

SPE와 LC-MS/MS를 이용한 식품 중 18종 곰팡이 독소 검출을 위한 저비용 및 고감도 분석법의 검증

Validation of a Low-Cost and Highly-Sensitive Method for Determination of Eighteen Mycotoxins in Food Matrices Using SPE and LC/MS/MS

■ 서론

곰팡이독소는 식품의 습도가 높은 환경에서 특정 곰팡이에 의해 생성되는 대사산물이다. 곰팡이독소는 잠재적인 돌연변이 유발성 및 발암성 물질로 알려져 있어 식품에서 전 세계적으로 엄격하게 모니터링되고 있다. 유럽연합(EU)과 같은 당국은 식품 내 곰팡이 독소에 대해 엄격한 규제를 도입하고 있다. 미량의 아플라톡신을 분석하기 위해 면역친화성 SPE가 개발되었고 이는 분석 전 샘플 정제에 사용되고 있다. 하지만 모니터링 할 18종의 곰팡이독소를 모두 회수할 수 있는 단일 카트리지는 없으며, 면역친화성 카트리지의 가격도 다소 높은 편이다. 따라서 우리는 EU 규제에서 요구하는 LOQ를 충족시키기 위한 고감도 LC-MS/MS 분석을 하고자 극성 물질 6개 및 상대적으로 극성이 작은 12개 물질의 곰팡이독소를 효율적으로 회수하기 위해 두 가지 조건에서 ISOLUTE 카트리지를 사용하는 SPE 분석법을 개발 및 검증하였다.

■ 실험

분석 조건 및 샘플 전처리

18종 곰팡이독소 표준품은 Supelco, Sigma Aldrich 및 Romer Labs에서 구매하였다. SPE 카트리지는 ISOLUTE® Myco - Biotage는 Biotage에서 구매하였다. 18종의 곰팡이독소 화합물은 극성에 따라 두 그룹으로 나누었고 두 가지 다른 방법으로 전처리 하였다(그림 1).

전처리 1	전처리 2
<ol style="list-style-type: none"> 1. 샘플 1g을 측정하여 원심분리용 튜브에 넣는다. 2. 1% 포름산 수용액 4 mL를 추가하고 10분 간 혼합한다. 3. 9000 rpm으로 10분 간 원심분리한다. 4. 상층액 1 mL를 4 mL의 증류수로 옮긴다. 10분 간 혼합하고 3번 과정을 반복한다. 5. SPE <ul style="list-style-type: none"> > ACN 2 mL를 추가한다. > 증류수 2 mL를 추가한다. > 상층액 1 mL를 로딩한다. > 증류수 1 mL로 세척한다. > 건조 시킨다. > ACN 1 mL로 용출한다. 6. 질소 기체로 건조시켜 용액을 날려보낸 후 10% ACN 1mL로 재용해 한다. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 샘플 1g을 측정하여 원심분리용 튜브에 넣는다. 2. 0.1% 포름산 증류수/아세트니트릴 (1/1) 용액 4 mL를 추가하고 10분 간 혼합한다. 3. 9000 rpm으로 10분 간 원심분리한다. 4. 상층액 1 mL를 4 mL의 증류수로 옮긴다. 10분 간 혼합하고 3번 과정을 반복한다. 5. SPE <ul style="list-style-type: none"> > ACN 2 mL를 추가한다. > 증류수 2 mL를 추가한다. > 상층액 4 mL를 로딩한다. > 증류수 2 mL로 세척한다. > 10% ACN 2 mL로 세척한다. > 건조 시킨다. > 1% 포름산 아세트니트릴 용액으로 용출한다. > 1% 포름산 메탄올 용액으로 용출한다. 6. 질소 기체로 건조시켜 용액을 날려보낸 후 10% ACN 1mL로 재용해 한다.

그림 1. 두 그룹 곰팡이독소의 샘플 전처리 방법

삼중 사중극자 LC-MS/MS LCMS-8060 를 사용하여 분석을 진행했다. Gradient Elution 프로그램을 이용한 빠른 분리를 위해 Shimadzu GLC Mastro™ PFP 컬럼 (100 mm x 2.1 mm, 3 µm)을 사용하였다. 분석법 개발 및 검증은 서로 다른 식품 매질 5종에 곰팡이독소를 첨가하여 수행하였다. 표 1에 LCMS-8060의 분석 조건을 나타내었다.

표 1. LC-MS/MS 분석조건

Column	Mastro PFP(100 mm x 2.1 mm; 3 µm)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Mobile phase	: A) 0.15 mM Ammonium fluoride in water : B) 0.15 mM Ammonium fluoride in methanol with 2% acetic acid
Oven Temp.	: 40 °C
Injection vol.	: 10 µL
Elution mode	Gradient Elution : B %: 15% (0.0 to 1.0 min) - 25% (1.0 min) - 40% (2.0 min) - 41% (4.5 min) - 100% (7.5 to 10.0 min) - 15% (10.1 to 12.5 min)
Interface	: ESI
MS Mode	: MRM, Positive & Negative
Block Temp.	: 400 °C
DL Temp.	: 250 °C
Interface Temp.	: 300 °C
CID gas	: Ar (270 kPa)
Nebulizing Gas Flow	: Nitrogen, 3.0 L/min
Drying Gas Flow	: Nitrogen, 10 L/min
Heating Gas Flow	: Zero air, 10 L/min

■ 결과 및 토의

분석법 개발

자동화된 MRM 최적화는 LabSolutions 워크스테이션을 사용하여 수행되었다. 각 화합물에 대해 2개의 MRM transition을 얻었다(표 2 참고). 서로 다른 식품 매질 5종 (쌀, 보리, 밀가루, 캐슈 및 옥수수)에 화합물을 첨가하여 검정곡선을 준비하는데 사용하였다. 보리 매질에 첨가된 18종 곰팡이독소의 MRM 크로마토그램을 그림 2에 나타내었다.

분석법 검증

각 검정물질은 세 번 주입되었고 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위해 면적의 평균값을 사용하여 검정곡선을 작성하였다. 농산물 매질에서 18개 곰팡이독소 전성분 0.01 - 500 ng/mL 농도 범위에서 r^2 0.998 이상으로 우수한 선형성을 보였다. 5종 매질에서 18종 곰팡이독소의 LOD와 LOQ가 결정되었다.

또한 5종 매질에 대해 서로 다른 농도(NIV, DON, FUS-X, NEO, 15-AcDON 및 3-AcDON 2.5ng/mL; AFB1 및 AFG1 0.5 ng/mL; AFB2 및 AFG2 0.15 ng/mL; DAS, FB1, FB2, FB3, HT-2, T-2, OA 및 ZON 25 ng/mL)의 곰팡이독소를 첨가하여 반복성 (n=6)을 평가하였다. 이 때 %RSD의 범위는 0.84~12.25%로 나타났다. LOQ, LOD 및 %RSD 결과는 표 3에 나타내었다.

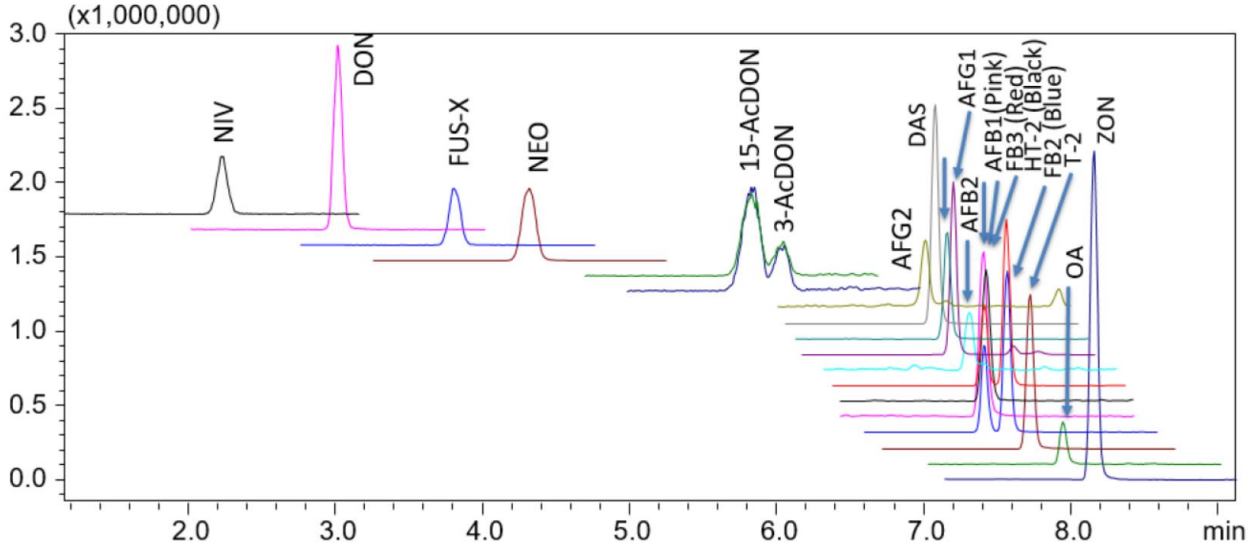


그림 2. 보리 매질에 첨가된 18종 곰팡이독소의 크로마토그램 (NIV, DON, FUS-X, NEO, 15-AcDON, 3-AcDON, 2.5 ng/mL, AFB1 및 AFG1, 0.5 ng/mL, AFB2 및 AFG2 0.15 ng/mL, DAS, FB1, FB2, FB3, HT-2, T-2, OA 및 ZON 25 ng/mL)

표 2. 18종 곰팡이독소의 MRM

Compound	Retention Time (min)	Parent Ion	MRM 1	MRM 2
NIV	2.2	[M-CH ₃ COO] ⁻	371.1 > 281.2	371.1 > 311.2
DON	3.0	[M+H] ⁺	297.2 > 249.2	297.2 > 279.2
FUS-X	3.8	[M+H] ⁺	355.2 > 247.2	355.2 > 277.2
NEO	4.3	[M+NH ₄] ⁺	400.2 > 305.2	400.2 > 215.2
15-AcDON	5.8	[M+H] ⁺	339.3 > 261.2	339.3 > 297.2
3-AcDON	6.0	[M+H] ⁺	339.2 > 261.2	339.2 > 297.2
AFG2	7.0	[M+H] ⁺	331.2 > 245.1	331.2 > 285.1
DAS	7.1	[M+NH ₄] ⁺	384.2 > 307.2	384.2 > 229.2
AFG1	7.2	[M+H] ⁺	329.1 > 243.1	329.1 > 200.1
FB1	7.2	[M+H] ⁺	722.4 > 352.4	722.4 > 334.3
AFB2	7.3	[M+H] ⁺	315.2 > 287.1	315.2 > 259.1
AFB1	7.4	[M+H] ⁺	313.1 > 285.1	313.1 > 241.1
FB3	7.4	[M+H] ⁺	706.4 > 318.3	706.40 > 354.4
HT-2	7.4	[M+Na] ⁺	447.3 > 345.2	447.3 > 285.1
FB2	7.6	[M+H] ⁺	706.4 > 318.3	706.4 > 354.4
T-2	7.7	[M+NH ₄] ⁺	484.30 > 215.2	484.3 > 185.1
OA	7.9	[M+H] ⁺	404.2 > 221.0	404.2 > 239.1
ZON	8.2	[M-H] ⁻	317.1 > 175.1	317.1 > 131.2

표 3. 매질에 첨가된 서로 다른 농도의 18종 곰팡이독소 LOQ, LOD (모두 ng/mL) 및 %RSD(n=6) (NIV, DON, FUS-X, NEO, 15-AcDON, 3-AcDON, 2.5ng/mL, AFB1 및 AFG1, 0.5ng/mL, AFB2 및 AFG2 0.15ng/mL, DAS, FB1, FB2, FB3,HT-2,T-2, OA 및 ZON 25ng/mL)

Compound	Barley			Rice			Corn			Wheat Flour			Cashew		
	LOQ	LOD	%RSD	LOQ	LOD	%RSD	LOQ	LOD	%RSD	LOQ	LOD	%RSD	LOQ	LOD	%RSD
NIV	0.15	0.05	2.61	0.22	0.07	2.99	2.50	0.8	7.31	0.50	0.17	1.43	0.50	0.17	6.52
DON	0.25	0.08	1.64	0.05	0.02	3.69	0.50	0.17	6.18	0.25	0.08	3.74	2.50	0.8	0.84
FUS-X	0.06	0.02	2.43	0.10	0.03	2.38	0.09	0.03	7.49	0.25	0.08	1.66	1.57	0.52	5.96
NEO	0.01	<0.01	0.84	0.03	0.01	2.44	0.01	<0.01	7.46	0.01	<0.01	0.94	0.01	<0.01	5.43
15-AcDON	0.50	0.17	3.66	0.25	0.08	1.89	0.51	0.17	3.77	0.24	0.08	1.87	0.99	0.33	4.71
3-AcDON	0.44	0.15	3.25	0.50	0.17	1.29	0.63	0.21	3.56	0.27	0.09	3.74	2.50	0.80	3.09
AFG2	0.15	0.05	3.01	0.02	0.01	3.73	0.08	0.02	8.43	0.03	0.01	7.97	0.10	0.03	2.94
DAS	0.10	0.03	5.17	0.05	0.02	3.04	0.10	0.03	8.65	0.05	0.02	3.43	0.04	0.02	10.35
AFG1	0.01	<0.01	3.80	0.01	<0.01	2.40	0.04	0.01	5.27	0.01	<0.01	11.61	0.02	0.01	2.59
FB1	0.24	0.08	6.42	0.35	0.11	3.45	0.20	0.06	2.76	0.26	0.09	3.28	0.50	0.17	4.97
AFB2	0.03	0.01	5.77	0.01	<0.01	4.49	0.03	0.01	8.33	0.03	0.01	4.98	0.03	0.01	11.85
AFB1	0.01	<0.01	6.60	0.01	<0.01	3.85	0.02	0.07	5.31	0.02	0.01	12.25	0.03	0.01	7.37
HT-2	1.00	0.33	1.05	0.04	0.01	3.02	2.13	0.70	3.76	4.85	1.60	1.94	2.50	0.80	1.92
FB3	0.50	0.17	3.25	0.50	0.17	5.87	0.27	0.09	5.37	0.50	0.17	6.12	0.50	0.17	5.96
FB2	0.50	0.17	4.50	0.50	0.17	7.99	0.85	0.28	6.13	0.08	0.03	4.04	0.50	0.17	7.02
T-2	0.29	0.09	3.24	0.03	0.01	2.27	0.20	0.06	8.66	0.05	0.02	2.15	0.45	0.15	7.1
OA	0.05	0.02	6.79	0.08	0.03	2.43	0.31	0.10	10.12	0.05	0.02	11.65	0.05	0.02	3.41
ZON	0.10	0.03	3.25	0.05	0.02	4.26	0.22	0.07	8.27	0.10	0.03	2.66	0.10	0.03	3.09

회수율

회수율 평가는 5종 매질에 서로 다른 농도의 18종 곰팡이독소를 첨가하여 수행하였다 (NIV, DON, FUS-X, NEO, 15-AcDON, 3-AcDON 및 HT-2 200 ng/g; AFB1, AFG1 및 OA 5 ng/g; AFB2 및 AFG2는 1.5 ng/g, FB1, FB2 및 FB3은 100 ng/g, DAS, T-2 및 ZON은 20 ng/g). 곰팡이독소를 첨가한 각 시료를 3회 주입하여 얻은 피크 면적의 평균값으로 회수율 결과를 계산하였다. 표 5에 나타난 NIV(보리 59.7%, 밀가루 48.4%)와 OA(254.6-312.7%)를 제외하고는 65.9-143.0%의 우수한 회수율을 보였다.

실제 샘플 분석

지역 시장에서 10개의 실제 샘플을 얻어 확립된 분석법으로 샘플을 평가하였다.

총 10개의 샘플 중 2개의 샘플 (보리 J1과 옥수수 G9) 에서 곰팡이독소가 검출되었다. 정량 분석은 표 4에 정리하였다. 2개 시료의 MRM 크로마토그램은 그림 3에 나타내었다.

표 4. 실제 샘플의 정량결과

Compound	Concentration (ng/g)	
	Barley J1	Corn G9
FB1	46.4	178.0
FB2	44.6	85.0
FB3	-	17.4
AFB1	0.2	-
ZON	36.0	-

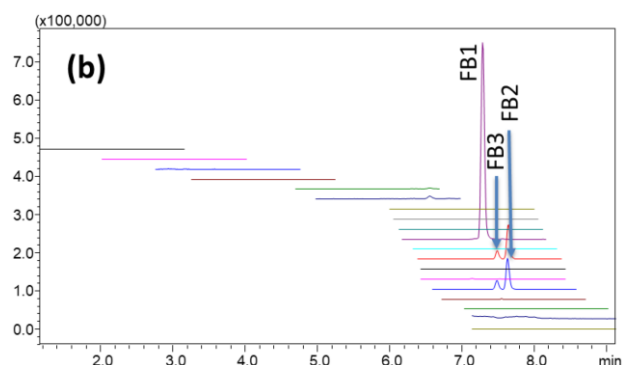
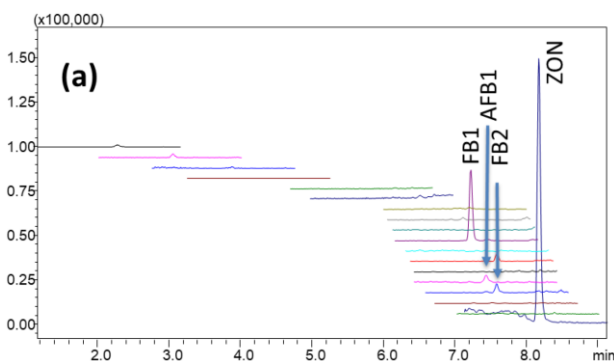


그림 3. 실제 샘플의 크로마토그램: (a) 보리 J1 (b) 옥수수 G9

표 5. 5종 농산물 중 18종 곰팡이독소의 회수율 결과

No	Compound	Recovery (%)				
		Barley	Rice	Corn	Wheat Flour	Cashew
1	NIV	59.7	71.2	70.3	48.4	66.6
2	DON	83.5	107.6	102.2	77.6	88.8
3	FUS-X	88.4	105.6	105.4	83.3	96.0
4	NEO	95.4	114.7	113.2	90.7	100.6
5	15-AcDON	86.2	117.7	103.5	86.1	88.9
6	3-AcDON	94.8	111.8	106.7	87.4	92.6
7	AFG2	75.7	70.2	80.8	70.1	82.0
8	DAS	67.1	78.6	102.6	77.0	92.0
9	AFG1	82.8	73.2	76.8	67.6	97.6
10	FB1	104.6	109.0	68.0	143.0	117.9
11	AFB2	84.9	78.3	80.3	71.2	70.0
12	AFB1	81.4	74.0	77.3	65.9	84.3
13	HT-2	101.5	114.5	101.3	93.7	112.7
14	FB3	93.7	111.1	86.7	125.2	90.9
15	FB2	100.7	84.0	88.9	125.5	77.2
16	T-2	82.7	97.7	118.9	85.9	109.0
17	OA	254.6	282.5	312.7	307.8	279.1
18	ZON	84.6	93.9	108.7	88.2	61.0

■ 결론

유럽연합 EC 1881/2006에 따라 규제되는 18종의 곰팡이독소에 대해 고체상 추출(SPE) 전처리와 결합된 LC-MS/MS 분석법이 확립되었다. 5종의 서로 다른 농산물 매질에 첨가된 곰팡이독소에서 우수한 회수율을 얻었다. 0.01 - 500 ng/mL의 농도 범위에서 r²가 0.998 이상의 우수한 선형성을 보였으며 다양한 매질에서 18종 곰팡이독소의 LOQ, LOD 및 반복성을 정리하였다.

■ 참고문헌

- [1] COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs(2006)OJL364/5;<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN>
- [2] D. Baker, C. Titman, N. Loftus and J. Horner, Multi-residue analysis of 18 regulated mycotoxins by LC-MS/MS; ASMS 2017, Poster Session TP 185

