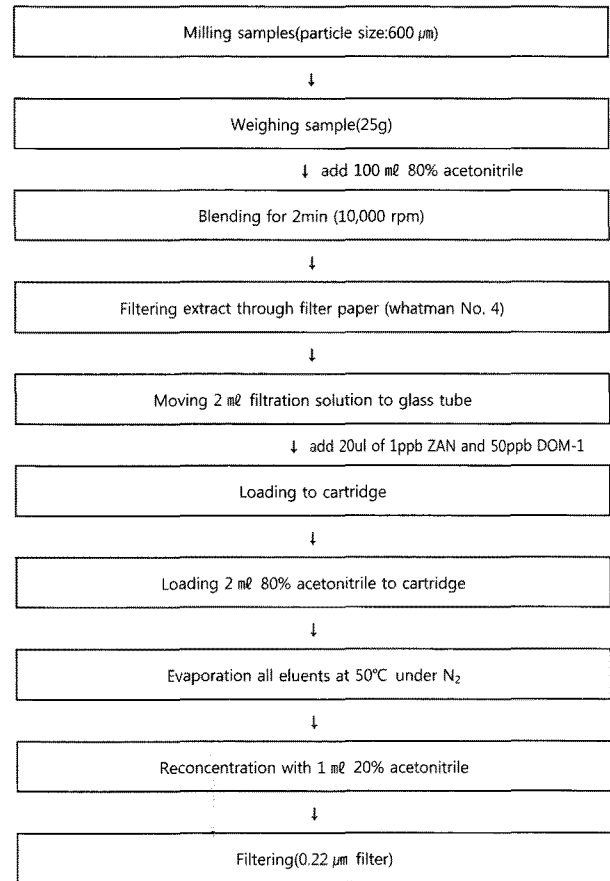


Fig. 1. Simultaneous analysis of 4 mycotoxins derivertized from *Fusarium* spp. by LC/MS/MS.

각각의 성분에 대한 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

회수율 실험

4종의 푸사리움 독소(NIV, DON, T-2, ZEN)의 회수율 실험을 위하여 독소가 오염되지 않은 대두박에 NIV, DON, T-

Table 1. Conditions of MS/MS

Mycotoxins	Conditions							
	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP	EP	CEP	CE	CXP
NIV	371.1	311.1	150	-30	-8	-14	-12	-4
	371.1	281.1	150	-30	-8	-14	-14	-4
DON	355.1	265.3	150	-25	-3	-42	-16	-4
	355.1	138	150	-25	-3	-42	-32	0
T-2	484.1	215.2	150	21	6	25	29	4
	484.1	185.2	150	21	6	25	31	4
ZEN	317.1	131	150	-50	-4.5	-20	-40	-2
	317.1	175	150	-50	-4.5	-20	-34	-2
ZAN	319.1	275	150	-55	-4	-21	-28	-2
	319.1	205	150	-55	-4	-21	-34	-2
DOM-1	339.1	231	150	-25	-6	-21	-17	-4
	339.1	249.2	150	-25	-6	-21	-16	-4

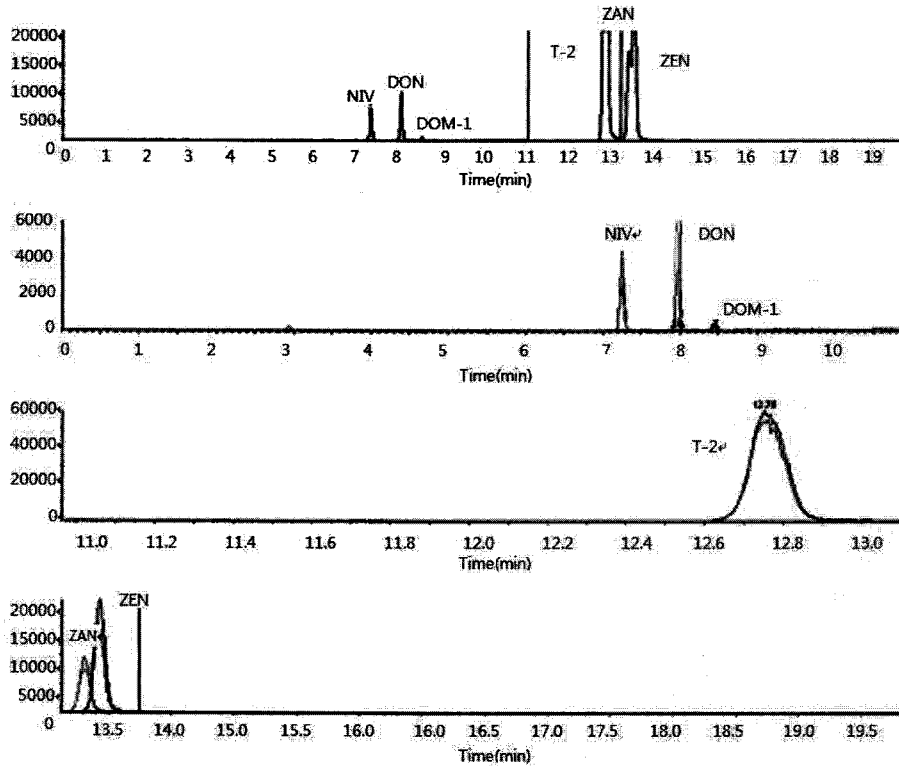


Fig. 2. Chromatogram of 4 mycotoxins (NIV, DON, T-2 : 250 µg/l, ZEN : 12.5 µg/l).

2는 50, 100, 250 µg/kg을 ZEN은 2.5, 10, 25 µg/kg이 되도록 각각 가한 후 앞의 MS/MS 방법에 따라 3회 반복하여 측정하였다.

검출한계 및 정량한계 측정

NIV, DON, T-2, ZEN의 검출한계는 signal/noise (S/N) 비율이 3:1 기준으로 측정하였으며 정량한계는 S/N 비율이 10:1 기준으로 측정하였다.

검량과 계산

검량선 작성을 위하여 각각의 독소들을 적당히 혼합하여 NIV, DON, T-2 toxin은 500 µg/kg가 되도록, ZEN은 25 µg/kg가 되도록 만들고 이것을 20% acetonitrile로 희석하여 각각 10, 50, 250 µg/kg와 0.5, 2.5, 12.5 µg/kg가 되도록 하여 표준용액을 준비하였다. 각 표준용액을 HPLC와 LC/MS/MS에 주입하여 피크의 면적을 계산하였고 각 표준품의 양에 대한 각 피크의 면적을 그래프로 계산함으로써 검량선을 작성하였다.

결 과

분석방법 검증

검량선 작성

본 연구에서는 내부 표준법(internal standard, IS)을 이용

한 LC/MS/MS 분석을 이용하였다. DON의 대사물질인 DOM-1을 같은 trichothecene계열의 DON, NIV와 T-2 toxin을 위한 내부 표준물질로 사용하였고, ZEN의 대사물질인 ZAN을 ZEN의 내부 표준물질로 이용하였다. DOM-1과 ZEN은 모두 생체 대사산물로 외부환경에서 자연적으로 생성되지 않기 때문에 이론적으로는 곡류나 사료에 오염되어 있을 확률은 없다.

표준물질로 NIV, DON, T-2는 10, 50, 250, 500 µg/kg, ZEN은 0.5, 2.5, 12.5, 25 µg/kg의 범위에서 20% Acetonitrile로 희석하여 사용하였으며 내부 표준물질인 DOM-1과 ZAN이 각각 500과 20 µg/kg가 되도록 추가한 후 내부 표준법에 따라 검량선을 작성하였다. 상관계수는 0.9993~0.9998의 직선성을 보였다.

회수율과 정밀성

NIV, DON, T-2, ZEN의 회수율은 아래의 표에서 보듯이 77.42~111.20%로 1~10 ng/g수준에서 60~120%, 10~100 ng/g수준에서 70~110%, 100 ng/g이상에서 80~110%의 회수율을 제시하는 코덱스 가이드라인을 만족하였다. 상대표준편차(%RSD)도 1.91~13.88%로 각각의 농도에서 제시되는 15~30% 이내의 값을 모두 만족하였다.

정성정량한계

피크의 넓이가 S/N=3일 때를 기준으로 검출한계를 설정

Table 2. Accuracy and precision of 4 mycotoxins determined in fortified feed at three concentrations

	Average recovery (%)	SD	Mean SD	%RSD	Mean %RSD	Spiked (ng/g)
NIV	80.59	8.89		11.04		50
	77.42	1.48	4.87	1.91	6.05	100
	81.47	4.23		5.20		250
DON	95.6	13.27		13.88		50
	78.8	7.11	8.83	9.02	10.08	100
	83.27	6.11		7.34		250
T-2	83.07	16.21		19.51		50
	78.37	5.53	9.45	7.05	11.40	100
	86.68	6.61		7.62		250
ZEN	111.20	10.40		9.35		2.5
	108.69	6.90	7.18	6.35	6.63	10
	101.01	4.24		4.20		25

정하였고 S/N = 10일 때를 기준으로 정량한계를 설정하였다. NIV, DON, T-2, ZEN은 각각 2 µg/l, 1 µg/l, 1 µg/l, 0.1 µg/l의 검출한계를 보였으며, 정량한계는 각각 6 µg/l, 3 µg/l, 3 µg/l, 0.3 µg/l이었다.

분석결과

사료 오염도 조사 결과

총 239점의 사료에서 4종의 푸사리움 독소(NIV, DON, T-2, ZEN)을 분석한 결과 모든 시료에서 다양한 양상으로 검출되었으며, 자세한 오염도 조사결과는 Table 3과 같다.

위에서 보듯이 NIV는 배합 사료 중 닭 사료에서 다른 사료에 비해 그 오염 정도가 가장 낮았다. 그러나 T-2의 경우에는 닭 사료에서 평균 8.3 µg/kg, 최대 48.4 µg/kg으로 가장 높은 오염도를 보였다. 2009년도 각 시도에서 의뢰된 단미 사료와 닭 사료, 돼지 사료의 주 오염 곰팡이독소는 DON과 ZEN이었고, 오염도는 DON이 평균 200 µg/kg내외, ZEN이 평균 35 µg/kg내외를 보이는 등 비슷한 오염도를 나타내었다. 그러나 특이하게 소 사료에서는 DON이 평균 812 µg/kg, ZEN이 평균 147 µg/kg으로 4배 정도 높게 오염된 것으로 나타났다. 각 종 단미 사료의 혼합 과정으로 요약할 수 있는 배합 사료 제조공정에 따라 닭 사료와 돼지 사료는 의뢰된 단미 사료를 혼합하여 각각 닭과 돼지 사료를 만든 것으로 생각할 수 있었으나, 소 사료의 경우는 특이하게 오염 값이 높게 나타남으로써 소 사료에만 들어가는 곰팡이 독소에 많이 노출된 단미 사료가 있을 것으로 추측할 수 있었다. 앞서 말했듯이 배합 사료에서 상대적으로 독소에

Table 3. Incidence and levels of mycotoxins in feed

Feed	Toxin	Average (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Contamination rate (%)
Component (n=46)	NIV	7.1	109.4	19.6
	DON	173.2	3400.0	84.8
	T-2	16.7	522.0	28.3
	ZEN	41.4	480.0	93.5
Chicken (n=40)	NIV	1.0	33.6	5.0
	DON	212.3	908.0	100.0
	T-2	8.3	48.4	77.5
Pig (n=60)	ZEN	31.2	141.8	100.0
	NIV	8.2	91.8	46.7
	DON	207.8	1566.0	100.0
Cattle (n=60)	T-2	2.7	24.0	38.3
	ZEN	35.6	262.0	100.0
	NIV	12.3	122.2	53.3
Component (added, n=33)	DON	812.1	2940.0	100.0
	T-2	1.6	31.0	18.3
	ZEN	147.2	558.0	100.0
Component (added, n=33)	NIV	19.3	136.6	47.1
	DON	1300.6	8480.0	64.7
	T-2	3.0	30.8	17.7
	ZEN	286.3	1072.0	97.1

많이 오염된 사료를 선별하여 원료로 사용된 단미 사료를 추가로 조사하여 본 결과 일반적으로 사료관리법에 따라 각 지방자치단체에서 의뢰하는 단미 사료와 추가로 수거한 33점의 단미 사료의 종류가 상당히 다를 뿐만 아니라 표에서와 같이 기존에 분석한 단미 사료와 비교하여 높은 오염수치를 나타내었다. 자세한 조사결과는 아래에 기술하였다.

단미 사료

각 시도에서 의뢰한 단미 사료에서 NIV, T-2의 오염도는 미비하였으나 DON과 ZEN은 대부분의 시료에서 검출되었다. 광범위한 오염에 비하여 전체적으로 높은 오염수준은 보이지 않았다. 그러나 대두피의 경우 DON이 평균 720 µg/kg, 최대 3,400 µg/kg 의 오염도를 보였으며, ZEN은 평균 123 µg/kg, 최대 480 µg/kg 의 오염도를 보여 다른 종류의 단미 사료에 비하여 매우 높은 오염도를 보였다. 대두에도 푸사리움 속 곰팡이가 광범위하게 오염됨을 생각할 수 있었다. 대두박에서는 특이적으로 높은 오염도를 보이지는 않았다. 또한 옥수수 글루텐에서 NIV는 검출되지 않았으며, DON은 69 µg/kg, T-2는 16 µg/kg, ZEN 82 µg/kg의 오염실태를 보였다. 보통 동일시료에서 DON이 ZEN보다 높은 오염도를 보이는 것이 일반적이나 이러한 결과를 보인 것은 단백질 함량이 높은 옥수수 글루텐의 성질과 지용성인 ZEN의 성질과 관련이 있을 것으로 생각되어 진다.

닭 사료

닭 사료 40점에 대하여 오염도 조사결과 DON과 ZEN의 오염수준이 비교적 높은 것으로 나타났으며, 자세한 것은 Table 5와 같다.

NIV는 닭 사료 중 산란용 중병아리 사료와 육계후기 사료에서만 확인되었으며, 그 검출수준도 미미하였다. T-2의 경우 산란초기사료의 경우 평균 19.4 µg/kg와 100%의 오염율을 보여 닭 사료 중에서 가장 심한 오염실태를 보였다. DON은 모든 닭 사료에 오염되어 있는 것으로 조사되었으며, 평균 103-438 µg/kg 의 오염수준을 나타내었다. 용도별로는 육계용 사료보다는 산란용 사료에서 DON의 오염도가 높은 것으로 나타났으며, T-2와 마찬가지로 산란초기 사료에서 가장 높은 오염도를 보였다. ZEN역시 산란계 사료가 육계 사료보다 그 오염 정도가 심하였고, 그 중에서도 산란초기 사료에서 가장 심한 오염도를 나타내어 조사대상 독소 모두 산란계, 특히 산란초기 사료에서 가장 높은 오염도를 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 오염수준은 표에서 보는 바와 같이 우려할 정도는 아니었으나, 육계보다는 산란계에서 비교적 높은 오염도를 나타내었으며, DON과 ZEN의 경우 모든 시료가 오염되어 있었다. 앞서서도 말하였듯이 이러한 곰팡이독소들이 동시에 발생한다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었으며, 어떠한 상호작용과 상승작용을 하는지 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

Table 4. Incidence and levels of mycotoxins in components

Toxin	Feed	Average (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Contamination rate (%)
NIV	Soybean hull (n=5)	3.2	15.8	20.0
	Polished and broken Grain (n=7)	0.0	0.0	0.0
	Soybean meal (n=11)	0.0	0.0	0.0
	Food industry by-products (n=7)	11.6	56.4	28.6
	Corn gluten (n=10)	0.0	0.0	0.0
DON	Soybean hull (n=5)	720.1	3400.0	80.0
	Polished and broken Grain (n=7)	96.5	340.0	71.4
	Soybean meal (n=11)	37.3	94.0	63.6
	Food industry by-products (n=7)	37.8	51.8	100.0
	Corn gluten (n=10)	69.3	170.8	100.0
T-2	Soybean hull (n=5)	6.2	31.0	20.0
	Polished and broken Grain (n=7)	0.0	0.0	0.0
	Soybean meal (n=11)	2.9	17.1	18.2
	Food industry by-products (n=7)	0.0	0.0	0.0
	Corn gluten (n=10)	16.1	50.8	80.0
ZEN	Soybean hull (n=5)	122.7	480.0	100.0
	Polished and broken Grain (n=7)	5.0	29.2	85.7
	Soybean meal (n=11)	4.6	25.8	90.9
	Food industry by-products (n=7)	29.5	176.0	100.0
	Corn gluten (n=10)	81.9	284.0	100.0

Table 5. Incidence and levels of mycotoxins in chicken feed

Toxin	Feed	Average ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Maximum ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Contamination rate (%)
NIV	Chick, laying, young (n=3)	0.0	0.0	0.0
	Chick, laying, middle (n=4)	1.3	5.0	25.0
	Laying, early (n=5)	0.0	0.0	0.0
	Fattening, early (n=12)	0.0	0.0	0.0
	Fattening, last (n=12)	2.8	33.6	8.3
	Breeding (n=4)	0.0	0.0	0.0
DON	Chick, laying, young (n=3)	207.9	314.0	100.0
	Chick, laying, middle (n=4)	403.5	908.0	100.0
	Laying, early (n=5)	437.6	664.0	100.0
	Fattening, early (n=12)	116.0	220.0	100.0
	Fattening, last (n=12)	188.6	304.0	100.0
	Breeding (n=4)	102.5	119.2	100.0
T-2	Chick, laying, young (n=3)	5.8	9.0	66.7
	Chick, laying, middle (n=4)	6.7	9.5	75.0
	Laying, early (n=5)	19.4	48.4	100.0
	Fattening, early (n=12)	8.5	10.2	91.7
	Fattening, last (n=12)	6.0	13.7	66.7
	Breeding (n=4)	4.1	8.8	50.0
ZEN	Chick, laying, young (n=3)	23.3	56.0	100.0
	Chick, laying, middle (n=4)	39.0	65.6	100.0
	Laying, early (n=5)	93.7	141.8	100.0
	Fattening, early (n=12)	20.7	66.8	100.0
	Fattening, last (n=12)	23.4	45.4	100.0
	Breeding (n=4)	6.2	8.2	100.0

Table 6. Incidence and levels of mycotoxins in pig feed

Toxin	Feed	Average ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Maximum ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Contamination rate (%)
NIV	Fattening, early (n=17)	7.5	68.8	29.4
	Fattening, last (n=5)	5.3	11.8	60.0
	Pregnant (n=10)	16.7	91.8	50.0
	Piglet over 5 kg (n=18)	5.9	36.4	55.6
	Lactating (n=10)	6.4	19.9	50.0
	Fattening, early (n=17)	156.0	472.0	100.0
DON	Fattening, last (n=5)	227.5	366.0	100.0
	Pregnant (n=10)	364.9	1566.0	100.0
	Piglet over 5 kg (n=18)	139.7	360.0	100.0
	Lactating (n=10)	251.2	556.0	100.0
	Fattening, early (n=17)	3.9	24.0	47.1
	Fattening, last (n=5)	2.2	6.0	40.0
T-2	Pregnant (n=10)	1.1	5.4	20.0
	Piglet over 5 kg (n=18)	3.4	13.0	50.0
	Lactating (n=10)	1.0	5.2	20.0
	Fattening, early (n=17)	28.4	79.6	100.0
	Fattening, last (n=5)	41.1	63.0	100.0
	Pregnant (n=10)	56.7	262.0	100.0
ZEN	Piglet over 5 kg (n=18)	24.3	68.0	100.0
	Lactating (n=10)	44.1	81.4	100.0

돼지 사료

돼지 사료 60점에 대하여 오염도 조사를 실시한 결과 Table 6에서와 같았다.

사료 종류에 따라 NIV와 T-2은 5.3~16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 1.0~3.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 평균 오염수준을 각각 나타내었다. DON과 ZEN은 140~365 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 와 24~57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 평균 오염도를 보였으며, 닭 사료와 마찬가지로 100%의 오염율을 보였다. 돼지 사료 중에서는 임신돼지 사료에서 가장 높은 오염도를 보였으며 DON은 평균 364.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 1,566.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 오염수준을 보였으며, ZEN은 평균 56.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 262.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 오염수준을 나타내었다. ZEN의 경우 미국은 허용기준치가 설정되어 있지 않고 일본은 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 관리하고 있으나, 유럽의 가이드라인을 보면 돼지 사료의 경우 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하이기 때문에 이번 조사결과에 따른 오염도와 비교해 볼 때 우

리나라 사료도 결코 안전한 것만은 아닌 것을 확인할 수 있었다. ZEN과 DON은 여러 동물들 중 돼지에 가장 민감한 것으로 보고되고 있고, 특히 임신돼지에서 사산, 불임 등을 유발한다는 보고가 있는 만큼 오염도 경감조치 등 좀더 세심한 관리가 필요한 것으로 생각된다.

소 사료

소 사료 60점에 대하여 오염도 조사를 실시하였다. 자세한 분석결과는 아래와 같다.

소 사료는 DON, ZEN, NIV와 T-2 모두에 광범위하게 노출되어 있었다. NIV는 4~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 평균 오염도를 보였으며, 최대 122 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 가 검출되는 시료도 있었다. DON의 경우 446 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1,174 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 평균오염도를 보였으며, 고기소 임신우 사료(beef cattle, pregnant)와 큰소 비육후기용 사

Table 7. Incidence and levels of mycotoxins in cattle feed

Toxin	Feed	Average ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Maximum ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Contamination rate (%)
NIV	Beef cattle, pregnant (n=14)	16.2	44.0	50.0
	Dairy cow, middle (n=5)	29.7	122.2	60.0
	Dairy cow, early (n=10)	6.7	44.6	30.0
	Dairy calf, middle (n=4)	3.5	10.5	50.0
	Dairy calf, last (n=4)	11.5	13.7	100.0
	Cattle, fattening, early (n=9)	10.2	63.2	66.7
	Cattle, fattening, last (n=9)	12.2	68.4	33.3
	Beef cattle, pregnant (n=14)	1173.5	2940.0	100.0
	Dairy cow, middle (n=5)	851.2	1296.0	100.0
DON	Dairy cow, early (n=10)	445.8	1294.0	100.0
	Dairy calf, middle (n=4)	446.2	1104.0	100.0
	Dairy calf, last (n=4)	991.0	2420.0	100.0
	Cattle, fattening, early (n=9)	687.9	1504.0	100.0
	Cattle, fattening, last (n=9)	1020.5	2840.0	100.0
	Beef cattle, pregnant (n=14)	0.4	5.9	7.1
	Dairy cow, middle (n=5)	1.3	6.3	20.0
	Dairy cow, early (n=10)	0.7	6.8	10.0
	Dairy calf, middle (n=4)	1.5	6.1	25.0
T-2	Dairy calf, last (n=4)	7.8	31.0	25.0
	Cattle, fattening, early (n=9)	3.5	7.7	55.6
	Cattle, fattening, last (n=9)	0.0	0.0	0.0
	Beef cattle, pregnant (n=14)	223.1	558.0	100.0
	Dairy cow, middle (n=5)	166.6	193.8	100.0
	Dairy cow, early (n=10)	72.1	149.8	100.0
	Dairy calf, middle (n=4)	79.0	159.6	100.0
	Dairy calf, last (n=4)	118.7	142.4	100.0
	Fattening cattle, early (n=9)	104.2	179.4	100.0
ZEN	Fattening cattle, last (n=9)	212.0	478.0	100.0

료(fattening cattle, last)의 경우 평균오염도가 1,000 µg/kg 이상 검출되었으며, 최대 2,940 µg/kg과 2,840 µg/kg의 결과치를 나타내는 등 소 사료 중에서 가장 높은 오염실태를 보였다. 전체 소 사료 중에서 23.3%(14개)가 1,000 µg/kg 이상의 오염 수준을 나타내었다. ZEN은 평균 72~223 µg/kg의 오염도를 보였으며, DON과 마찬가지로 고기소 임신우 사료와 큰소 비육후기용 사료에서 평균 223 µg/kg와 212 µg/kg, 최대 558 µg/kg과 478 µg/kg로 가장 높은 오염도를 보였으며 ZEN 역시 200 µg/kg 이상 검출된 시료가 23.3%(14개) 확인되었다.

DON과 ZEN은 모든 소 사료에서 검출되었으며, 닭 사료(산란계 사료)나 돼지 사료(임신돈 사료)에서와 마찬가지로 임신우 사료에서 특히 특히 높은 오염도를 보임에 따라 추가 조사 및 대책 등 임신가축 사료에 대한 이들 곰팡이독소의 오염을 경감시키는 연구가 필요한 것으로 생각된다.

그리고 앞서서도 설명하였듯이 소 사료에서 다른 축종의 배합 사료보다 높은 곰팡이독소 오염도를 보임에 따라 곰팡이독소가 높게 검출된 배합 사료에 사용된 식물성 단미 사료에 대하여 추적 조사하였으며, 자세한 오염도 조사결과는

Table 8과 같다. 조사된 단미 사료들은 일반적으로 사료관리 법에 따라 각 시도에서 의뢰하는 단미 사료들과는 그 종류도 다를 뿐 아니라 곰팡이오염 정도도 상이하였다. NIV의 경우 옥수수(corn)에서 평균 28.4 µg/kg과 단백질(corn gluten feed)에서 49.0 µg/kg의 오염도를 나타내었다. DON은 옥수수, 옥수수 배아박(corn germs meal), 주정박(corn distillers grain)에서 70.1, 350.3, 335.0 µg/kg의 평균 오염도를 나타내었으며, 특히 단백질에서 평균 4,551.1 µg/kg의 오염도를 나타내었다. ZEN 또한 단백질에서 평균 812.2 µg/kg의 오염도를 나타내었다.

배합 사료 제조 시 사용되는 단미 사료는 주로 옥수수, 밀, 대두박 등 20~30여 개가 된다. 이중 사용량이 가장 많은 옥수수는 양돈 및 양계사료 배합 시에 50~60%를 사용하는 반면 소 사료 배합 시는 30%정도 사용되고, 단백질 공급원으로 옥수수 대신 단백피를 10~20% 사용하고 있었다. 따라서, 오염도 조사 결과와 같이 소 사료에서 곰팡이독소가 많이 검출된 원인으로 사료 제조 시 곰팡이독소가 많이 오염된 단백질 사용을 생각할 수 있었다.

Table 8. Incidence and levels of mycotoxins in components (added)

Toxin	Feed	Average (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Contamination rate (%)
NIV	Corn (n=7)	28.4	136.6	28.6
	Corn gluten feed (n=9)	49.0	88.0	100.0
	Palm oil meal (n=4)	0.0	0.0	0.0
	Corn germs meal (n=4)	0.8	3.1	25.0
	Soybean meal (n=6)	0.2	0.9	16.7
	Corn distillers grain (n=2)	2.0	4.1	50.0
	Corn (n=7)	70.1	214.0	85.7
DON	Corn gluten feed (n=9)	4551.1	8480.0	100.0
	Palm oil meal (n=4)	0.0	0.0	0.0
	Corn germs meal (n=4)	350.3	656.0	100.0
	Soybean meal (n=6)	2.2	13.4	0.0
	Corn distillers grain (n=2)	335.0	670.0	50.0
T-2	Corn (n=7)	10.2	30.8	42.9
	Corn gluten feed (n=9)	0.0	0.0	0.0
	Palm oil meal (n=4)	0.0	0.0	0.0
	Corn germs meal (n=4)	4.4	9.0	50.0
	Soybean meal (n=6)	0.0	0.0	0.0
	Corn distillers grain (n=2)	6.8	13.7	50.0
ZEN	Corn (n=7)	9.2	25.2	100.0
	Corn gluten feed (n=9)	812.2	1072.0	100.0
	Palm oil meal (n=4)	2.7	5.2	100.0
	Corn germs meal (n=4)	455.2	872.0	100.0
	Soybean meal (n=6)	10.1	30.2	100.0
	Corn distillers grain (n=2)	95.4	190.8	50.0

고 찰

사료 중 푸사리움 속 곰팡이 생성독소(NIV, DON, T-2, ZEN)의 오염도 조사 결과, 배합 사료에서 NIV는 1.0~12.3 µg/kg, DON은 212.3~812.1 µg/kg, T-2는 1.6~8.3 µg/kg, ZEN은 31.2~147.2 µg/kg의 평균 오염도를 나타냈으며, DON과 ZEN의 경우 모든 배합 사료에서 검출되었다. 이는 국내 생산 및 유통 사료가 이들 곰팡이독소에 광범위하게 노출되어 있음이 확인된 것이다. 현재 세계 여러 나라가 각국의 재배환경, 사료의 수급사정 등을 고려하여 규제기준을 정하여 적용하고 있다. DON의 경우 미국은 1,000-5,000 µg/kg, 일본은 1,000-4,000 µg/kg, 유럽은 900-12,000 µg/kg로 설정 관리하고 있으며, ZEN은 일본이 1,000 µg/kg, 유럽이 100-3,000 µg/kg로 다양하게 설정하여 관리하고 있다. 이러한 규제치와 비교하여 볼 때 우리나라 사료의 곰팡이독소 오염 정도는 외국의 관리기준과 비교해 아직은 특이적으로 높다고 볼 수는 없다. 그러나 DON, ZEN 등은 상당히 그 오염도가 높은 것으로 나타났고, 조사대상 곰팡이독소가 매우 광범위하게 오염되어 있으며, 그 교차오염에 의한 독성의 상승작용 등에 대한 연구는 아직 충분치 않은 상황이다. 또한 일부 사료의 경우 우려할 만한 정도의 오염도를 보이는 사료도 확인됨에 따라 안전한 사료 공급을 위한 적절한 대책이 필요한 것으로 생각된다.

요 약

국내 유통사료 239점에 대하여 푸사리움 속 곰팡이독소 4종(NIV, DON, T-2, ZEN)에 대하여 오염도조사를 실시하였다. 일반적으로 곰팡이독소 정제에 많이 사용되는 면역친화 컬럼을 사용하지 않고 일반 SPE컬럼을 이용하였으며, HPLC/MS/MS로 동시 분석하였다. 각각의 성분 별로 77.42~111.20%의 회수율과 0.3~2.0 µg/l의 양호한 정성한계(LOD)를 보였다. 분석 결과 사료 중에 조사대상 곰팡이독소가 광범위하게 오염되어 있었으며, 특히DON과 ZEN은 모든 배합 사료에서 확인되었다. 소 사료의 경우 DON과 ZEN은 평균 812.1 µg/kg과 147.2 µg/kg의 오염도를 보여 닭 사료나 돼지 사료보다 약 4배정도 높은 오염도를 보였으며, 그 원료로 사용된 단미 사료를 조사해본 결과 수입 단백질이 주요 오염원인 것으로 확인됐다.

참고문헌

1. Kim DH, Jang HS, Kim YM, Ahn JS.: Survey for Contamination and Study for Reduction of Ochratoxin A and Aflatoxin in Red Pepper. *J. Fd Hyg. Safety.*, **24**(4), 299-306 (2009).
2. Kim EJ, Jeong SH, Ku HO, Kang HG, Cho JH.: Clinical and Toxicopathological Parameters for Deoxynivalenol Intoxication in B6C3F1 Mice. *J. Toxicol. Pub. Health.*, **23**(4), 353-362 (2007).
3. Ok HE, Chang HJ, Choi SW, Lee NR, Kim HJ, Koo MS, Chun HS.: Co-occurrence of Deoxynivalenol and Zearalenone in Cereals and their Products. *J. Fd Hyg. Safety.*, **22**(4), 375-381 (2007).
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 multi-mycotoxin liquid chromatograph/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **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 Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, **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 ultrahigh performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry.*, **117**(4), 705-712 (2009).
15. Veronica MT, Michelangelo P, Angelo V.: Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends*

- in Analytical Chemistry*, **28**(6), 758-768 (2009).
16. Pérez-Torrado E, Blesaa J, Moltó JC, Font G: Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for determination of zearalenone in cereal flours. *Food Control*, **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).