

LC-MS/MS를 이용한 곡류가공품의 제랄레논 분석과 측정불확도 추정

최은정* · 강성태¹ · 정소영 · 신재민 · 장민수 · 이상미 · 김정현 · 채영주
서울시보건환경연구원, ¹서울과학기술대학교 식품공학과

Analysis and Uncertainty Estimation of Zearalenone in Cereal-Based Products by LC-MS/MS

Eun Jung Choi*, Sung Tae Kang¹, So Young Jung, Jae Min Shin, Min Su Jang, Sang Me Lee,
Jung Hun Kim, and Young Zoo Chae

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

Abstract A survey of zearalenone contamination was conducted on cereal-based products by using an immunoaffinity column with LC-MS/MS. The calibration curve showed good linearity, with correlation coefficients (R^2) of 0.999 in the concentration range from 1 to 250 ng/mL. The limits of detection and quantification were approximately 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The recoveries in the barley tea, *Misutgaru* and snack ranged from 73.6-107.8%. Zearalenone was detected in 10 samples (11.2% incidence). The highest zearalenone contamination level was 29.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the *Misutgaru*. This survey was conducted with uncertainty of measurement. The expanded uncertainty for zearalenone was estimated to be 44.9 \pm 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$, 95% confidence level) and 128.7 \pm 7.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$, 95% confidence level) for barley tea, 30.7 \pm 5.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$, 95% confidence level) and 173.7 \pm 14.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2.26$, 95% confidence level) for *Misutgaru*, and 37.2 \pm 7.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2.31$, 95% confidence level) and 151.0 \pm 10.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$, 95% confidence level) snack at the level of 41.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 166.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

Keywords: zearalenone, LC-MS/MS, immunoaffinity column, uncertainty

서 론

제랄레논(Zearalenone)은 *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* 등의 곰팡이에 의해 생성 되는 *Fusarium*속 곰팡이 독소로서, 옥수수, 보리, 밀과 같은 농산물 중 탄수화물 함량이 높은 작물에서 주로 발생된다(1). Resorcylic acid lactone으로서 화학적으로 6-(10-hydroxy-6-oxo-trance-1-undecenyl)- β -resorcylic acid lactone으로 표시 할 수 있다. 물에는 용해되지 않고 알칼리, 유기용매에 녹으며, 산성, 중성 용액에서는 가수 분해되지 않아 안정하다(2). 또한 제랄레논은 열에 안정해서 저장, 가공, 조리 시에도 파괴되지 않는데, 120°C에서 안정하고 150°C에서는 29%가 분해되며, 200°C에서 60분간 가열시 69%가 분해된다(3).

비스테로이드성 에스트로겐으로 알려진 제랄레논은 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 인체발암성이 없는 물질(Group 3)로 분류하고 있지만, 유산, 불임 등 생식에 관련된 독성을 유발하며, 내분비계 장애물질로서 호르몬계 이상을 초래한다(3).

제랄레논은 농작물의 재배 중에 오염되며, 수확, 저장, 유통 중에도 오염 될 수 있고(4), 곡류를 주식으로 하는 우리나라는 최근 곡류 수입이 증가하고 있어서 제랄레논에 노출될 위험성이 있을 것으로 예상된다. 또한 지구온난화로 인한 온도상승으로 곰팡이독소의 생성 가능성이 높아져서 이에 따른 넓은 범위의 안전관리가 필요하다. 따라서 곡류 및 곡류가공품에 관한 제랄레논 연구가 활발히 보고되고 있으며, 분석법 중 정제는 immunoaffinity column(IAC)을 이용한 방법(2)이 사용되고 있다. 이 컬럼은 monoclonal antibody가 부착된 sepharose가 충전 된 것으로 완충액이 채워져 있으며, 항체와 항원의 흡착친화성을 이용한다(5). 한번의 정제로 시료의 방해물질을 효과적으로 제거 할 수 있고, 높은 선택성과 낮은 검출한계, 넓은 범위의 다른 물리화학적 성질들의 분자들을 분리 할 수 있는 장점이 있다(6,7).

기 분석법은 thin layer chromatography(TLC), enzyme linked immuno sorbent assay(ELISA), gas chromatography electron capture (GC-ECD), gas chromatography mass spectrometer(GC-MS), liquid chromatography florescence(LC-FLD), liquid chromatography mass spectrometer(LC-MS)를 사용하는 방법이 알려져 있고(8,9) 최근에는 LC-MS/MS를 이용한 연구들도 진행되고 있다(10). LC-MS/MS 분석법은 같은 머무름시간을 가지더라도 product ion이 상이하면 multiple reaction monitoring(MRM)에 의해 선택성을 보완할 수 있고, 한번에 정성까지 확인 할 수 있다. 또한 MRM은 신속하고 높은 감도로 저농도의 제랄레논을 정량 분석할 수 있는 장점이 있다.

우리나라에서의 제랄레논 기준은 곡류 및 그것을 단순처리한

*Corresponding author: Eun-Jung Choi, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon, Gyeonggi 427-070, Korea
Tel: 82-2-570-3446
Fax: 82-2-570-3248
E-mail: planet25@seoul.go.kr
Received June 21, 2012; revised October 11, 2012;
accepted October 15, 2012

것(분쇄, 절단 등) 200 µg/kg 이하, 과자 50 µg/kg 이하로 설정하고 있으며, 2011년 식품 유해물질로서 곰팡이독소에 대한 기타영양유아식 기준(제랄레논 20 µg/kg)을 신설하였고, 2012년 시리얼류 50 µg/kg 신설하여 안전관리를 강화하고 있다.

식품 중 제랄레논의 잔류실태 모니터링은 LC-FLD를 이용한 곡류가공품을 중심으로 보고되고 있으며, 독일에서 Schollenberger 등(11)이 곡류가공품 84건 중 32건에서 2-67 µg/kg 보고 하였고, 국내에서는 Jang 등(12)이 432건 중 38건에서 5.38-53.76 µg/kg 수준으로 검출된다고 보고 하였다. LC-MS/MS를 이용한 분석 결과는 Jinap 등(13)이 밀 20건 중 6건에서 1.42-12.74 ng/g, 보리 10건 중 3건에서 0.95-20.26 ng/g 수준이었다. 우리나라의 경우 LC-MS/MS의 분석은 오염된 시료의 정성확인에 제한적으로 이루어진 보고가 있다(12).

식품 중 ppb 수준으로 미량 존재하는 제랄레논은 분석시 오차로 인하여 결과값에 영향을 줄 수 있다. 따라서 결과값의 불확실한 정도, 분석결과가 참값에 얼마나 근접하는지에 따른 의심과 타당성으로 정의되는 측정 불확도를 추정하므로써, 분석결과에 신뢰성을 확보할 수 있다(14-16).

이에 본 연구에서는 LC-FLD보다 높은 감도와 선택성의 LC-MS/MS를 이용해 식품 중 제랄레논을 immunoaffinity column으로 정제 후 분석하였다. 이를 토대로 서울시내 유통되고 있는 곡류가공품 중 옥수수가공품, 과자류, 칩출차 및 기타영양유아식품 등의 오염실태를 조사하여 식품에 대한 안전성을 확보하고 제랄레논에 관한 기초 자료로 활용하고자 한다.

또한 제랄레논 분석 과정 중 불확도 요인으로 시료전처리, 표준용액, 기기분석, 반복성, 재현성, 검량선작성등을 추정하여 분석결과에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료

2011년 서울지역에서 유통되고 있는 곡류가공품 중 옥수수가공품, 과자류, 칩출차, 기타영양유아식, 찹쌀가루 및 기타곡류가공품을 총 89건을 구입하여 제랄레논 분석에 사용하였다. 모든 시

료는 포장단위로 균질화 하여 -20°C 냉동 보관하였다.

시약 및 장비

제랄레논 표준품은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 추출 및 분석에 사용된 acetonitrile, methanol은 Fisher Scientific(Basingstoke, UK)제품을 사용하였고, sodium chloride(Merck Co., Darmstadt, Germany), Tween 20(Junsei, Tokyo, Japan) 등 분석에 사용된 모든 시약 및 용매는 특급 및 그 이상의 수준으로 구입하여 사용하였다. 여과지는 Toyo Roshi Kaisha. Ltd.(Tokyo, Japan)제품을 사용하였고, nylon syringe filter는 Chemco Scientific(Osaka, Japan)사 제품을 사용하였다. 정제용 immunoaffinity column은 zearala test(Vicam, MA, USA)를 이용하였다.

분석장비는 Agilent 1200 series LC(Foster City, CA, USA)가 부착된 Applied Biosystems(Foster City, CA, USA)의 Q TRAP 3200 질량분석기를 사용하였고, 분석에 사용한 컬럼은 Luna C₁₈(150×3 mm, 3 µ, Phenomenex, CA, USA)이었으며, 시료분쇄기(Blixer, MS, USA), 균질기(Omni International, GA, USA), vacuum system(Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan) 등으로 시료를 전처리하였다.

LC-MS/MS 분석

LC-MS/MS(Applied Biosystems)를 사용한 제랄레논의 분석조건은 Table 1의 기기분석 조건으로 컬럼은 Luna C₁₈을 사용하였으며, 유속은 0.5 mL/min이었다. Ionization mode는 ESI positive mode를 사용하였고, precursor ion은 319 m/z, product ion은 187, 283 m/z이었다.

표준용액 조제

제랄레논 표준품 25 mg을 acetonitrile 10 mL에 녹여 농도를 2,500 µg/mL로 하고, 최종 농도가 1, 10, 50, 100, 250 ng/mL가 되도록 75% acetonitrile로 희석하여 검량선용 표준용액으로 사용하였다.

Table 1. LC-MS/MS conditions for analysis of zearalenone

Instrument	Parameter	Condition
Liquid chromatography (Agilent 1200)	Column	Luna C ₁₈ (150×3 mm, 3 µ, Phenomenex)
	Mobile phase	Solvent A (20) : 0.1% formic acid in distilled water Solvent B (80) : 0.1% formic acid in acetonitrile
	Flow rate (mL/min)	0.5
	Injection volume (µL)	5
	MS/MS (Applied Biosystem)	Ionization mode
	Cutain gas	10.0
	Collision gas	Medium
	Ion spray voltage	5500.0
	Ion source gas 1.2	16.0, 0.0
MRM mode	Precursor ion (m/z)	319
	Product ion (m/z)	319>283 (Quantification)
	Product ion (m/z)	319>187 (Confirmation)
	Dwell time (s)	0.1
	Declustering potential	56.0
	Entrance potential	3.8
	Collision energy	16.0
	Collision cell exit potential	3.0

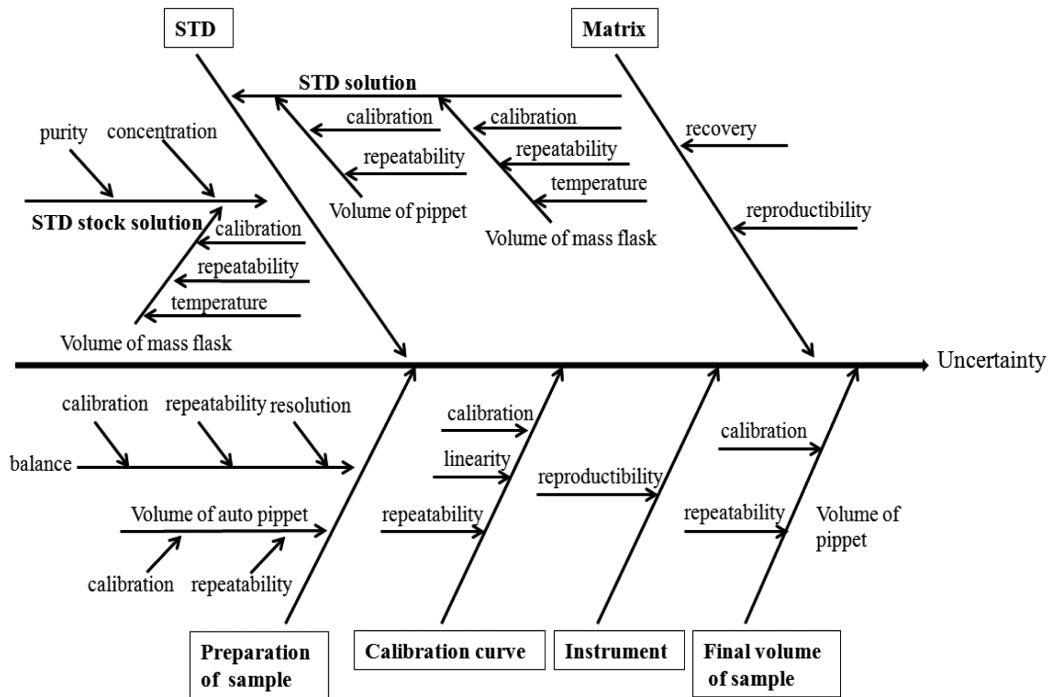


Fig. 1. Fish bone diagram of uncertainty sources in zearalenone analysis.

시료의 전처리

제랄레논을 추출하기 위하여 균질화한 시료 25 g과 sodium chloride 2 g, Tween 20 1 mL에 75% acetonitrile 추출용액 100 mL를 가하였다. 건조한 시료의 경우 유기용매를 넣으면 추출 시 섞이지 않고 분리되는 현상이 발생하여 추출이 잘 되지 않아 증류수 20 mL 첨가하여 5분간 침치 후 균질기 5000 rpm에서 5분간 추출하였다. 추출액을 여과지로 여과한 후 여과액 10 mL를 50 mL conical tube에 넣고 증류수 40 mL를 넣어 희석하였다. 정제는 immunoaffinity column에 유속은 초당 1-2방울을 초과하지 않도록 통과시켰다. 컬럼을 증류수 20 mL로 세척한 후 5 mL methanol로 제랄레논을 용출시킨 다음 용출액을 질소가스로 농축시켰다. 이를 이동상에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

불확도 추정방법

곡류가공품의 제랄레논 함량을 구하기 위한 식은 GUM(Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)(14)과 EURACHEM/CITAC Guide(17)에 근거하여 (1)과 같이 설정하였다. 각각의 불확도 요인들로부터 불확도를 추정하였으며 전체적인 불확도요인과 세부내용은 Fig. 1에 나타내었다.

$$C_s = C_e \times \frac{V_f}{W_s} \times D \tag{1}$$

- C_s : Concentration of sample (µg/kg)
- C_e : Concentration of sample in extraction solution (µg/kg)
- V_f : Final volume of sample (mL)
- W_s : Weight of sample (g)
- D : Dilution factor

불확도 요인 및 산출방법

반복 측정한 평균값을 측정값으로 사용한 경우, 평균값을 표준

불확도를 적용하여 A type 표준불확도 식(2)로 평가하였다. 반복 시험에 대한 불확도는 합동(pooled)표준편차 방법에 따라 식(3)과 (4)를 적용하여 A type 불확도를 구하였으며, 플라스크, 피펫, 저울 등의 고정성적서상의 결과를 사용하는 경우와 반복 측정하지 않는 경우는 B type 표준불확도로 평가하였다. 자유도는 KOLAS에서 발간한 측정 결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침에 따라 구하였다(18). 즉, 반복 측정시 자유도는 n-1로 계산하였고, 최소제공방법에 의하여 직선의 절편과 기울기를 결정하기 위해 n 개의 독립적인 관측값이 사용된 경우에는 절편 또는 기울기에 대한 표준불확도의 자유도를 n-2로 계산하였다.

합성표준불확도는 측정결과가 여러개의 다른 입력량으로부터 구해질 때 이 측정결과와 표준불확도이며, 합성은 불확도 전파의 법칙(law of propagation of uncertainty) 식(5)를 이용하여 구하였다.

확장불확도는 포함인자 k와 계산된 합성표준불확도를 곱하여 식(8)을 이용해 구하였다. 포함인자 k는 측정결과와 불확도 산정 및 표현을 위한 지침(14) 및 EURACHEM/CITAC Guide(17)의 방법에 따라 측정의 자유도가 식(6,7)을 이용해 계산하였을때 10 보다 클 경우 95% 신뢰수준에서 k의 값은 2를 채택하였으며, 그 이하일 경우는 t-분포표를 이용하였다

$$u(x_i) = \frac{S}{\sqrt{n}} \tag{2}$$

$$u(x_i) = \frac{S_p}{\sqrt{n}} \tag{3}$$

$$S_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n U_i S_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n U_i}} \tag{4}$$

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) \quad (5)$$

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (6)$$

$$v_{eff} \leq \sum_{i=1}^n v_i \quad (7)$$

$$U(y) = k u_c(y) \quad (8)$$

n : Number of measurements

S_p : Pooled standard deviation

U : Expanded uncertainty

k : Coverage factor

결과 및 고찰

회수율

제랄레논이 검출되지 않은 시료 중 보리차, 미숫가루, 과자에 최종농도가 각각 41.7, 166.7 µg/kg이 되도록 제랄레논 표준용액을 첨가하여 위와 동일하게 3회 반복 실험하였다.

제랄레논 최종농도가 41.7, 166.7 µg/kg인 각 시료에 대한 회수율을 검토한 결과 보리차는 각각 107.8, 77.2%, 미숫가루는 73.6, 104.2%, 과자는 89.1, 90.6%로 나타났다. 분석법의 정밀도 지표로 나타내는 RSD값은 각각 보리차 3.9, 1.5%, 미숫가루 10.4, 6.7% 과자는 12.8, 4.3%를 나타내었다(Table 2).

제랄레논의 회수율은 유럽연합(19)에서 제시한 범위인 60-120%에 포함되는 좋은 결과를 얻었고, 상대표준편차는 Jinap(13)의 곡류에서의 10.9-14.2%보다 낮아 높은 정밀도를 보여주었다.

검량선, 검출한계 및 정량한계

제랄레논의 표준용액을 1, 10, 50, 100, 250 ng/mL 농도로 조제하여 product ion 283 m/z을 정량이온으로 검량선을 구한 결과 상관관계수(r^2)는 0.9999로 양호한 직선성을 나타내었다. 검출한계(limit of detection)는 3.3 σ (표준편차)/S(검량선의기울기), 정량한계(limit of quantification) 10 σ /S로 구한 결과 각각 0.3, 1.0 µg/kg이었다.

본 연구에서 구한 검출한계는 Lindner 등(10)의 검출한계 0.5 µg/kg 보다 낮은 수준이었으며, 기존 연구에서 보고된 LC-FLD의 검출한계 Moren-Bondi 등(20) 6 µg/kg, Mateo 등(21)의 4 µg/kg보다 10배 이상의 낮은 검출한계를 보였다. 또한 유럽연합(19)의 검출한계(1-5 µg/kg 이하)와 정량한계(5-20 µg/kg 이하) 범위 보다 낮아 우수한 감도를 나타내었다.

시료 중 제랄레논 오염도조사

시중에 유통되고 있는 곡류가공품 중 옥수수가공품, 과자류, 침출차, 기타영유아식, 참쌀가루 및 기타곡류가공품 등 총 89건을 대형마트에서 구입하여 제랄레논의 오염도를 조사하였다. 그 결과는 Table 3과 같다.

총 시료 89건 중 10건 검출되어 11.2%의 검출율을 보였고 과자류에서는 21건 중 1건에서 2.3 µg/kg, 옥수수가공품 9건 중 2건에서 1.2-7.7 µg/kg, 기타곡류가공품 14건 중 선식에서 1건 3.4 µg/

Table 2. Recoveries (n=3) of zearalenone from cereal-based products spiked with standard solution at the level of 41.7 and 166.7 µg/kg, respectively

Measured level (µg/kg)	Mean (%)±RSD (%)		
	Barley tea	Misutgaru	Snack
41.7	107.8±3.9	73.6±10.4	89.1±12.8
166.7	77.2±1.5	104.2±6.7	90.6±4.3

Table 3. Incidences and levels of zearalenone in various cereal-based products by LC-MS/MS

Type of food	Samples analysed	Incidence		Range of zearalenone levels (µg/kg)
		No.	%	
Misutgaru	19	6	31.6	1.1-29.7
Snack	21	1	4.8	2.2
Malt	13	0	-	N.D ¹⁾
Corn-based food	9	2	22.2	1.6-8.5
Barley tea	7	0	-	N.D
Baby and infant food	6	0	-	N.D
Other products	14	1	7.1	3.4
Total	89	10	11.2	1.1-29.7

¹⁾N.D: Not detected

kg이 검출되었다. 미숫가루와 같은 혼합 곡류가공품은 19건 중 6건에서 1.1-29.7 µg/kg 농도로 검출되어 가장 높은 검출율(31.6%)을 나타내었다. LC-MS/MS 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었으며 검출된 시료는 product ion 187 m/z을 정성 확인 하였다.

최근 연구된 Jang 등(12)의 결과에 의하면 선식에서 5.38-42.72 µg/kg 범위로 66.7%의 높은 검출율을 나타내었으며, 이는 다양한 원료를 섞어 분말화한 제품의 특성에 의하여 개별원료의 품질관리에서 기인하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서도 다양한 곡물을 볶아서 분말화한 제품인 미숫가루에서 57.9%의 가장 높은 검출율과 검출농도를 나타낸 것과도 일치하는 결과라 할 수 있을 것이다.

여러 가지 곡물 등을 열처리하여 분말화하는 선식이나 미숫가루의 경우 각각의 개별재료가 제품의 품질에 미치는 영향이 미비한 것으로 간과하기 쉬우나, 제랄레논은 비스테로이드성 에스트로겐으로 내분비계 교란물질로 알려져 있어 저농도의 반복적인 노출에 위험성을 고려할 때, 개별재료에 대한 적극적인 안전관리가 필요할 것으로 생각된다.

또한 본 연구에서 기타영유아식은 제랄레논이 검출되지 않았으나, Soler 등(22)의 연구결과에 의하면 10-15 µg/kg의 농도로 35건 중 2건이 검출되었다고 보고하였다.

여러 가지 곡물 들을 원료로 하는 국내산 및 수입산의 다양한 영유아용 곡류조제식 제품이 유통되고 있어, 선택성과 높은 감도를 가지는 LC-MS/MS 방법 등을 이용한 지속적인 품질검사가 이루어져야 할 것이다.

시료전처리에 대한 불확도

시료전처리에 대한 불확도는 저울과 100 mL dispenser가 포함되었다. 저울은 저울에 대한 교정성적서상의 불확도, 저울 안정성 그리고 분해능이 불확도 요인으로 고려되었으며, 100 mL dispenser는 교정성적서상의 불확도와 부피 측정이 고려되었다. 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준에서 0.0004 g의 불확도를 가지고 있으므로 표준불확도는 0.0002이 된다. 저울

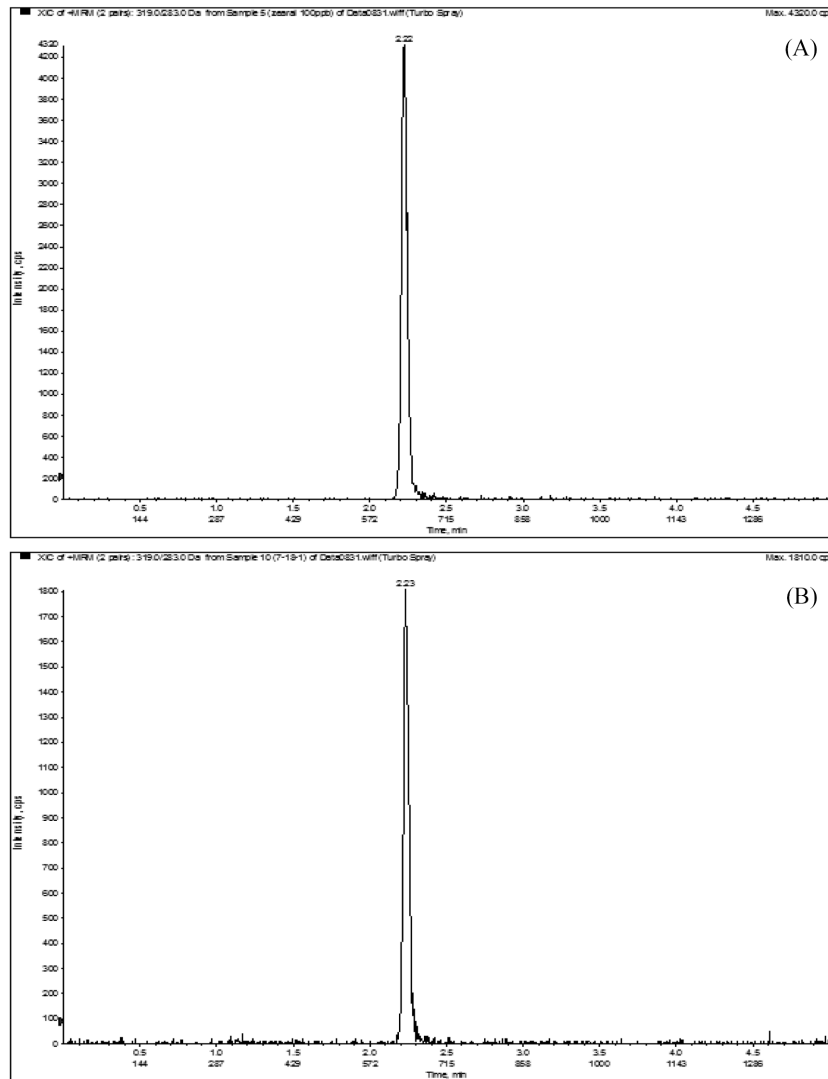


Fig. 2. LC-MS/MS chromatograms of zearalenone standard at 100 µg/kg (A) and *Misutgaru* sample contaminated with zearalenone 29.7 µg/kg (B).

안정성은 분동 25 g을 이용하여 10회 반복 측정 한 값의 표준편차 0.00326 g을 표준불확도로 구하였으며, 저울의 분해능은 0.0001 g이며, 분해능에 대한 표준불확도는 0.000029이었다. 저울의 합성 표준불확도는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00327이며, 상대표준불확도는 0.00013이다. 100 mL dispenser의 교정성적서상의 불확도는 0.5 mL이고 표준불확도는 0.25이다. 10회 반복 부피 측정의 표준편차는 0.00943 mL이고, 합성표준불확도는 0.25018이다. 따라서 상대표준불확도는 0.0025이 된다. 시료전처리에 대한 상대합성불확도는 0.00251이 된다.

표준용액 불확도

표준용액의 불확도는 보관표준용액과 각각의 희석된 농도의 불확도를 이용하여 구하였다(Table 4). 보관표준용액은 제랄레논 표준품 25 mg을 acetonitrile 10 mL에 녹여 2,500 µg/mL로 제조하였다.

각각의 단계에서 사용된 메스플라스크와 피펫의 불확도를 계산하여 불확도 요인으로 고려하였다. 메스플라스크의 불확도는 플라스크에 표시된 교정성적서상에 대한 불확도, 시험원의 눈금 읽기에 대한 측정반복성에 대한 불확도, 온도 변화에 따른 물의

변화에 대한 불확도를 요인으로 고려해 계산하여 상대표준불확도를 구하였으며, 피펫은 피펫에 표시된 교정성적서상에 대한 불확도와 시험원의 눈금 읽기에 대한 측정반복성에 대한 불확도를 요인으로 상대표준불확도를 구하였다.

보관표준용액 조제과정의 불확도는 표준품의 순도, 용액제조에 사용되는 플라스크의 요인이 포함된다. 따라서 표준품의 농도별 상대합성불확도는 보관표준용액(2,500 µg/mL)은 0.00609, 50 µg/mL는 0.00662, 2.5 µg/mL는 0.00688, 250 ng/mL는 0.00815, 100 ng/mL는, 0.00874, 50 ng/mL는 0.00910, 10 ng/mL는 0.00960, 1 ng/mL는 0.01055 이었다.

기기측정시 불확도

LC-MS/MS를 이용하여 시료를 6회 반복 측정해 검출된 peak의 area의 값을 산출하였다. 반복 측정 한 평균값은 317.83이며, 상대표준편차가 0.08%이다. 표준불확도는 표준편차를 $\sqrt{6}$ 으로 나누어 준 값 0.03302이므로, 상대표준불확도는 0.0001이 된다.

회수율의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상

Table 4. Uncertainty value for the determination of STD solution

Factors	Description	Uncertainty
Stock solution (2500 µg/mL)	U_r stock solution	0.00609
	$=\sqrt{(U_r \text{ purity})^2 + U_r \text{ f10mL}^2}$	
Working solution (50 µg/mL)	U_r 50 µg/mL	0.00662
	$=\sqrt{(U_r \text{ stock})^2 + U_r \text{ f100mL}^2 + U_r \text{ p2mL}^2}$	
Working solution (2.5 µg/mL)	U_r 2.5 µg/mL	0.00688
	$=\sqrt{(U_r \text{ 50µg/mL})^2 + U_r \text{ f100mL}^2 + U_r \text{ p5mL}^2}$	
STD 5 (250 ng/mL)	U_r 250 ng/mL	0.00815
	$=\sqrt{(U_r \text{ 2.5µg/mL})^2 + U_r \text{ f10mL}^2 + U_r \text{ p1mL}^2}$	
STD 4 (100 ng/mL)	U_r 100 ng/mL	0.00874
	$=\sqrt{(U_r \text{ 250ng/mL})^2 + U_r \text{ f10mL}^2 + U_r \text{ p4mL}^2}$	
STD 3 (50 ng/mL)	U_r 50 ng/mL	0.00910
	$=\sqrt{(U_r \text{ 100ng/mL})^2 + U_r \text{ f10mL}^2 + U_r \text{ p5mL}^2}$	
STD 2 (10 ng/mL)	U_r 10 ng/mL	0.00960
	$=\sqrt{(U_r \text{ 50ng/mL})^2 + U_r \text{ f10mL}^2 + U_r \text{ p2mL}^2}$	
STD 1 (1 ng/mL)	U_r 1 ng/mL	0.01055
	$=\sqrt{(U_r \text{ 10ng/mL})^2 + U_r \text{ f10mL}^2 + U_r \text{ p1mL}^2}$	

대표준불확도를 합성하여 구하였다. 표준불확도는 식(2)에 의하여 계산하였으며, 41.7, 166.7 µg/kg의 상대표준불확도는 보리차 0.01477과 0.00798, 미숫가루는 0.05783과 0.02621, 과자는 0.05897과 0.01950이었다.

검량선 작성의 불확도

검량선의 불확도 측정을 위하여 보관표준용액으로부터 희석된 1, 10, 50, 100, 250 ng/mL를 3회씩 반복 LC-MS/MS로 측정하여 작성하였다. 상관계수(r^2)는 보리차 미숫가루 과자 모두 0.999였다. 검정곡선은 선형 최소제곱법을 이용하여 산출하였으며 검정곡선의 불확도는 (9)-(12)의 식을 이용하여 계산하였다. 41.7, 166.7 µg/kg의 표준불확도는 보리차 2.16과 2.18, 미숫가루 2.19과 2.31, 과자 2.18과 2.23였다. 상대표준불확도는 보리차 0.04818과 0.01695, 미숫가루 0.07139와 0.01329, 과자 0.05856과 0.01480이었다.

$$A_i = C_i \times B_1 + B_0 \tag{9}$$

$$u(C_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \tag{10}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (B_0 + B_1 C_i)]^2}{n-2}} \tag{11}$$

$$s_{xx} = \sum_{i=1}^n [C_i - \bar{C}]^2 \tag{12}$$

- A_i : i^{th} measurement of the area of the calibration standard
- C_i : Concentration of the i^{th} calibration standard
- B_1 : Slope of the calibration curve
- B_0 : Intercept of the calibration curve
- P : Number of measurements to determination C_0
- n : Number of measurements for the calibration
- C_0 : Concentration of zearalenone for the calibration
- \bar{C} : Mean value of the different calibration standards
- I : Index for the number of calibration standards to obtain the calibration curve

최종 시험용액 부피의 불확도

최종 시험 용액 1 mL는 피펫을 이용하였으므로 1 mL 피펫의 교정성적서 상의 불확도는 0.008이고, 표준불확도는 0.004 mL이었다. 부피 측정을 위한 10회 반복실험에서 표준편차는 0.00012, 합성표준불확도는 0.004이었으며, 상대표준불확도는 0.004002이었다.

합성표준불확도

보리차, 미숫가루, 과자에서 각 요인들의 상대표준불확도를 식 (5)를 이용하여 계산한 결과는 Table 5와 같다. 즉, 위에서 구한 각 불확도 인자의 상대표준불확도들을 합성하여 상대합성불확도

Table 5. Values and uncertainties for zearalenone analysis by LC-MS/MS

Parameter	Barley tea		Misutgaru		Snack	
	41.7 µg/kg	166.7 µg/kg	41.7 µg/kg	166.7 µg/kg	41.7 µg/kg	166.7 µg/kg
Concentration (µg/kg)	44.9	128.7	30.7	173.7	37.2	151.0
Combined relative uncertainty	0.05585	0.03051	0.09497	0.03799	0.08652	0.03433
Combined standard uncertainty	2.50944	3.92523	2.91560	6.59769	3.21851	5.18412
Expanded uncertainty ($k=2$, 95% confidence level)	5.0	7.9	5.8	-	-	10.4
Expanded uncertainty ($k=2.26$, 95% confidence level)	-	-	-	14.9	-	-
Expanded uncertainty ($k=2.31$, 95% confidence level)	-	-	-	-	7.4	-
Uncertainty/Result (%)	11.2	6.1	19.0	8.6	20.0	6.9

를 계산하고 측정값을 곱하여 합성표준불확도를 구하였다. 41.7, 166.7 µg/kg의 합성표준불확도는 보리차 2.50949 µg/kg과 3.92548 µg/kg, 미숫가루는 2.91562 µg/kg과 6.59796 µg/kg 그리고 과자는 3.21854 µg/kg과 5.18438 µg/kg이었다.

확장불확도

확장불확도는 포함인자 k 를 곱하여 식(8)에 의해 계산하였다. 포함인자 k 는 자유도가 10보다 클 경우 2로 계산하였으며, 그 이하일 경우 t -분포표에 따라 계산하였다. 식 (6,7)의 따라 계산된 포함인자는 41.7 µg/kg과 116.7 µg/kg에서 보리차 22와 103, 미숫가루는 11과 9, 과자는 8과 18로 계산되었다. 보리차에 41.7 µg/kg과 116.7 µg/kg을 첨가한 확장 불확도는 5.0 µg/kg과 7.9 µg/kg였고, 미숫가루는 5.8 µg/kg과 14.9 µg/kg이었다. 과자는 7.4 µg/kg과 10.4 µg/kg이었다(Table 5).

또한 확장불확도를 결과값으로 나눈 값은 6.1-20.0%로 나타나, 유럽연합(23)이 확장불확도의 결과값을 1 mg/kg 이하 농도에서 계산시 제시한 32% 범위에 포함 되었다.

요 약

본 연구는 시중 유통되고 있는 곡류가공품 중 zearalenone을 immunoaffinity column 및 LC-MS/MS를 이용해 분석하였다. 표준 용액의 검량선은 1, 10, 50, 100, 250 ng/mL농도 범위에서 상관계수(r^2) 0.999 이상으로 양호한 직선성을 보였고, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.3, 1.0 µg/kg이었다. 회수율은 77.2-107.8%였고, RSD는 1.5-12.8%이었다. Product ion 283 m/z 으로 정량하여 분석한 결과 과자류 21건 중 1건(4.8%) 2.3 µg/kg, 옥수수가공품 9건 중 2건(22.2%) 1.6-8.5 µg/kg, 기타곡류가공품 14건 중 선식 1건(7.1%)에서 3.4 µg/kg이 검출되었다. 미숫가루가 19건 중 6건(31.6%)이 검출되어, 최고 검출율을 나타냈으며, 1.1-29.7 µg/kg의 검출농도를 나타내어 다른 곡류가공품에 비해 높은 수준이었다. 총 시료 89건 중 10건에서 제랄레논이 검출되어 11.2%의 검출율을 보였고, 오염수준은 1.1-29.7 µg/kg이었다. 검출시료 12건은 product ion 187 m/z 으로 모두 제랄레논임을 확인하였다. 제랄레논을 측정하는 과정 중 불확도 인자를 파악하여 측정 불확도를 추정 한 결과 41.7, 166.7 µg/kg일때 보리차는 각각 44.9±5.0 µg/kg(95% 신뢰수준 약 $k=2$), 128.7±7.9 µg/kg(95% 신뢰수준 약 $k=2$), 미숫가루는 각각 30.7±5.8 µg/kg(95% 신뢰수준 약 $k=2$), 173.7±14.9 µg/kg(95% 신뢰수준 $k=2.26$), 과자는 37.2±7.4 µg/kg(95% 신뢰수준 $k=2.31$), 151.0±10.4 µg/kg(95% 신뢰수준 약 $k=2$)를 나타내었다.

문 헌

1. Monstrom MS. Zearalenone. Vol. 77, pp. 977-982. In: Veterinary Toxicology, Gupta RC. Academic Press, Waltham, MA, USA (2007)
2. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substances in animal feed. EFSA J. 89: 1-35 (2004)
3. IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents. heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 56: 397-444 (1993)
4. Martins ML, Martins HM. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. Food Chem. 79: 315-318 (2002)
5. Jang MR, Lee CH, Lee HJ, Kim JY, Son SH, Shin CS, Kim SH, Kim DB. A survey of zearalenone in beans using high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD) and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Korean J. Food Sci. Technol. 40: 354-359 (2008)
6. Romagnoli B, Ferrari M, Bergamini C. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2, and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 45: 1075-1080 (2010)
7. Senyuya HZ, Gilbert J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. J. Chromatogr. B 878: 115-132 (2010)
8. Shephard GS, Berthiller F, Burdaspal P, Crews C, Jonker MA, Krska R, Macdonald S, Malone B, Maragos C, Sabino M, Solfrizzo M, Egmond HPV, Whitaker TB. Developments in Mycotoxin analysis: An update for 2009-2010. World Mycotoxin J. 4: 3-28 (2011)
9. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. Compr. Rev. Food Sci. F. 8: 202-251 (2009)
10. Lindner W, Zollner P, Jodlbauer J. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. J. Chromatogr. A 858: 167-174 (1999)
11. Schollenberger M, Muller HM, Ruffle M, Suchy S, Planck S, Drochner W. Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in germany. Int. J. Food Microbiol. 97: 317-326 (2005)
12. Jang MR, Lee CH, Choi IS, Shin CS, Kim JH, Jang YM, Kim DS, Ahn DH. Analysis of zearalenone contamination in cereal-based products using high performance liquid chromatography-fluorescence detector and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Korean J. Food Sci. Technol. 43:

- 224-229 (2011)
13. Jinap S, Soleimany F, Abas F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 130: 1055-1060 (2012)
 14. ISO. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements. International Organization (ISO), Geneva, Switzerland (1993)
 15. Kim YJ, Kim HW. Estimation of measurement uncertainty in vitamin c analysis from vegetable and fruit juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 1053-1059 (2003)
 16. Kim JY, Kim YJ, Yoo JH, Lee JH, Kim MJ, Kang DW, Im GJ, Hong MK, Shin YJ, Kim WI. A study on the factors causing analytical errors through the estimation of uncertainty for cadmium and lead analysis in tomato paste. *Korean J. Environ. Agric.* 30: 169-178 (2011)
 17. EURACHEM, Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd, EURACHEM, London, UK (2000)
 18. KOLAS, Guideline for quantifying and expressing the uncertainty in measurement results. Korea Laboratory Accreditation Schem, Daejeon, Korea (2000)
 19. EFSA (European Food Safety Authority). Zearalenone in food, scientific opinion of the panel on contaminations in the food chain. *EFSA J.* 2197: 1-124 (2011)
 20. Moreno-Bondi MC, Urraca JL, Marazuela MD, Moreno. Analysis for zearalenone and α -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 524: 175-183 (2004)
 21. Mateo JJ, Mateo R, Hinojo MJ, Llorens A, Jiménez M. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *J. Chromatogr. A* 955: 245-256 (2002)
 22. Soler C, Rubert J, Manes J. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chem.* 133: 176-183 (2012)
 23. EU. Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation, with particular reference to community legislation concerning. Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/sampling_en.print.htm. Jan. 9, 2010.