

# LC-MS/MS를 이용한 반려동물 사료에서 곰팡이독소 동시분석법 유효성 확인

최윤화\*, 안우석, 김지은, 김두환

서울특별시보건환경연구원

## Validation of simultaneous mycotoxin analysis method in pet food using LC-MS/MS

Yoon Hwa Choi\*, Woo Seok Ahn, Ji Eun Kim, Doo Hwan Kim

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment, Gwacheon 13818, Korea

Received July 27, 2022  
Revised August 26, 2022  
Accepted September 2, 2022

Corresponding author:

Yoon Hwa Choi

E-mail: cyw1215@seoul.go.kr

https://orcid.org/0000-0001-7969-4866

The simultaneous analysis of mycotoxins using LC-MS/MS, a food official analysis method, was applied with compound feed for pets with high consumer preferences. In this study, the linearity of all calibration curves showed good linearity of 0.99 or more. and both the accuracy (recovery rate) and precision (repeatability) criteria of the concentration range for each mycotoxin in the National Agricultural Products Quality Management Service's Validation and Verification Guidelines were met. And as a result of analyzing FAPAS QCM in the same way, it was assessed that the z-scores of Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, Zearalenone, and Fumonisin B<sub>1</sub>, were within  $\pm 2$  range. This study showed that the application of the food official analysis method to compound feed for pets is suitable.

**Key Words:** Validation of mycotoxin, Pet food, LC-MS/MS

### 서론

우리나라 반려동물 양육가구수는 2018년 511만, 2019년 591만에서 2020년에는 638만으로 꾸준히 증가하고 있고, 양육하고 있는 반려동물 종류는 개(81.6%)와 고양이(28.6%)가 대부분을 차지하고 있다(주)메트릭스리서치, 2020). 시장조사업체 유로모니터에 따르면 2018년 국내 반려동물 용품·서비스 시장 규모는 1조 6,800억원으로 그 중 개와 고양이 사료가 9500억원으로 전체의 56.5%를 차지한다.

국내 펫푸드 시장은 환율변화 및 코로나 이슈 등 대내외 환경 변화의 영향으로 2019~2020년 성장이 소폭 감소하였으나 꾸준히 증가하는 추세이다(한국농수산식품유통공사, 2021). 그러나 사료 시장의 성장에 반해 반려동물 사료에 대한 품질과 안전성 문제는 지속적으로 발생하고 있다. 2004년 우리나라에서 곰팡이독소에 의한 신부전 증후군으로 강아지 3마리가 죽는 사고

가 있었고(Jeong 등, 2006), 2020년 12월 미국에서는 반려동물 수시마리가 죽는 사고가 발생했는데 이는 Midwestern Pet Foods사가 제조한 Sportmix 브랜드 사료에서 아플라톡신 과다오염으로 인한 것으로 판명되어 미국 FDA에서 리콜 조치하였다. 식품 및 사료에서 발견되는 중요한 곰팡이독소는 아플라톡신, 오크라톡신, 푸모니신, 데옥시니발레놀 및 제랄레놀로 보고되었는데(Rodrigues와 Naehrer, 2012), 이 중 아플라톡신은 가장 유해할 뿐 아니라 오염도가 높은 곰팡이독소로 발암성, 기형발생, 유전독성 등의 특징을 갖기 때문에 인체와 동물의 건강에 위험하다(Squire 1981; Trail 등, 1995; Calvo 등, 2002). 아플라톡신을 비롯한 독소를 생성하는 곰팡이는 토양 등 환경에 널리 분포되어 있으며 기후온난화에 따라 이들 곰팡이가 곡물 및 농식품에 쉽게 오염되어 독소를 생성할 가능성이 증가하고 있다(식품의약품안전처, 2017). 곰팡이는 곡류 재배과정이나 사료의 저장과정에서 독소를 분비하는데, 대부분의 곰팡이독소

는 사료 제조과정에서 파괴되지 않는다(Pleadin 등, 2012).

우리나라는 「사료관리법」의 「사료 내 유해물질의 범위 및 허용기준」과 「식품위생법」의 「식품의 기준 및 규격」에서 각각 사료와 식품의 곰팡이독소 기준을 고시하여 관리하고 있다. 우리나라 곰팡이독소 기준은 Table 1과 같이 식품과 사료의 기준이 다르고 식품에서 더 낮은 수준으로 관리하고 있다. 그리고 곰팡이독소 분석방법으로 식품 공인분석법은 면역친화성컬럼(im-muno affinity column, IAC)으로 정제 후 형광검출기를 이용한 HPLC (high performance liquid chromatography) 개별 분석법, 곰팡이독소 다성분분석용 SPE (solid phase extraction) 컬럼으로 정제 후 액체크로마토그래프 질량분석기 (HPLC-MS/MS)를 이용한 동시분석법이 있다. 사료 공인분석법은 고전적인 TLC (thin layer chromatography)법부터 효소 면역측정법, HPLC법 등의 방법이 있는데, 동시분석법으로는 동시분석용 IAC 정제 후 형광검출기를 이용한 HPLC법과 최근 d-SPE (dispersive-solid phase extraction)을 이용한 HPLC-MS/MS가 추가되었다(식품의약품안전처, 2022; 농림축산식품부, 2021).

사료 공인분석법에 등재된 IAC를 이용한 동시분석법(농림축산식품부, 2021)은 Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone 등 3가지 물질을 HPLC로 검사하는 방법으로 배합사료에 검출율이 높은 Fumonisin이 빠져있다. 본 연구는 Fumonisin까지 검출 가능한 다성분분석용 SPE로 정제하고, 극미량 분석으로 많이 사용하고 있는 질량분석기를 이용한 식품공전의 곰팡이독소 동시분석법을 반려동물 사료에 적용하여 분석법의 유효성 확인을 하였다. 분석법의 유효성 확인이란 분석법이 의도된 목적에 적합하다는 것을 증명하기 위해 유효성 요소를 확인하는 일련의 절차로, 새로운 방법이 개발될 때, 기존의 확인된 방법이 크게 수정되거나 기존의 확인된 방법이 개발된 것과 크게 다른 샘플 매트릭스에 적용되는 경우에 수행한다. 본 연구는 식품분석법의 유효성 확인을 통해 사료의 분석 가능성과 함께 빠져있는 fumonisin의 동시분석 가능 여부를 확인하고자 하였다.

**Table 1.** MRL (Maximum residue limits) of mycotoxins in food and feed

Mycotoxins	Food	Feed
Aflatoxin (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )	0.10~15.0 µg/kg	10~50 µg/kg
Ochratoxin A	5.0~20 µg/kg	200~250 µg/kg
Fumonisin (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	1~4 mg/kg	5~60 mg/kg
Zearalenone	20~200 µg/kg	100~3000 µg/kg

## 재료 및 방법

### 시험재료

반려동물 배합사료는 건식, 반습식, 습식(켄사료)로 대별되는데, 본 연구에서는 소비자의 구입 선호도가 높은 건식사료(한국농수산식품유통공사, 2021)를 구입하여 분쇄 후 -20℃에서 보관하며 사용하였다. 구입한 사료 중 곰팡이 독소가 검출되지 않은 Grain free 익스트루전 사료를 유효성 확인을 위한 시료로 선정하여 사용하였다. 그리고 Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS, UK)에서 구입한 Mycotoxins in Animal Feed (Cereal Based) Quality control material (QCM, T04402QC)도 -20℃에서 보관하며 사용하였다.

Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, Ochratoxin A, Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, Zearalenone 표준품은 Biopure사의 reference materials를 이용하였다.

### 시험용액 조제

식품공전(식품의약품안전처, 2022)에 따라 검체 5 g을 원심관에 취해 0.1% 개미산을 함유한 50% 아세트니트릴 용액 20 mL 가하고 30분간 추출 후 3,700 G에서 10분간 원심분리(Beckman Coulter®, California, USA)한다. 원심분리한 액을 유리섬유여과지(Whatman, UK)로 여과 한 후 여액 3 mL에 물을 가해 15 mL가 되게 하여 추출액으로 한다. Isolute 카트리지(Biotage, Sweden)를 아세트니트릴 2 mL, 물 2 mL로 활성화시킨 후 추출액 5 mL를 주입하여 통과시킨다. 이어서 물 2 mL, 10% 아세트니트릴 용액 2 mL를 같은 유속으로 통과시킨 후 정제 카트리지 내에 남아 있는 용액을 완전히 제거한다. 0.1% 개미산을 함유한 아세트니트릴 용액 2 mL, 메탄올 4 mL로 용출시킨 후 50℃에서 질소로 건조시킨다. 건조물에 0.1% 개미산을 함유한 50% 메탄올 용액 1 mL를 가하여 용해시킨 후 필터(PTFE, 0.2 µm)로 여과한 액을 최종 시험용액으로 한다.

### 분석기기 및 조건

본 연구에 사용한 분석기기는 Tandem quadrupole Mass spectrometer (Thermo fisher scientific, USA)를, 컬럼은 Hypersil GOLD (2.1×100 mm, 1.9 µm, Thermo fisher scientific, USA)을 이용하였다.

이동상 용매는 0.1 % formic acid (Fluka, USA)가 함유된 물

과 0.1 % formic acid가 함유된 Methanol (Merck사, Darmstadt, Germany) 이용하였으며 이동상 조성 및 gradient 조건은 Table 2와 같다. 각 물질별 단일 표준물질 0.2 µg/mL 농도를 직접 MS/MS에 주입하여 식품공전에서 제공한 곰팡이독소별 정량이온 EIC (extracted ion chromatogram)표에 의거 Precursor ion을 선발하였으며, collision energy를 조절하여 물질별로 두 개의 product ion을 선발하였다. 각 물질별 MRM (multiple reaction monitoring) 분석조건은 Table 3, 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

## 결과 및 고찰

### 크로마토그램 및 표준곡선

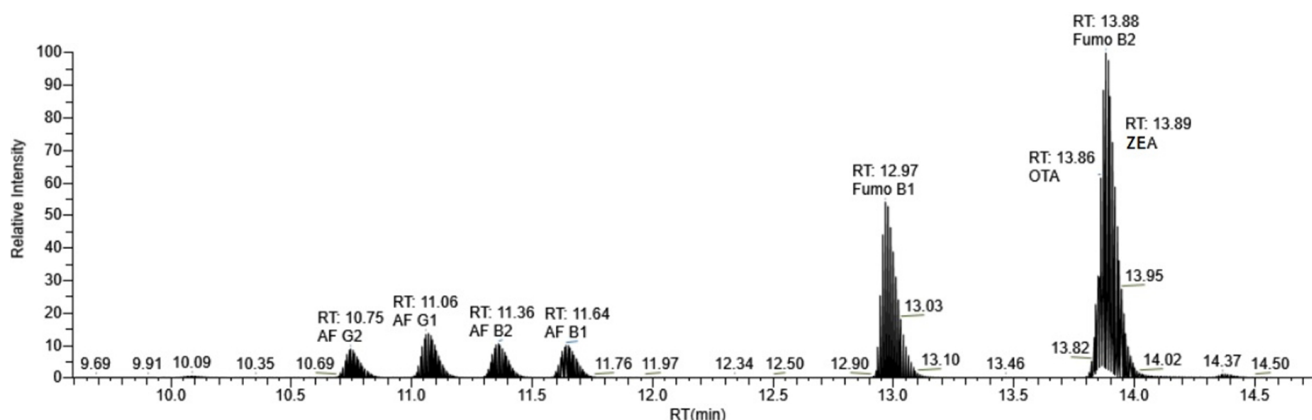
곰팡이 독소 혼합 표준용액을 1.25~100 ng/mL 수준으로 음성시료 추출·정제액에 첨가하여 검량선(matrix-matched calibration curve)을 작성하고, LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 표준곡선을 작성한 결과 상관계수 값이 모두 0.99 이상의 정의 상관관계( $r^2$ )를 보였다 (Fig. 2). 국립농산물품질관리원의 「사료분석법의 유효성 확인

**Table 2.** HPLC and MS conditions

Column	Hypersil Gold (2.1×100 mm, 1.9 µm)		
Mobile solvent	A: 0.1% Formic acid in water B: 0.1% Formic acid in methanol		
Column temperature	35°C		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	5 µL		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	3	90	10
	13	5	95
	13.1	5	10
	20	90	10
Ionization	ESI (positive or negative mode)		
Ion voltage	3.5 kV (positive), 2.5 kV (negative)		
Temperature	Ion Transfer tube temp. 300°C Vaporizer temp. 450°C		

**Table 3.** MRM parameters for analysis of mycotoxin

Mycotoxin	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Ion mode
Aflatoxin B <sub>1</sub> (AF B <sub>1</sub> )	312.95	240.975 285.021	39.08 23.65	+
Aflatoxin B <sub>2</sub> (AF B <sub>2</sub> )	315	258.917 287	30.55 25.73	+
Aflatoxin G <sub>1</sub> (AF G <sub>1</sub> )	328.962	199.02 243	41 27.93	+
Aflatoxin G <sub>2</sub> (AF G <sub>2</sub> )	330.962	189.02 245	36 30.62	+
Fumonisin B <sub>1</sub> (Fumo B <sub>1</sub> )	722.25	334.167 352.167	40 37	+
Fumonisin B <sub>2</sub> (Fumo B <sub>2</sub> )	706.417	318.167 336.167	40 38	+
Ochratoxin A (OTA)	403.962	220.946 238.946	38.36 24.86	+
Zearalenone (ZEA)	317.038	130.929 174.929	29.71 24.29	-



**Fig. 1.** Total ion chromatogram of mycotoxins (AF B<sub>1</sub>, AF B<sub>2</sub>, AF G<sub>1</sub>, AF G<sub>2</sub>, Fumo B<sub>1</sub>, Fumo B<sub>2</sub>, OTA, ZEA).

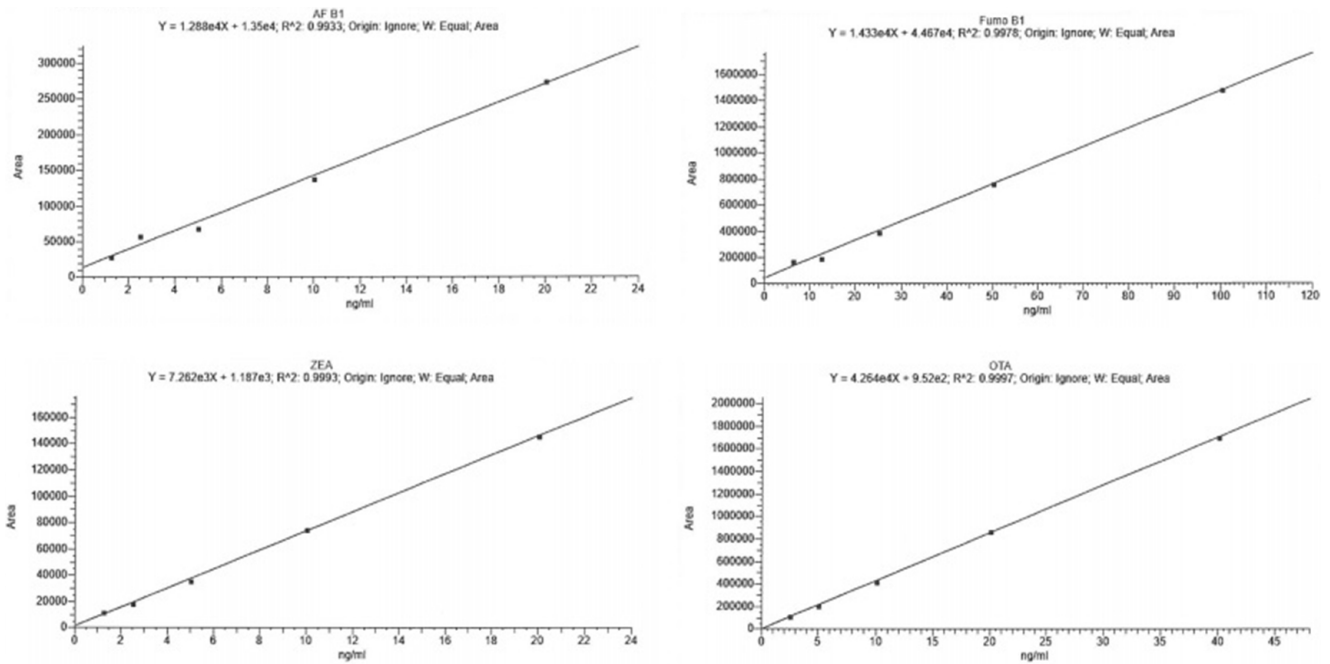


Fig. 2. The calibration curves and correlation coefficient of mycotoxins.

Table 4. Recovery of mycotoxins

Compounds	Fortified concentration (μg/kg)	Recovery±RSD (% , n=3)	Coefficient of variation (%)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	2.5	100.0±0.1	4.0
	5	94.0±0.1	2.1
	10	93.7±0.2	1.6
Ochratoxin A	2.5	92.3±0.1	3.6
	5	72.8±0.1	2.2
	10	72.8±0.3	4.1
Zearalenone	2.5	71.5±0.1	7.9
	5	69.3±0.2	5.8
	10	71.9±0.2	3.4
Fumonisin B <sub>1</sub>	12.5	80.1±0.5	5.0
	25	87.6±1.0	4.5
	50	115.9±2.1	3.6

및 검증 지침 (2021)의 직선성 기준은 0.98 이상으로 기준에 적합하였다.

정확도 및 정밀도

4가지 분석 대상 물질이 검출되지 않은 시판 grain free 반려동물 사료에 Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, Zearalenone 은 2.5, 5, 10 μg/kg, Fumonisin B<sub>1</sub>은 12.5, 25, 50 μg/kg이

Table 5. Guidance criteria of NAQS\*

Compounds	Concentration range (μg/kg)	Recovery (%)	RSDr <sup>†</sup> (%)
Aflatoxin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> ,	1 ~ 10	70 ~ 110	≤20
Ochratoxin A	1 ~ 10	70 ~ 110	≤20
Zearalenone	≤50	60 ~ 120	≤40
Fumonisin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub>	≤500	60 ~ 120	≤30

\*NAQS, National Agricultural Products Quality Management Service.

†RSDr, Repeatability.

되도록 첨가하여 3회 반복 실험하였다. 평균 회수율은 69.3 ~ 115.9%이었고, 상대표준편차(RSD%)는 2.1% 이하, 변이계수는 7.9% 이하로 조사되었다(Table 4). 이는 국립농산물품질관리원의 「사료분석법의 유효성 확인 및 검증 지침」의 곰팡이독소별 농도 범위의 정확도(회수율)와 정밀도(반복성) 기준(Table 5)을 모두 충족하였다.

FAPAS QCM을 이용하여 숙련도 평가를 수행한 결과는 Table 6과 같으며, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin B<sub>1</sub> 등 4가지 물질 모두 z-score가 ±2 범위 안에 있으므로 분석을 적절하게 수행하였음을 알 수 있었다.

**Table 6.** QCM analysis results for Mycotoxins(unit :  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Compounds	Times			Average	Assigned value	Range for $ z  \leq 2$
	1	2	3			
Aflatoxin B <sub>1</sub>	23.2	23.6	23.6	23.4	20.4	11.4~29.4
Ochratoxin A	31.5	31.6	30.9	31.3	45.7	25.6~65.8
Zearalenone	12.8	13.0	12.7	12.8	18.9	10.6~27.1
Fumonisin B <sub>1</sub>	368.0	366.8	368.9	367.9	313	194~432

**Table 7.** Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Compounds	LOD* ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ <sup>†</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Aflatoxin B <sub>1</sub>	0.32	0.96
Ochratoxin A	0.04	0.13
Zearalenone	0.09	0.27
Fumonisin B <sub>1</sub>	0.74	2.21

\*( $\sigma/S$ ) $\times 3$ .<sup>†</sup>LOD $\times 3$ . $\sigma$ , standard deviation of the response; S, slope of the calibration curve.

### 검출한계 및 정량한계

4가지 분석 대상 물질이 검출되지 않은 blank sample에 Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, Zearalenone 이 1.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Fumonisin B<sub>1</sub>은 12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이 되도록 첨가하여 7회 실험하여 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 산출한 결과, 검출한계는 0.04~0.74  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 정량한계는 0.13~2.21  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다(Table 7).

「사료 분석법의 유효성 확인 및 검증 지침」에 따라 직선성, 정확성, 정밀도, 검출한계와 정량한계 등 유효성 확인을 수행한 결과, 반려동물 배합사료를 식품공전의 아플라톡신(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), 오크라톡신 A, 제랄레논, 푸모니신(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) 동시분석법에 적용 가능함을 확인하였다.

국내에서 가축 사료 중 곰팡이독소 오염도 조사 연구가 활발히 이루어지고 있지만(Ra 등, 2018; 대한한돈협회, 2021; Shin 등, 2021) 반려동물 사료는 그렇지 못한 실정이다. 2020년 우리원에서 수행한 반려동물 사료에서 곰팡이독소 오염도 조사연구에 따르면 유통 사료 60건 중 43건(71.6%)에서 곰팡이독소가 검출되었다(서울특별시, 2021). 검출된 곰팡이독소는 아플라톡신, 오크라톡신 A, 제랄레논으로 모두 기준에 적합하였지만 검출율이 높았다. 곰팡이독소는 열처리를 포함한 애완동물 사료 생산 라인 대부분의 가공 단계에서 살아남는 경향이 있어서 일

단 애완동물 사료에 형성되면 애완동물에게 중요한 음식 매개 위험성을 나타내므로(Atungulu 등, 2018) 지속적인 모니터링이 필요하다. 식품의 경우 식품의약품안전처 주관 식품별 오염물질 오염도 조사 사업으로 전국 시도보건환경연구원에서 매년 곰팡이독소 검사를 수행하고 있다. 이번 연구를 통해 식품과 사료를 동시에 검사하는 기관에서는 곰팡이독소 분석에 있어 동일한 분석법 적용으로 업무의 효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

반려동물 배합사료 중 소비자 구입 선호도가 높은 건식 사료를 가지고 식품공전의 LC-MS/MS를 이용한 곰팡이독소 동시 분석법을 적용한 결과, 검량선의 직선성은 모두 0.99 이상의 양호한 직선성을 보였으며, 국립농산물품질관리원 「사료분석법의 유효성 확인 및 검증 지침」의 곰팡이독소별 농도 범위의 정확도(회수율)와 정밀도(반복성) 기준을 모두 충족하였다. 그리고 FAPAS QCM을 동일한 방법으로 분석한 결과, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin B<sub>1</sub> 등 4가지 물질 모두 z-score가  $\pm 2$  범위 안에 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 반려동물 사료에 식품공인 분석방법의 적용이 가능함을 알 수 있었다.

## CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ORCID

Yoon Hwa Choi, <https://orcid.org/0000-0001-7969-4866>

Woo Seok Ahn, <https://orcid.org/0000-0001-8902-1649>

Ji Eun Kim, <https://orcid.org/0000-0001-6564-5078>

Doo Hwan Kim, <https://orcid.org/0000-0002-7266-4004>

## REFERENCES

- 국립농산물품질관리원. 2021. 사료 분석법의 유효성 확인 및 검증 지침.
- 농림축산식품부. 2021. 사료등의 기준 및 규격. 농림축산식품 부고시 제2021-99호.
- 대한한돈협회. 2021. 2021년도 배합사료 품질 모니터링 사업 최종보고서.
- 서울특별시. 2021. 특별기획과제. pp 272-299. 2020 보건환경백서. (주)디자인여백플러스, 서울.
- 식품의약품안전처. 2017. 아플라톡신 저감화 최근 연구동향.
- 식품의약품안전처. 2022. 식품의 기준 및 규격. 식품의약품안전처고시 제2022-25호.
- (주)메트릭스리서치. 2020. 2020 동물보호에 대한 국민의식조사 결과보고서.
- 한국농수산물유통공사. 2021. 2020 펫푸드 시장현황 보고서.
- Atungulu GG, Shad ZM, Wilson S. 2018. Mycotoxin Issues in Pet Food. pp. 25-44. Food and Feed Safety Systems and Analysis. Academic press. ScienceDirect.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.
- Jeong WI, Do SH, Jeong DH, Chung JY, Yang HJ, Yuan DW, Hong IH, Park JK, Goo MJ, Jeong KS. 2006. Canine renal failure syndrome in three dogs. *J Vet Sci.* 7(3):299-301.
- Pleadin J, Zadavec M, Persi N, Vulic A, Jaki V, Mitak M. 2012. Mould and mycotoxin contamination of pig feed in northwest Croatia. *Mycotoxin Res* 28:157-162.
- Ra DK, Choi JY, Kim SH, Lee SH, Lee JH, Lee JG, Lee SM. 2018. The studies on mycotoxin contamination of forages using LC-MS/MS. *인천보건환경연구원보* 16: 466-476.
- Rodrigues I, Naehrer K. 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4:663-675.
- Shin HS, Kim KH, Seo JS, Son YM, Park JY, Yoon SS, Jung BY. 2021. Prevalence of mycotoxin contamination in pig feedstuffs. *Korean J Vet Serv.* 44(4):315-320.
- Squire RA. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach *Science* 214: 877-880.
- Trail F, Mahanti N, Linz J. 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis *Microbiology* 141: 755-765.