



LC-MS/MS를 이용한 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소 10종 동시분석법 개발

김단비 · 박지수 · 유미영*

한국식품연구원

Method Development for Determination of Trichothecene Mycotoxins in Nuts by LC-MS/MS

Dan-Bi Kim, Ji-Su Park, and Mi-Young Yoo*

Korea Food Research Institute, Wanju, Jeonbuk, Korea

(Received August 8, 2018/Revised August 26, 2018/Accepted September 12, 2018)

ABSTRACT - This study presents a method validation for extraction and quantitative analysis of trichothecene mycotoxins in nuts based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for extraction and enhanced matrix removal (EMR)-lipid-dispersive-SPE (d-SPE) cleanup method, with detection and quantification by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in positive- and negative-ion modes. Linearity, precision, and accuracy were validated for LC-MS/MS methods. Results obtained with LC-MS/MS were linear, with correlation coefficient (R^2) of 0.998. Limits of detection and quantification for mycotoxins were 0.41-3.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1.23-10.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Intra- and inter-day precisions (RSD, %) were 0.40-8.44% and 1.93-12.46%, respectively. Results indicated to be rapidly and accurately identifying trichothecene mycotoxins and may be used as a suitable safety management method for nuts and nuts related commodities.

Key words : Trichothecene mycotoxins, Nuts, QuEChERS, LC-MS/MS, Analytical method

곰팡이 독소는 식품의 저장, 가공, 유통과정 중에 생성되는 곰팡이의 2차대사산물로서 사람이나 가축에게서 세포독성, 발암성, 변이유발원 등 직접적으로 질병을 유발하거나 생장저하, 면역기능저해, 체중감소 등 간접적으로 작용한다¹⁻⁴). 트리코테센계(trichothecene) 곰팡이 독소는 *Fusarium* 속 곰팡이가 생산하는 독소로서 주요 독소로는 데옥시니발레놀(deoxynivalenol), 니발레놀(nivalenol), 제랄레논(zearalenone), 푸모니신(fumonisin) 등이 있다. 트리코테센계 곰팡이 독소는 밀, 보리, 옥수수, 견과류 등에서 빈번히 발생하며, 국내 뿐 아니라 전 세계적으로 오염 사례에 대한 연구가 꾸준히 보고되고 있다. 또한, T-2 독소, HT-2 독소, 3-acetyl deoxynivalenol (3-ACDON), 15-acetyl deoxynivalenol (15-ACDON) 및 fusarenon-X (FUS-X) 등 다양한 트리코테센계 독소에 대한 오염수준 및 분석법에 대한 연구가 보고되고 있다⁵⁻⁶). 트리코테센계 곰팡이 독소

는 구조적으로 9번 탄소와 10번 탄소 사이의 이중결합과 12번 탄소와 13번 탄소에 에폭시기를 가지는 세스퀴테르펜 에폭사이드로서 매우 안정적인 형태의 화합물이며, 끓이기, 발효, 분쇄 등과 같은 가공 및 저장과정의 높은 온도에서도 쉽게 분해되지 않는다고 알려져 있다⁷).

곰팡이 독소를 분석하는 대표적인 방법으로는 효소면역분석법(enzyme-linked immunospecific assay, ELISA), 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC), 기체크로마토그래피(gas chromatography, GC) 등이 있으나, 최근에는 기존 분석법의 비용, 시간, 감도 등의 문제점을 보완한 빠르고 간편한 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) 전처리법과 질량 분석기를 이용한 고감도 분석법에 대한 연구가 보고되고 있다⁸⁻¹⁰).

최근 건강한 삶에 대한 국민들의 관심이 증가로 간식의 트렌드가 바뀌면서 불포화지방산 등이 풍부한 견과류와 견과류를 활용한 가공제품의 소비량이 급증하고 있으며, 이러한 소비자의 기호를 반영하듯 견과류의 수입규모도 매년 증가하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소 QuEChERS 전처리 조건 및 분석법을 개발하고 그 유효성을 검증하고자 한다.

*Correspondence to: Mi-Young Yoo, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, 245, Nongsaenmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Korea
Tel: 82-63-219-9087, Fax: 82-63-219-9280
E-mail: myyoo@kfri.re.kr

Materials and Methods

실험재료

본 실험에서는 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소 분석을 위하여 국내에서도 생산되는 대표적인 견과류인 땅콩을 선정하였으며, 실험에 사용된 땅콩은 국내 각 지역 별 및 중국, 미국, 베트남, 태국에서 생산된 것을 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 분쇄기로 균질화한 후 밀봉하여 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

표준품 및 시약

트리코테센계 표준품인 nivalenol (100 µg/mL), deoxy-nivalenol (100 µg/mL), fusarenon X (100 µg/mL), 15-acetyldeoxynivalenol (100 µg/mL), 3-acetyldeoxynivalenol (100 µg/mL), verrucarol 및 neosolaniol (100 µg/mL)은 Sigma-Aldrich사 (St. Quentin Fallavier, France)로부터 구입하였으며, diactoxyscirpenol (100 µg/mL)은 Romer Labs® (Tulln, Austria), HT-2 toxin (100 µg/mL) 및 T-2 toxin (100 µg/mL)은 Biopure (Tulln, Austria)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile은 Merck사 (Frankfurt, Germany)의 제품을 사용하였다. QuEChERS 전처리시 추출단계에서 사용되는 magnesium sulfate, sodium chloride, sodium citrate, sodium hydrogencitrate sesquihydrate 및 formic acid는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, C₁₈ 및 primary-secondary amine (PSA) sorbent는 Agilent Technologies사(Santa Clara, CA, USA)에서 구입하였다. 정제수는 Mili-Q ultrapure water purification system을 이용한 18.2 MΩcm 수준으로 정제된 증류수를 사용하였다.

표준용액 조제

트리코테센계 표준품 10종 중 verrucarol을 제외하고는 표준 원액으로 하고, verrucarol은 100 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 용량 플라스크에 넣고 아세트니트릴을 가하여 완전히 혼합 후 100 mL로 정용하여 1,000 mg/L가 되도록 하였다. 다음 10종의 표준 원액들을 아세트니트릴로 0.5~150 µg/kg의 농도가 되도록 5단계 희석하여 혼합 표준 용액으로 하였으며, 이를 이용하여 검량선을 작성하였다.

시료 추출

땅콩에 존재하는 트리코테센계 곰팡이 독소를 분석하기 위하여 단시간에 많은 시료를 처리할 수 있는 QuEChERS 방법을 응용하였다¹¹⁾. 시료 4 g을 정밀히 칭량하여 증류수 20 mL를 가한 후 교반하고, 1% formic acid가 함유된 84% 아세트니트릴 20 mL를 넣어 교반한다. 다시 이 액에 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1.0 g sodium citrate 및 0.5 g disodium citrate sesquihydrate로 구성된 QuEChERS kit를 첨가하고 mechanical shaker를 이용하여 15분 동안 추출한다. 이 후

8000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였으며 분리한 상층액 4 mL를 정제과정에 이용하였다.

정제방법 최적화

본 연구에서는 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소에 적합한 정제 과정을 선택하고 dispersive-SPE (d-SPE)법과 EMR-Lipid-dSPE법을 회수율 실험을 통하여 비교하였다. d-SPE를 이용한 정제법은 QuEChERS 추출액 중 상층액(아세트니트릴 층) 4 mL에 0.6 g의 MgSO₄, 0.2 g의 C₁₈, 0.4 g의 PSA solvent를 넣어 준 후 상온에서 15분 동안 충분히 교반시킨 후, 10000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 0.2 µm syringe filter로 여과하여 LC-MS/MS 시험 용액으로 하였다. EMR-Lipid-dSPE 정제법은 EMR-Lipid-dSPE tube에 증류수 5 mL를 첨가하여 활성화 시킨 후 QuEChERS 추출물 중 상층액 4 mL를 첨가한 다음 1분 동안 충분히 교반하고, 5000 rpm에서 3분 간 원심분리 후 상층액 5 mL를 EMR-Lipid polish tube (1:4, NaCl: MgSO₄)에 옮겨 교반한다. 이 후 5000 rpm에서 3분 간 원심분리하고 상층액을 0.2 µm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 하였다.

기기분석

트리코테센계 곰팡이 독소를 분석하기 위해 Agilent LC 1200 HPLC system (Agilent technologies, USA)가 부착된

Table 1. Analytical conditions of LC-MS/MS for trichothecene mycotoxins

Parameter	Condition					
Ionization mode	Electrospray ionization (ESI, positive and negative switching mode)					
Column	Imtakt C ₁₈ (2.0 mm I.D × 50 mm, 3 µm)					
Flow rate	300 µL/mL					
Injection Volume	5 µL					
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in distilled water					
	B: 0.1% formic acid in acetonitrile					
	Time (min)	0.0	1.0	6.0	6.5	10.0
	A (%)	100	90	20	100	100
	B (%)	0	10	80	0	0
Analysis mode						
Curtain gas	25					
Collision gas	Medium					
Ion spray voltage	+5500 V (positive mode) -4500 V (negative mode)					
Source temperature	550°C					
Ion source gas 1	50 psi					
Ion source gas 2	50 psi					

4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex, USA)를 이용하였고, 분석용 컬럼은 Imtakt C18 (2.0 mm I.D × 50 mm, 3 μm, USA)를 이용하였다. 이동상은 0.1% formic acid가 포함된 증류수와 0.1% formic acid가 포함된 아세트니트릴을 이용하여 gradient 조건으로 분석하였으며 Table 1과 같다. 이동상의 유속은 300 μL/min으로 하였으며, injection volume은 5 μL로 하였다. 질량분석기로는 전기 분무 이온화(Electrospray Ionization, ESI) 방식을 사용하였으며, 각 독소들의 최적 분석조건들이 다르므로 negative mode와 positive mode에서 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 사용하여 분석의 최적 조건을 설정하였다. LC-MS/MS기기에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다.

시험법 유효성 검증

본 연구에 사용된 분석법은 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인’에 준하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD, S/N = 3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N = 10)로 유효성 검증을 실시하였다¹²⁾.

Results and Discussion

최적기기분석조건 확립

곰팡이 독소의 경우 국내 설정된 기준의 단위가 μg/kg, mg/kg와 같이 낮은 수준으로 고감도 분석이 요구되기 때문에 시료의 간섭물질에 영향을 받지 않고 선택성이 높은 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass spectrometer, LC-MS/MS)를 분석 기기로 선정하였다. 트리코테센계 곰팡이 독소 10종에 대하여 분자이온의 확인을 위하여 nivalenol은 negative mode(-)에서 Q1 scan을 실시하였고, 다른 9종은 positive mode(+)에서 Q1 scan을 실시하였다. 또한 분석대상 물질의 m/z [M-H]⁻ 및 [M+H]⁺에 해당하는 피크를 확인한 후, declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE) 및 collision cell exit potential (CXP)를 조절하여 가장 좋은 감도를 나타내는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로 선정하였으며, 다음으로 나타나는 product ion을 정성이온(cofirmation ion)으로 분석 조건을 설정하였다 (Table 2). 트리코테센계 곰팡이 독소 10종에 대해 선정된 precursor ion과 product ion은 기존의 연구들과 대부분 일

Table 2. MRM data acquisition parameters of LC-MS/MS procedure for trichothecen mycotoxins

Ion mode	Mycotoxins	Abbreviations	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V) ¹⁾	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Negative	Nivalenol	NIV	357.10	281.00 ^{Q2)}	-50.00	-10.00	-18.00	-13.00
				202.80 ^{C3)}	-50.00	-10.00	-24.00	-11.00
	Deoxynivalenol	DON	297.20	249.10 ^Q	50.00	10.00	15.00	12.00
				231.00 ^C	50.00	10.00	15.00	12.00
	Fusarenon X	FUS-X	355.30	175.20 ^Q	23.93	6.28	36.97	11.91
				247.00 ^C	54.06	4.23	12.44	16.40
15-Acetyldeoxynivalenol	15-ACDON	339.10	261.10 ^Q	50.00	10.00	20.00	10.00	
			137.10 ^C	50.00	10.00	20.00	10.00	
3-Acetyldeoxynivalenol	3-ACDON	339.30	231.10 ^Q	70.92	4.88	16.88	3.21	
			213.20 ^C	78.99	7.85	20.29	2.94	
Positive	Verrucarol	VER	267.20	231.00 ^Q	52.88	8.88	15.30	4.38
				249.20 ^C	51.13	8.99	13.66	5.99
	Neosolaniol	NEO	400.20	215.20 ^Q	66.30	4.05	20.81	12.07
				185.10 ^C	68.85	4.95	30.92	9.87
	Diacetoxyscirpenol	DAS	384.30	105.10 ^Q	72.83	4.58	58.82	4.01
				306.90 ^C	77.88	4.11	17.19	6.27
HT-2 toxin	HT-2	447.30	345.00 ^Q	98.67	9.98	27.37	21.87	
			285.40 ^C	94.98	9.90	29.49	15.86	
T-2 toxin	T-2	484.40	215.30 ^Q	72.62	5.58	27.92	12.16	
			185.20 ^C	76.09	5.57	30.72	10.00	

¹⁾DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential

²⁾Q: Quantification ion

³⁾C: Confirmation ion

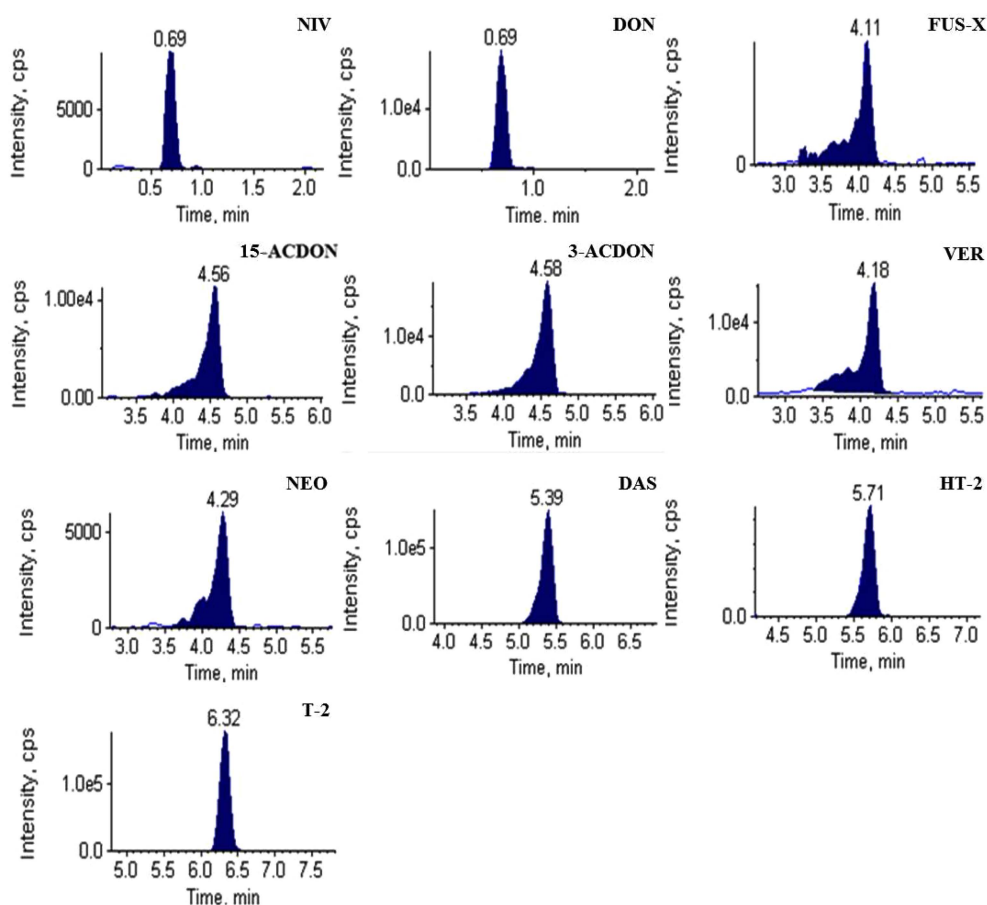


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of trichothecene mycotoxins.

치하였다¹³⁻¹⁴). 확립된 기기분석조건으로 확인한 각 성분의 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다.

추출 및 정제방법의 확립

분석 대상 성분의 최적 추출 용매를 선택하는데 있어서 용해도와 극성도는 매우 중요한 요인이 된다. 본 연구에서는 QuEChERS 추출법을 사용하는 기존 문헌에서 트리코테센계 곰팡이독소를 추출하는데 주로 사용되는 아세트니트릴을 용매로 선정하였다. 또한 matrix effect를 최소화하기 위하여 유지를 비롯한 비 간섭물질에 대한 정제과정을 실시하였다. 특히, 견과류의 경우 지방함량이 약 50% 이상으로 지질로 인한 간섭이 분석물질을 정확히 분석하는데 방해요인으로 작용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 정제방법 최적화를 위하여 d-SPE법과 EMR-Lipid-dSPE법에 대하여 저, 중, 고 3가지 농도로 회수율 비교실험을 수행하였다. d-SPE 정제법은 QuEChERS 추출과 함께 주로 병행되는 실험법으로 견과류 중 토코페롤류와 시토스테롤류 분석 연구에서 71~116%의 회수율을 나타내었다¹⁵). 그러나, 본 연구에서는 d-SPE 정제과정은 FUS-X, NEO, VER의 3 종류의 곰팡이 독소에서 70% 이상의 회수율

을 나타내었다. 반면, EMR-Lipid-dSPE의 경우 트리코테센계 곰팡이 독소 10종에 대하여 70% 이상의 회수율을 나타내었다. 이와 유사하게 식물성 오일 중 농약 분석법 연구에서도 PSA, zirconium dioxide-based sorbent (Z-Sep) 및 EMR-Lipid의 회수율을 비교한 결과 EMR-Lipid에서 213개의 농약 중 83%가 70~120% 이상의 회수율을 나타내었다¹⁶). 이는 EMR 흡착제가 물에 의해 활성화가 된 후 소수성 상호작용이 증대되어 지질을 효과적으로 제거하는 특성을 나타내기 때문이다¹⁷). 따라서 견과류의 트리코테센계 곰팡이 독소를 분석에는 EMR-Lipid-dSPE 정제법이 적합하다고 판단하고 이를 정제방법으로 선택하여 실험을 수행하였다(Table 3).

표준곡선의 직선성과 상관계수 확인

견과류에서의 트리코테센계 곰팡이 독소 10종 표준용액은 아세트니트릴을 이용하여 5포인트의 농도로 희석하여 위의 제시한 LC-MS/MS 조건으로 분석하였다. 직선성은 0.50~150.00 µg/kg의 농도범위에서 상관계수(R^2)값이 0.998 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다(Table 4).

Table 3. Comparison of different clean-up procedures for nut sample

Analytes	Spiking levels (µg/kg)	Recovery (%)	
		d-SPE	EMR-Lipid-dSPE
NIV	12.50-50.00	31.84-58.02	73.01-74.01
DON	18.75-75.00	30.65-59.14	73.67-90.78
FUS-X	18.75-75.00	87.18-98.90	82.35-88.36
15-ACDON	4.00-16.00	50.20-62.42	67.06-81.20
3-ACDON	4.00-16.00	40.77-50.42	79.31-83.21
VER	2.00-8.00	65.72-90.65	72.44-91.01
NEO	2.00-8.00	84.75-116.14	76.26-87.30
DAS	2.00-8.00	23.02-60.10	88.24-89.57
HT-2	12.50-50.00	34.68-51.24	65.17-88.87
T-2	12.50-50.00	46.00-66.60	72.48-88.07

검출한계 및 정량한계

검출한계는 시료 중 존재하는 분석 물질의 검출 가능한 최저한계를 뜻하며, 정량한계는 정량 값으로 나타낼 수 있는 최소량을 의미한다. 검출한계는 $3.3s/S$ (s : standard deviation of y-intercepts of regression analysis, S : slope of a calibration curve)의 수식에 의해 산출한 결과 0.41~3.57 µg/kg로 나타났으며, 정량한계는 $10s/S$ (s : standard deviation of y-intercepts of regression analysis, S : slope of a calibration curve)의 수식에 의해 산출한 결과 1.23~10.82 µg/kg로 나타났다(Table 4).

정밀성 확인

정밀도를 확인하기 위하여 10종의 혼합 표준용액을 3가지 농도로 첨가하여 3반복으로 수행하였으며, 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 분석한 결과를 상대표준편차(Relative Standard Deviation, RSD)로 나타내었다(Table 5). Intra-day와 inter-day 변이계수는 각각 0.40~8.44% 및 1.93~12.46%

로 나타났으며, EU 가이드라인의 $RSD_R \leq 30\%$ 에 적합하였다.

회수율을 이용한 정확성 확인

정확성을 확인하기 위하여 회수율을 측정하였다. 회수율은 트리코테센계 곰팡이독소가 검출되지 않은 땅콩에 10종의 혼합 표준용액을 저, 중, 고의 농도로 처리하여 LC-MS/MS로 분석하여 검출되는 농도를 확인하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 혼합 표준용액에 대한 회수율은 81.84~96.87%로 앞서 실험한 예비 실험 회수율보다 높은 결과를 나타내었다. 이는 표준용액의 처리 농도와 EMR-lipid의 활성화 차이에 기인한 것으로 판단된다. 본 분석법은 Codex 가이드라인에서 권장하는 회수율 70~120% 및 분석오차 20% 미만에 충족하는 결과로 분석법으로서 적합함을 확인하였다.

국내 유통 땅콩 중 트리코테센계 곰팡이 독소 함량

개발한 시험법의 적용을 위하여 국내 생산되는 대표적인 견과류 중 하나인 땅콩을 선택하였으며, 각 지역별 및 수입품에 대하여 실험을 수행하였다. 총 26종의 땅콩에 대하여 트리코테센계 곰팡이 독소를 분석한 결과(Table 6), 충청북도에서 생산된 땅콩 1종에 대해서만 deoxynivalenol이 검출되었으며, 검출량은 71.56 µg/kg로 나타났다. 이는 중국에서 유통되는 곡류 및 견과류의 deoxynivalenol 오염도를 조사한 결과와 유사한 것으로 땅콩의 경우 시료 95개에서 19.0%의 검출률을 나타내었으며, 검출 범위는 8.7~559.0 µg/kg로 나타났다¹⁸⁾. 현재 견과류의 경우 deoxynivalenol에 대한 품질관리 기준은 없으나 국내 곡류 및 그것을 단순처리한 것, 옥수수 및 그것을 단순 처리한 것, 시리얼류, 영아용 조제식 등에 대한 기준(0.2~1 mg/kg 이하)보다는 낮은 오염도를 나타내었다. 따라서 추후 견과류 중 트리코테센계 곰팡이독소 모니터링 조사를 통한 안전관리 기준 확보가 필요한 것으로 판단된다.

Table 4. Correlation coefficients of the calibration curves, and detection (LOD) and quantitation (LOQ) limits

Analytes	Linearity Range (µg/kg)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R ²)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
NIV	3.13-100.00	550.461	-528.657	0.999	2.63	7.96
DON	4.69-150.00	319.634	-2.106	1.000	1.11	3.36
FUS-X	4.69-150.00	184.056	-35.063	0.999	1.78	5.40
15-ACDON	1.00-2.00	693.167	227.393	0.999	0.92	2.79
3-ACDON	1.00-32.00	1491.966	1365.771	1.000	0.84	2.53
VER	0.50-16.00	1478.580	414.909	0.999	0.66	1.99
NEO	0.50-16.00	1891.518	1169.138	0.999	0.41	1.23
DAS	0.50-16.00	2726.751	40.697	0.999	0.75	2.26
HT-2	3.13-100.00	256.287	320.703	1.000	0.57	1.74
T-2	3.13-100.00	2312.883	1729.088	0.998	3.57	10.82

Table 5. Recoveries of trichothecene mycotoxins from peanut spiked at three different concentration

Analytes	Concentration (µg/kg)	RSD (%)		Recovery (%)	Analytes	Concentration (µg/kg)	RSD (%)		Recovery (%)
		Intra-day (n = 3)	Inter-day (n = 9)				Intra-day (n = 3)	Inter-day (n = 9)	
NIV	100.00	3.21	3.63	91.23 ± 2.91	VER	25.00	2.66	2.99	92.61 ± 2.45
	25.00	5.63	5.24	90.35 ± 4.97		6.25	2.29	2.81	92.47 ± 2.05
	6.25	2.35	3.40	89.69 ± 4.22		1.56	2.29	2.55	92.15 ± 1.84
DON	75.00	3.31	5.98	95.45 ± 7.38	NEO	20.00	2.04	3.23	93.26 ± 2.86
	18.75	0.50	3.83	91.97 ± 3.60		5.00	4.70	4.29	94.44 ± 2.59
	4.69	6.00	10.24	84.56 ± 5.67		1.25	5.06	12.46	88.98 ± 2.81
FUS-X	75.00	2.49	4.88	87.53 ± 1.10	DAS	20.00	6.86	5.65	93.64 ± 6.09
	18.75	3.57	5.89	90.90 ± 3.30		5.00	5.19	5.46	91.06 ± 3.12
	4.69	1.42	3.88	91.69 ± 2.74		1.25	8.44	8.87	84.63 ± 5.86
15-ACDON	50.00	1.94	4.14	85.19 ± 1.52	HT-2	100.00	0.40	1.93	90.82 ± 3.38
	12.50	4.42	3.97	85.51 ± 4.17		25.00	5.66	6.88	81.84 ± 2.99
	3.13	6.39	8.69	88.48 ± 4.48		6.25	4.59	5.35	91.31 ± 5.02
3-ACDON	50.00	0.84	2.74	93.10 ± 1.56	T-2	100.00	3.38	7.02	92.94 ± 4.29
	12.50	6.76	6.69	95.59 ± 2.41		25.00	5.74	3.74	96.77 ± 4.78
	3.13	6.59	9.03	86.69 ± 5.25		6.25	3.27	5.47	96.87 ± 3.05

Table 6. Amount of trichothecene mycotoxins in nuts

Country	Region	Tested sample	Analyte (µg/kg)									
			NIV	DON	FUS-X	15-ACDON	3-ACDON	VER	NEO	DAS	HT-2	T-2
Korea	Gangwon	1	N.D ¹⁾	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Chungnam	6	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Chungbuk	3	N.D	71.56 ± 4.42	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Gyeonggi	2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Jeonnam	2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Jeonbuk	2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Gyeongnam	2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Gyeongbuk	2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Jeju	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
China	Mydriasis	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Jilin	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Vietnam	-	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Thailand	-	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
USA	-	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

¹⁾N.D: Not detected

Acknowledgement

본 논문은 2018년도 과학기술정보통신부 재원으로 한국식품연구원의 지원(E0187200-01)을 받아 수행된 연구성과입니다.

국문요약

견과류 중에 있는 트리코테센계 곰팡이독소 오염도를 조

사하기 위하여 LC-MS/MS를 이용한 정확성과 신뢰성을 동시에 확보할 수 있는 분석방법을 개발하였다. 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소는 QuEChERS 추출 및 EMR-Lipid-dSPE 정제과정을 통하여 분석에 사용되었다. 검량선 작성을 위하여 트리코테센계 곰팡이독소 10종에 대하여 2.00~75.00 µg/kg의 범위로 혼합표준용액을 제조하여 실험하였으며, 상관계수는 모두 0.998 이상으로 높은 직선성을 나타내었다. 분석방법의 검출한계는 0.41~3.57 µg/kg로 나타났으며, 정량한계는 1.23~10.82 µg/kg로 나타났다. 또한

트리코테센계 곰팡이 독소 10종에 대하여 각각 저, 중, 고 3가지 농도로 처리하여 회수율 실험을 수행한 결과 81.84~96.87%로 나타났다. 확립된 분석법으로 견과류 중 땅콩을 대상으로 오염도를 조사한 결과 1종에서 deoxynivalenol이 검출되었다. 이러한 결과를 바탕으로 확립된 시험법은 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소 분석에 적합함을 확인할 수 있었으며 견과류 중 트리코테센계 곰팡이 독소 검출 가능성을 확인한바 보다 다양한 종류의 견과류에 대한 모니터링 조사가 필요한 것으로 판단된다.

References

1. Minervini, F., F. Fornelli, K. M. Flynn.: Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro*, **18(1)**, 21-28 (2004).
2. Bennett, J. W., Klich, M.: Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497-516 (2003).
3. Lei, M. Y., Zhang, N. Y., Qi, D. S.: In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1 and other selected mycotoxins on the cell line Porcine Kidney 15. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **65**, 1149-1157 (2013).
4. Luongo, D., Severino, L., Bergamo, P., De Luna, R., Lucisano, A., Rossi, M.: Interactive effects of fumonisin B1 and alpha-zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells. *Toxicol in Vitro*, **20**, 1403-1410 (2006).
5. Li, Y., Zhang, J., Mao, X., Wu, Y., Liu, G., Song, L., Cao, X.: High-sensitivity chemiluminescent immunoassay investigation and application for the detection of T-2 toxin and major metabolite HT-2 toxin. *J. Sci. Food and Agric.*, **97(3)**, 818-822 (2017).
6. Desmarchelier, A., Tessiot, S., Bessaire, T., Racault, L., Fiorese, E., Urbani, A., Mottier, P.: Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. A*, **1337**, 75-84 (2014).
7. Thompson, W. L., Wannemacher Jr, R. W.: Structure-function relationships of 12, 13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon*, **24(10)**, 985-994 (1986).
8. Soleimany, F., Jinap, S., Rahmani, A., Khatib, A.: Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system. *Food Add. Cont.*, **28(4)**, 494-501 (2011).
9. Goryacheva, I. Y., Saeger, S. D., Eremin, S. A., Peteghem, C. V.: Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. *Food Add. Cont.*, **24(10)**, 1169-1183 (2007).
10. Azaiez, I., Giusti, F., Sagratini, G., Mañes, J., & Fernández-Franzón, M.: Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure. *Food analytical methods*, **7(4)**, 935-945 (2014).
11. Kim, S., Lee, S., Nam, T. G., Seo, D., Yoo, M.: Comparison of a newly developed liquid chromatography with tandem mass spectrometry method and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of multiple mycotoxins in Red pepper powder. *J. Food Prot.*, **80(8)**, 1347-1354 (2017).
12. Guideline for the validation drug analysis procedure (Ministry of food and Drug Safety B1-2012-2-013, 2012).
13. Habler, K., Gotthardt, M., Schüller, J., Rychlik, M.: Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chem.*, **218**, 447-454 (2017).
14. Amirahmadi, M., Shoeibi, S., Rastegar, H., Elmi, M., Mousavi Khaneghah, A.: Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure. *Toxin Reviews*, 1-9 (2017).
15. Delgado-Zamarreño, M. M., Fernández-Prieto, C., Bustamante-Rangel, M., & Pérez-Martín, L.: Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by QuEChERS-liquid chromatography. *Food Chem.*, **192**, 825-830 (2016).
16. Vázquez, P. P., Hakme, E., Uclés, S., Cutillas, V., Galera, M. M., Mughari, A. R., Fernández-Alba, A. R.: Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromat. A*, **1463**, 20-31 (2016).
17. Farè, F., Dei Cas, M., Arnoldi, S., Casagni, E., Visconti, G. L., Parnisari, G., Roda, G.: Determination of methyldibromoglutaronitrile (MDBGN) in skin care products by gas chromatography-mass spectrometry employing an enhanced matrix removal (EMR) lipid clean-up. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **120(4)**, 1700525 (2018).
18. Sun, J., Wu, Y.: Evaluation of dietary exposure to deoxynivalenol (DON) and its derivatives from cereals in China. *Food Cont.*, **69**, 90-99 (2016).