Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science 36(4) : 333~339, 2016
http://dx.doi.org/10.5333/KGFS.2016.36.4.333
ISSN 2287-5824 (Print)
ISSN 2287-5832 (Online)

Research Article

UHPLC를 이용한 볏짚 사일리지와 동계사료작물의 오크라톡신과 제랄레논 분석법 최적화

함현희 · 문혜연 · 이경아 · 이수형 · 홍성기 · 이데레사 · 류재기*
국립농업과학원 유해생물팀, 완주 55365

Optimization of Analytical Methods for Ochratoxin A and Zearalenone by UHPLC in Rice Straw Silage and Winter Forage Crops

Hyeonheui Ham, Hye Yeon Mun, Kyung Ah Lee, Soohyung Lee, Sung Kee Hong, Theresa Lee and Jae-Gee Ryu*
Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to optimize analytical methods for ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) in rice straw silage and winter forage crops using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). Samples free of mycotoxins were spiked with 50 μg/kg, 250 μg/kg, or 500 μg/kg of OTA and 300 μg/kg, 1500 μg/kg, or 3000 μg/kg of ZEA. OTA and ZEA were extracted by acetonitrile and cleaned-up using an immunoaffinity column. They were then subjected to analysis with UHPLC equipped with a fluorescence detector. The correlation coefficients of calibration curves showed high linearity ($R^2 \geqq 0.9999$ for OTA and $R^2 \geqq 0.9995$ for ZEA). The limit of detection and quantification were 0.1 μg/kg and 0.3 μg/kg, respectively, for OTA and 5 μg/kg and 16.7 μg/kg, respectively, for ZEA. The recovery and relative standard deviation (RSD) of OTA were as follows: rice straw = 84.23~95.33%, 2.59~4.77%; Italian ryegrass = 79.02~95%, 0.86~5.83%; barley = 74.93~97%, 0.85~9.19%; rye = 77.99~96.67%, 0.33~6.26%. The recovery and RSD of ZEA were: rice straw = 109.6~114.22%, 0.67~7.15%; Italian ryegrass = 98.01~109.44%, 1.65~4.81%; barley = 98~113.53%, 0.25~5.85%; rye = 90.44~108.56%, 2.5~4.66%. They both satisfied the standards of European Commission criteria (EC 401-2006) for quantitative analysis. These results showed that the optimized methods could be used for mycotoxin analysis of forages.

(**Key words :** Rice straw silage, Winter forage crops, Ochratoxin, Zearalenone, Ultra-high performance liquid chromatography)

Ⅰ. 서 론

조사료는 부피에 비해 가소화영양분이 적고 섬유질 함량이 많은 사료로써 반추동물의 생산성을 향상시키는데 필수적이다. 2010년 농림수산식품부 통계자료에 따르면 국내 조사료 자급률은 약 82%이며, 국내 조사료 공급량 중 볏짚이 45%, 목초와 사료작물 등의 양질조사료가 37%, 수입조사료가 18%를 차지한다. 이 중 수입조사료를 제외한 국내생산 조사료는 볏짚이 55%, 동계사료작물이 24%로 국내 생산량의 대부분을 차지한다. 이러한 볏짚과 동계사료작물은 대부분 곤포사일리지로 제조하여 일정기간 숙성시킨 후 반추동물에 급여하고 있다(Song et al., 2013; Sung et al., 2011).

곤포사일리지는 숙성 및 보관기간 중 저장 부주의, 타 지역 등으로 이동, 새나 쥐 등 소동물에 의한 비닐 손상 등에 의해 곰팡이 독소에 오염될 가능성이 높아진다. 곰팡이 독소는 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물로 열에 안정하여 쉽게 파괴되지 않으며 인축에 다양한 독성을 나타낸다. 지금까지 밝혀진 곰팡이 독소는 400종이 넘으며, 식품 및 사료에서 문제가 되는 주요 곰팡이 독소들로는 아플라톡신(AFs), 오크라톡신A (OTA), 제랄레논(ZEA), 데옥시니발레놀(DON), 푸모니신(FB, FUM) 등이 있다(Bhat et al., 2010). 이 중 OTA는 *Aspergillus ochraceus, Penicillium verrucosum* 등이 생산하는 독소로 동물에 노출되면 신장 독성, 면역 억제, 발암성 및 기형을 유발한다(Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007). ZEA는 *Fusarium graminearum*과 *Fusarium culmorum* 등이 생산하는 독소로 동물에 불임, 유선 증대, 고환 위축 등 생식계통에 문제를

* Corresponding author : Jae-Gee Ryu, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju, 55365, Korea, Tel: +82-63-238-3391, FAX: +82-63-238-3840, E-mail: jgryu@korea.kr

일으킨다(Danicke et al., 2005; Zöllner et al., 2002). 또한 곰팡이에 오염된 사료는 비타민, 아미노산 등의 영양소 흡수를 방해하여 가축의 성장을 저해한다(Kao and Robinson, 1972).

곰팡이 독소가 오염된 사료의 동물섭취를 제한하기 위해 유럽연합에서는 아플라톡신 B_1 (AFB_1)에 대한 허용기준(2003/100/EC) 및 DON, ZEA, OTA, $FUMB_1$, $FUMB_2$에 대한 관리기준을 두고 있으며(2006/576/EC), CODEX에서는 AFB_1에 대한 허용기준(CODEX STAN 193-1995)을 설정하고 있다. 국내에서도 사료관리법 등에서 2015년 8월 21일 사료 내 유해물질의 범위 및 허용기준을 신설하여 배합사료와 단미사료에 대해 AFB_1과 OTA의 허용기준 및 DON, ZEA, FB 등에 대한 관리기준을 설정하고 있으나 조사료의 곰팡이 독소 관리기준은 아직 없다.

사료에서 곰팡이 독소 오염실태를 보면 유럽과 중동지역 옥수수, 밀, 볏짚 등 사료원료 및 완제품의 52%가 곰팡이 독소에 오염되었으며, 아시아 태평양지역에서는 30%가 곰팡이 독소에 오염되었다는 보고가 있다(Binder et al., 2007). 네덜란드에서는 2002년~2004년 젖소농장에서 수집한 옥수수 사일리지의 72%가 평균 854 μg/kg의 농도로 DON에 오염되었고, 49%가 174 μg/kg 농도로 ZEA에 오염되었으며 밀 사일리지의 10%가 평균 621 μg/kg의 농도로 DON에 오염되었으나(Driehuis et al., 2008) 유럽의 곡류 및 곡류유래제품의 독소 가이드라인(European Commission recommendation, 2006)에서 제시하는 기준인 DON 8,000 μg/kg 이하, ZEA 2,000 μg/kg 이하 보다는 낮은 수치였다. 벨기에에서는 체코, 헝가리, 덴마크 등에서 수집한 옥수수, 밀 등 사료작물 82종 중 82%가 곰팡이 독소에 오염되었다고 보고하였으며 이 중 DON은 밀 사료 1종에서 8,841 μg/kg, 옥수수사료 1종에서 9,528 μg/kg 농도로 검출되어 기준치를 초과하였다(Monbaliu et al., 2009). 국내에서는 아직 조사료에서 곰팡이 독소 오염실태 자료가 많지 않아 정확한 비교는 어렵지만 농가에서 수집한 볏짚 곤포사일리지 33점 중 약 15%가 평균 3.1 μg/kg 농도로 OTA에 오염되어 있었으며, 9%가 776.7 μg/kg 농도로 DON에, 33%가 342.2 μg/kg 농도로 ZEA에 오염되어 있었으나(Sung et al., 2011) 기준치를 초과하지 않았고 독소오염의 빈도수나 농도가 국외와 비교했을 때 우려할만한 수준은 아니었다.

최근의 곰팡이 독소의 분석방법은 시료에 아세토나이트릴, 메탄올 등을 가하여 독소를 추출하고, 고체상추출법(solid phase extraction), 면역친화성컬럼(immunoaffinity column, IAC), 퀘처스법(QuEChERS method) 등을 이용하여 독소를 정제한 후, 액체크로마토그래피(liquid chromatography, LC), 기체크로마토그래피(gas chromatography) 등으로 단일물질로 분리하여 자외선검출기(photodiode array detector), 형광검출기(fluorescence detector, FLD) 또는 질량분석기(mass spectrometer) 등으로 독소를 검출 및 정량하는 방법이 주로 사용된다(Dzuman et al., 2014; Fazekas and Tar, 2001; Muscarella et al., 2009; Muscarella et al., 2011; Schenzel et al., 2012; Stroka et al., 2003). 이 중 IAC로 독소를 정제하고 LC로 분석하는 방법은 항원항체 반응으로 인해 단일독소 정제에 대한 특이성이 높고 간편하며 컬럼을 재사용할 수 있는 이점이 있다(Fazekas and Tar, 2001). 한편 국내에서는 조사료에 최적화된 곰팡이 독소 분석법 연구가 아직 미비하고 현재 농림축산식품부에서 제시하고 있는 곰팡이 독소 사료표준분석방법(2015. 7. 1. 개정) 또한 독소 분석방법이 조사료에 최적화되어 있지 않으며 ZEA의 경우 IAC를 이용한 정제법이 빠져있는 등 기존의 분석법을 조사료 분석에 적용하기 어려운 실정이다.

이에 본 연구에서는 국내 조사료 생산량의 79%를 차지하는 볏짚, 이탈리안 라이그라스, 청보리, 호밀에서 IAC 를 이용하여 OTA와 ZEA 를 정제하고 UHPLC-FLD로 독소를 검출하는 방법을 최적화하여 조사료의 곰팡이 독소 표준분석방법으로 제시하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시료

본 연구에 사용한 볏짚은 전북소재 사료공장에서 2013년~2015년 제작된 곤포사일리지를 수집하였으며 이탈리안 라이그라스, 청보리, 호밀은 국립축산과학원으로부터 생초를 제공받았다. 수집한 시료는 수분함량이 10% 이하가 되도록 −40℃ 이하에서 동결건조기(Freeze Dryer FD5518, Ilshin, Korea)로 건조한 후 분쇄하여 사용하였다.

2. 시약

표준품은 OTA (10 μg/ml in acetonitrile, Biopure, Austria), ZEA (100.1 μg/ml in acetonitrile, Biopure, Austria)을 사용하였으며 전처리 용매로 아세토니트릴(ACN, HPLC grade, Fisher, Korea), 메탄올(methanol, HPLC grade, Fisher, Korea), phosphate buffered saline (PBS, Oxoid, England)를, 독소정제를 위한 면역친화성컬럼(IAC)은 OTA 정제컬럼(Ochratest™ WB, Vicam, USA)과 ZEA 정제컬럼(Zearalatest™ WB, Vicam, USA)을 사용하였다.

3. 표준용액 조제

OTA는 표준품 10 μg/ml 를 각각 0.1, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 μg/kg의 농도가 되도록 ACN 용매에 희석하고, ZEA은 표준품 100 μg/ml 을 각각 5, 10, 100, 500, 1000, 2500, 5000 μg/kg의 농도가 되도록 ACN 용매에 희석하여 검량선 작성에 사용하였다.

4. 시료 전처리

전처리는 Vicam 사의 매뉴얼을 근거로 약간의 변형을 주어 수행하였다 (http://vicam.com/manuals?EID = 101427190&CID = 12063156). OTA 정제를 위해 수집한 시료 500 g을 분쇄하여 균질화시킨 후, 그 중 1 g을 취하여 60% ACN 20 ml를 가하고 1시간동안 170 rpm으로 교반하여 OTA를 추출하였다. 추출물을 여과지 (Whatman No.1, GE Healthcare, China)로 여과한 후 여과액 5 ml를 PBS용액 25 ml과 혼합하여 한번 더 여과하였다. IAC는 PBS 용액 20 ml로 활성화시킨 후 위의 여과액 24 ml를 주입하여 중력에 의해 통과시켰다. 컬럼은 증류수 10 ml로 세척한 후 메탄올 2 ml를 가하여 독소를 용출시켰다. 용출액은 질소가스를 가하여 용매를 완전히 제거하여 건조한 후, 50% 메탄올 1 ml에 녹이고 시린지 필터 (0.2 μm, Silicycle, Canada)로 여과한 후 UHPLC-FLD로 분석하였다 (Fig. 1A).

ZEA 정제를 위해 수집한 시료 500 g을 시료분쇄기로 분쇄하여 균질화시킨 후, 그 중 1 g을 취하여 0.5g NaCl (sodium chloride, Daejung, Korea)과 90% ACN 20 ml를 첨가하고 1시간동안 170 rpm으로 교반하여 ZEA를 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과한 후 여과액 5 ml를 1% Tween 20 (Tween® 20, sigma, USA) 20 ml과 혼합하였다. 혼합추출물 10 ml를 IAC에 주입하여 중력에 의해 통과시키고 증류수 10 ml로 세척한 후 메탄올 2.5 ml를 가하여 독소를 용출시켰다. 용출액은 질소가스를 가하여 용매를 건조시킨 후, 50% 메탄올 1 ml에 녹이고 0.2 μm 필터로 여과하여 UHPLC-FLD로 분석하였다 (Fig. 1B).

5. 기기분석조건

OTA와 ZEA는 UHPLC (Waters Acquity UPLC® H Class, Waters, Singapore)를 사용하여 분석하였으며, 분석컬럼은 Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 um, 2.1 × 100 mm (Waters, Ireland)를 동일하게 사용하였다. OTA 는 이동상 water : ACN : acetic acid = 49.5:49.5:1 조건에서 isocratic으로 분리, 유속 0.3 ml/min, 시료주입량 10 ul, 분석시간 10분으로 하였으며, 형광검출기 (FLR Detector, Waters, Singapore) 파장 ex = 333 nm, em = 460 nm로 독소를 검출하였다. ZEA는 이동상 water : ACN : methanol = 43:35:22 조건에서 isocratic으로 분리하였으며, 유속, 시료주입량, 분석시간은 OTA와 동일하고 형광검출기의 파장은 ex = 274 nm, em = 440 nm로 하여 독소를 분석하였다.

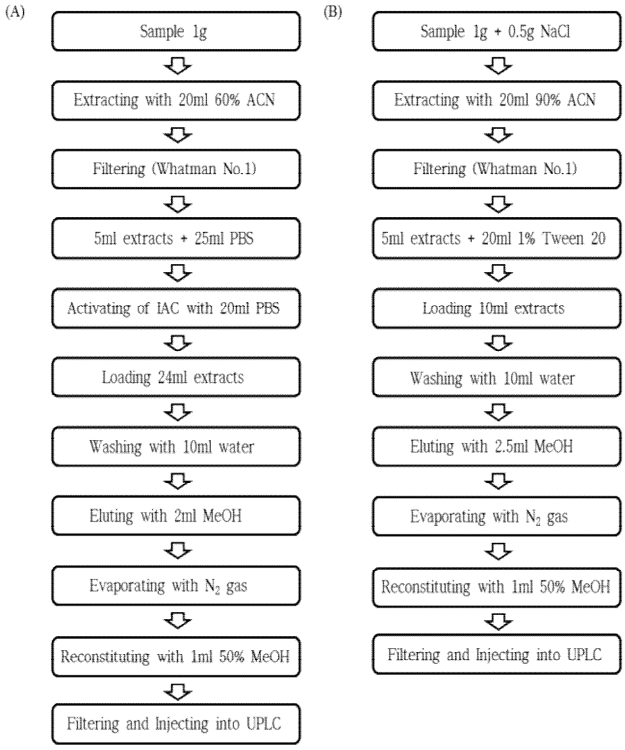

Fig. 1. Flow diagram of sample preparation methods for OTA (A) and ZEA (B).

6. 회수율 및 검출・정량한계 측정

독소가 오염되지 않은 볏짚 사일리지, 이탈리안 라이그라스, 청보리, 호밀에 OTA는 표준용액을 50, 250, 500 μg/kg 농도가 되도록, ZEA는 300, 1,500, 3,000 μg/kg 농도가 되도록 ACN으로 각각 희석한 후 각각 시료 3점씩 농도 별로 희석한 독소를 가하여 하루 동안 흄후드에서 건조시킨 후 위의 방법으로 전처리 및 분석하여 회수율을 측정하였다.

검출 및 정량한계는 OTA와 ZEA 표준용액을 희석하여 분석 했을 때 신호 대 잡음비 (signal/noise, S/N)가 검출한계는 3:1, 정량한계는 10:1이 되는 시점으로 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 검출 및 정량한계

OTA의 검출한계는 0.1 μg/kg, 정량한계는 0.3 μg/kg 이었으며, ZEA는 각각 5 μg/kg, 16.7 μg/kg을 나타냈다(Table 1). OTA의 검출한계는 Dalcero et al. (2002)이 소와 돼지 사료에서 HPLC 분석 시 보고한 검출한계 10 μg/kg와 Fraga et al. (2007)이 HPLC를 이용해 소 사료에서 분석 시 보고한 검출한계 1 μg/kg 보다 낮아 본 연구에서 사용한 기기로 매우 낮은 농도도 검출이 가능함을 나타낸다. ZEA의 검출한계는 Fazekas and Tar (2001)가 곡물 및 사료에서 LC를 이용해 보고한 검출한계 10 μg/kg 보다 낮고 Kim et al. (2011)이 배합 및 단미사료에서 HPLC로 분석 시 보고한 검출한계 3 μg/kg 보다는 약간 높았다.

2. 검량선

검량선 작성을 위해 OTA 표준용액을 농도 별로 희석하여 사용하였으며 3회 반복하여 측정한 결과 본 연구의 기기검출 조건에서 정체 시간(retention time, RT)은 2.5±0.04분, 표준용액의 농도 별 분석 크로마토그램 면적의 결정계수는 0.9999로 나타났다. 또한 ZEA의 RT는 2.85±0.01분, 결정계수는 0.9995로 검량선이 높은 직선성을 보였다(Fig. 2.).

Table 1. Linear equations, correlation coefficients, LODs and LOQs for OTA and ZEA analysis

Mycotoxin	Linear equation	Coefficient of determination (R^2)	LOD (μg /kg)	LOQ (μg /kg)
OTA	y = 30803x − 32256	0.99995	0.1	0.3
ZEA	y = 1980x + 10585	0.99946	5	16.7

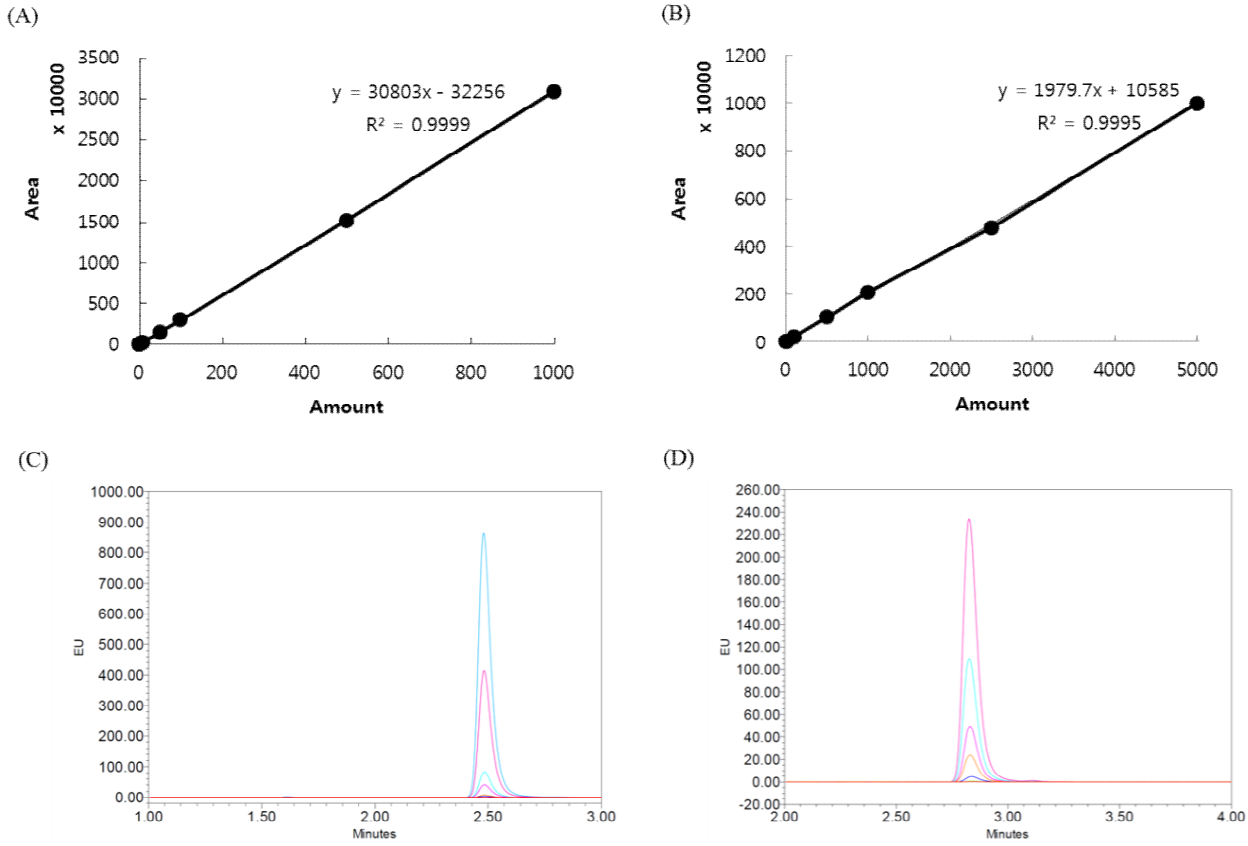

Fig. 2. Calibration curve and chromatogram of standard solution : OTA (A&C) and ZEA (B&D).

3. 회수율 및 상대표준편차

분석의 유효성 및 정밀성 검증을 위해 볏짚 사일리지, 이탈리안 라이그라스, 청보리 및 호밀 4종을 각각 독소 농도 3개 수준별 3반복씩 표준용액을 첨가하여 정제 및 분석하였다. OTA 분석에서 볏짚은 회수율 84.23~95.33%, 상대표준편차(RSD) 2.59~4.77%를 나타냈으며, 이탈리안 라이그라스는 회수율 79.02~95%, RSD 0.86~5.83%, 청보리는 회수율 74.93~97%, RSD 0.85~9.19%, 호밀은 회수율 77.99~96.67%, RSD 0.33~6.26%를 나타내어 유럽연합에서 제시한 기준(EC regulation, 2006)인 "회수율 70~110%, RSD 20% 이하"를 만족시켰다(Table 2). 이는 Driehuis et al. (2008)이 사일리지에서 OTA 분석 시 얻은 회수율 73~111%과 유사한 수치이다. 한편 Dalcero et al. (2002)이 소, 돼지 및 토끼 배합사료에서 OTA를 분석한 결과에 따르면 본 연구결과보다 기기의 OTA 검출한계가 100배나 높아 독소 검출능력은 떨어지나 회수율(93~96%)은 높은 경향을 보였다. 두 연구가 동일한 회사(Vicam)의 IAC를 사용해 독소를 정제하였음에도 본 연구결과에서 회수율이 낮은 것으로 보아 사료의 종류나 독소추출방법의 차이가 회수율에 영향을 미친 것으로 보인다. 본 연구에서는 섬유질이 많은 조사료의 특성 상 독소의 추출효율을 높이기 위해 시료를 동결 건조하여 분쇄가 용이하게 하였고 추출시간도 기존 30분에서 1시간으로 늘려 4종의 조사료에서 70% 이상의 회수율을 얻을 수 있었다.

ZEA 분석에서는 볏짚의 경우 회수율 109.6~114.22%, RSD 0.67~7.15%를 나타냈으며, 이탈리안 라이그라스는 회수율 98.01~109.44%, RSD 1.65~4.81%, 청보리는 회수율 98~113.53%, RSD 0.25~5.85%, 호밀은 회수율 90.44~108.56%, RSD 2.5~4.66%를 나타냈으며, Table 3에서와 같이 유럽연합의 기준(EC regulation, 2006)인 "ZEA 50 μg/kg 이상에서 회수율 70~120%, RSD 25% 이하"를 만족시켜 본 연구에서 설정한 분석법이 국제 기준에 타당하며 사용 가능함을 알 수 있다. 이는 Dzuman et al. (2014)이 복합사료에서 UHPLC-MS/MS로 ZEA 분석 시 얻은 회수율 93~98%와 비슷하거나 높은 수준을 나타냈다. 또한 위의 방법으로 독소를 정제 및 분석한 경우 볏짚 사일리지 등 조사료 4종의 분석 크로마토그램에서 OTA와 ZEA이 간섭물질 없이 단일피크로 분리된 것으로 보아 이 방법이 다른 종류의 사료에도 적용 가능할 것으로 보인다.

이와 같이 본 연구에서는 국내 생산량의 대부분을 차지하는 볏짚 사일리지와 동계사료작물에 대한 OTA와 ZEA 분석법을 최적화 하였고 이는 국내 조사료의 곰팡이 독소 표준분석법으로 활용할 수 있을 것이다. 다만 시료수집 시 볏짚은 사일리지를 사용하고 이탈리안 라이그라스, 청보리, 호밀은 생초를 사용한 것은 시료의 pH, 수분함량 등이 달라 분석효율에 영향을 미치고(Dzuman et al., 2014) 우리나라에서는 대부분의 볏짚과 동계사료작물을 사일리지로 만들어 가축에 급여하는 점에서 한계로 작용할 수 있다. 한편 네덜란드에서는 2002년~2004년 조사한 옥수수 사일리지의 72%가 DON에 오염되었고 1.4%가 FB에 오염되었으며(Driehuis et al., 2008), 아르헨티나에서는 2005년~2006년 수집한 밀 사료의 45%가 DON에 오염되었고 옥수수 사료의 4%가 AFB_1에 오염되었다는 보고가 있으므로(Roige et

Table 2. Means, recoveries and %RSDs of OTA spiked feeds

Feed	Spiked level (μg/kg)	Mean±SD (μg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
Rice straw	50	47.66 ± 1.43	95.33	3.00
	250	198.33 ± 5.14	79.33	2.59
	500	421.17 ± 20.10	84.23	4.77
Barley	50	48.50 ± 0.41	97.00	0.85
	250	187.33 ± 17.21	74.93	9.19
	500	437.67 ± 5.95	87.53	1.36
Italian ryegrass	50	47.50 ± 0.41	95.00	0.86
	250	197.54 ± 11.51	79.02	5.83
	500	406.00 ± 23.33	81.20	5.75
Rye	50	48.33 ± 1.03	96.67	2.13
	250	194.17 ± 12.15	77.66	6.26
	500	441.00 ± 1.47	88.20	0.33

Table 3. Means, recoveries and %RSDs of ZEA spiked feeds

Feed	Spiked level (μg/kg)	Mean±SD (μg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
Rice straw	300	342.67 ± 24.51	114.22	7.15
	1500	1,644.00 ± 18.02	109.60	1.10
	3000	3,340.33 ± 22.51	111.34	0.67
Barley	300	294.00 ± 17.20	98.00	5.85
	1500	1,598.00 ± 16.97	106.53	1.06
	3000	3,406.00 ± 8.60	113.53	0.25
Italian ryegrass	300	328.33 ± 15.80	109.44	4.81
	1500	1,503.67 ± 52.66	100.24	3.50
	3000	2,940.33 ± 48.40	98.01	1.65
Rye	300	271.33 ± 6.80	90.44	2.50
	1500	1,510.67 ± 47.49	100.71	3.14
	3000	3,256.67 ±151.89	108.56	4.66

al., 2009) 앞으로 OTA와 ZEA 이외에 AFs, DON, FB 등도 조사료에서 분석하기 위한 분석법 최적화가 필요할 것으로 보인다.

Ⅳ. 요 약

조사료에서 오크라톡신 A (OTA) 및 제랄레논 (ZEA)의 단성분 분석법을 최적화하기 위하여 곰팡이 독소에 오염되지 않은 볏짚 사일리지, 이탈리안 라이그라스, 청보리, 호밀을 대상으로 각 시료 별로 OTA는 50, 250, 5,000 μg/kg, ZEA는 300, 1,500, 3,000 μg/kg의 농도로 스파이킹하고 면역친화성 컬럼을 이용하여 독소를 정제한 후 UHPLC-FLD를 이용하여 분석하였다. 분석 결과 표준용액의 검량선은 OTA가 결정계수 0.9999, ZEA가 0.9995로 높은 직선성을 나타냈으며, 검출 및 정량한계는 OTA가 각각 0.1 μg/kg, 0.3 μg/kg, ZEA는 각각 5 μg/kg, 16.7 μg/kg을 나타냈다. 유효성 및 정밀성 검정결과 OTA는 볏짚이 회수율 84.23~95.33%, 상대표준편차 (RSD) 2.59~4.77%, 이탈리안 라이그라스는 회수율 79.02~95%, RSD 0.86~5.83%, 청보리는 회수율 74.93~97%, RSD 0.85~9.19%, 호밀은 회수율 77.99~96.67%, RSD 0.33~6.26%를 나타냈으며, ZEA는 볏짚이 회수율 109.6~114.22%, RSD 0.67~7.15%, 이탈리안 라이그라스는 회수율 98.01~109.44%, RSD 1.65~4.81%, 청보리는 회수율 98~113.53%, RSD 0.25~5.85%, 호밀은 회수율 90.44~108.56%, RSD 2.5~4.66%를 나타내어 유럽연합에서 제시한 기준을 만족하였다. 따라서 본 연구에서 제시한 분석법은 국내의 볏짚 등 조사료 4종에서 OTA와 ZEA의 분석에 활용할 수 있음을 시사하였다.

(**주제어 :** 볏짚 사일리지, 동계사료작물, 오크라톡신, 제랄레논, 액체크로마토그래피)

Ⅴ. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 : PJ010914) 및 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호 : PJ01091403)의 지원에 의해 이루어진 것임.

Ⅵ. REFERENCES

Bhat, R., Rai, R.V. and Karim, A.A. 2010. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. Food Science and Food Safety. 9:57-81.

Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J. and Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology. 137: 265-282.

CODEX Alimentarius. 1995. General standard for contaminants and toxins in food and feed (CODEX STAN 193-1995).

Commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. 2006. Official Journal of the European Union. L70:12-34.

Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC).

2006. Official Journal of the European Union. L229:7-9.

Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G. and Rosa, C.D.R. 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by Aspergillus section Nigri in Argentina. Food Additives and Contaminants. 19:1065-1072.

Danicke, S., Brussow, K., Valenta H., Ueberschar, K., Tiemann, U. and Schollenberger, M. 2005. On the effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. Molecular Nutrition and Food Research. 49: 932-943.

Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. and Te Giffel, M.C. 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. Food Additives and Contaminants. 1:41-50.

Dzuman, Z., Zachariasova, M., Lacina, O., Veprikova, Z., Slavikova, P. and Hajslova, J. 2014. A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. Talanta. 121:263-272.

Fazekas, B. and Tar, A. 2001. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. Journal of AOAC International. 84:1453-1459.

Fraga, M.E., Curvello, F., Gatti, M.J., Cavaglieri, L.R., Dalcero, A.M. and da Rocha Rosa, C.A. 2007. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by Aspergillus species in poultry feed processing. Veterinary Research Communications. 31:343-353.

Kao, C. and Robinson, R.J. 1972. *Aspergillus flavus* deterioration of grain: Its effect on amino acids and vitamins in whole wheat. Journal of Food Science. 37:261-263.

Kim, D.H., Choi, K.I., Hong, K.S., Kim, H.J., Jang, H.S., Cho, H.J. and Han, G.S. 2011. Analysis and survey for contamination of deoxynivalenol and zearalenone in feed by high performance liquid chromatography. Journal of Food Hygiene and Safety. 26:214-221.

Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C.L., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E. and De Saeger, S. 2009. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58:66-71.

Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Lo Magro, S., Palermo, C., Centonze, D. and Palermo, D. 2009. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. Food Additives and Contaminants. 26:1402-1410.

Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Lo Magro, S., Palermo, C. and Centonze, D. 2011. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in foods and feed materials. Methods in Molecular Biology. 739:203-210.

Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R.A. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Molecular Nutrition & Food Research. 51:61-99.

Roige, M.B., Aranguren, S.M., Riccio, M.B., Pereyra, S., Soraci, A.L. and Tapia, M.O. 2009. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. Revista Iberoamericana de Micología. 26: 233-237.

Schenzel, J., Forrer, H.R., Vogelgsang, S. and Bucheli, T.D. 2012. Development, validation and application of a multi-mycotoxin method for the analysis of whole wheat plants. Mycotoxin research. 28:135-147.

Song, T.H., Park, T.I., Han, O.K., Park, H.H., Cho, S.K., Oh, Y.J., Kang, H.J., Jang, Y.W. and Park, K.G. 2013. Effect of harvesting time and making method on feed value and fermentative quality in silage of whole crop barley. Korean Journal of Crop Science, 58:362-366.

Stroka, J., von Holst, C., Anklam, E. and Reutter, M. 2003. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B1 in cattle feed: collaborative study. Journal of AOAC International. 86:1179-1186.

Sung, H.G., Lee, J.K. and Seo, S. 2011. Studies on fungal contamination and mycotoxins of rice straw round bale silage. Journal of Korean Society of Grassland and Forage Science. 31:451-462.

Zöllner, P., Jodlbauer, J., Kleinova, M., Kahlbacher, H., Kuhn, T., Hochsteiner, W. and Lindner, W. 2002. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:2494-2501.

(Received July 20, 2016 / Revised August 29, 2016 / Accepted August 29, 2016)