

Technical Note 26TN-K-0002

식품공전 기반 Kinetex XB-C18 컬럼을 이용한 곰팡이독소 9종의 LC-MS/MS 동시분석

Simultaneous Determination of Nine Mycotoxins Using a Kinetex XB-C18 Column under Korean Food Code LC-MS/MS Conditions

Jaeyeong Choi, Ph.D.^{1,2}, Heonjoo Ham^{1,2}¹Sungmoon Systech Corp., Seoul, Republic of Korea²Korea Institute of Analytical Science and Technology (KIAST), Seoul, Republic of Korea(주)성문시스텍
SUNGMOON SYSTECH CORP

서울시 성동구 성수일로 99 (서울숲AK밸리 지식산업센터), 1405 ~ 1411호

02-2201-5881

https://smst.co.kr

sales@phenomenex.co.kr

■ 서론

곰팡이독소(Mycotoxins)는 Aspergillus, Penicillium, Fusarium 등의 곰팡이가 생성하는 저분자 이차대사산물로, 곡류, 견과류, 향신료, 커피, 사료 및 다양한 농산물에서 자연적으로 생성될 수 있는 대표적인 식품 위해물질이다. 이들은 일반적인 조리 및 가공 과정에서도 쉽게 분해되지 않을 만큼 높은 열적·화학적 안정성을 가지며, 지속적인 섭취 시 간독성, 신독성, 면역독성, 생식독성 및 발암성 등을 유발하는 것으로 알려져 있다[1,2].

대표적인 곰팡이독소인 Aflatoxin B1 (AFB1)은 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 Group 1 발암물질로 분류하고 있으며, Ochratoxin A (OTA)와 Fumonisin B1 (FB1) 역시 사람에게 발암 가능성이 있는 Group 2B 물질로 지정되어 있다[3-5]. 또한 Deoxynivalenol (DON)은 위장관 독성 및 면역독성을 유발하는 대표적인 trichothecene 계열 독소이며, Zearalenone (ZEA)은 estrogenic 활성을 나타내는 대표적인 진균 독소로 알려져 있다[6,7].

이러한 위해성으로 인해 국내 식품의약품안전처(MFDS)는 「식품의 기준 및 규격(식품공전)」을 통해 Aflatoxin (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), OTA, DON, Fumonisin (FB1, FB2), ZEA 등에 대한 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있으며[8]. 유럽연합(EU) 및 Codex Alimentarius에서도 식품 중 주요 곰팡이독소에 대한 최대 허용기준 또는 관리기준을 설정하여 운영하고 있다[9,10]. 따라서 식품 안전관리 분야에서는 다양한 식품 매질에서 여러 곰팡이독소를 동시에 분석할 수 있는 신뢰성 높은 다성분 분석법이 지속적으로 요구되고 있다.

과거에는 각각의 곰팡이독소에 대해 면역친화성 컬럼(Immunoaffinity Column, IAC)을 이용한 정제와 HPLC-FLD 분석이 주로 사용되었다. 그러나 이러한 방법은 분석 대상마다 서로 다른 전처리 과정과 분석 조건이 요구되며, 분석 시간이 길고 소모품 비용이 증가하는 단점이 있다. 최근에는 하나의 분석에서 여러 곰팡이독소를 동시에 정량할 수 있는 LC-MS/MS 기반 다성분 분석법이 널리 활용되고 있으며[13,14], 국내 식품공전에서도 LC-MS/MS를 이용한 곰팡이독소 시험법을 제시하고 있다[11,12].

LC-MS/MS는 MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 이용하여 높은 선택성과 감도를 제공하지만, 충분한 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)는 여전히 분석의 핵심 요소이다.

곰팡이독소는 DON과 같이 매우 극성이 높은 화합물부터 OTA 및 ZEA와 같이 상대적으로 소수성이 큰 화합물까지 물리화학적 특성이 매우 다양하며, 구조적으로 유사한 Aflatoxin B/G 계열은 분리도가 충분하지 않을 경우 정성 및 정량 신뢰성이 저하될 수 있다.

또한 실제 식품 시료에서는 다양한 매트릭스 성분이 함께 존재하므로 안정적인 피크 형상과 충분한 분리 공간을 확보하는 것이 중요하다[13,14].

본 연구에서는 식품공전에서 제시하는 LC 이동상 gradient 조건을 변경하지 않고, Kinetex XB-C18 Core-Shell 컬럼(150 × 2.1 mm, 2.6 μm, PN.: 00F-4496-AN)을 적용하여 곰팡이독소 9종의 분리 성능을 평가하였다. 또한 식품공전에서 제시하고 있는 기존 일반 C18 컬럼을 이용한 분석 결과와 비교하여 식품 중 곰팡이독소 동시분석을 위한 실무적 적용 가능성을 평가하였다.

■ 분석방법

컬럼 선택

국내 식품공전의 곰팡이독소 동시분석법에서는 C18 계열 컬럼을 적용한 분석조건을 제시하고 있다[11]. 동일한 C18 컬럼이라도 실리카 표면 처리 방식, 리간드 구조, 입자 기술 등에 따라 머무름 특성, 피크 형상 및 분리도가 달라질 수 있으며, 본 연구에서 사용한 Kinetex XB-C18은 bulky side chain을 이용하여 잔류 실라놀에 대한 분석물질의 접근을 억제하도록 설계된 정지상으로, 이온성 또는 염기성 성분에서 개선된 피크 형상을 제공하도록 개발되었다[15]. 또한 Core-Shell 입자 구조는 짧은 확산거리와 효율적인 물질전달을 통해 높은 컬럼 효율과 좁은 피크 폭을 제공할 수 있다[16-18].

시료 준비

본 연구에서는 식품의약품안전처 「식품의 기준 및 규격(식품공전)」에서 관리하는 대표적인 곰팡이독소 9종을 대상으로 분석을 수행하였다. 대상 물질은 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, FB2, ZEA, 그리고 DON이며, 각각의 표준용액은 식품공전 시험법에 따라 혼합하여 사용하였다[11].

이동상 제조에는 LC-MS grade water, methanol (MeOH) 및 formic acid를 사용하였으며, 완충염으로 ammonium formate를 사용하였다. 모든 용매는 LC-MS 분석용 등급을 사용하였으며, 이동상은 사용 전 초음파 탈기 및 여과 과정을 수행하였다.



LC-MS/MS 분석조건

분석에 사용된 이동상 조성은 식품공전에서 제시하고 있는 0.1% formic acid와 5 mM ammonium formate가 포함된 물과 MeOH을 Table 1과 같은 조건으로 분석을 진행하였다. 단, 시료 주입량의 경우 공전에서 제시하고 있는 주입량 대비 1/10 수준인 1 μ L를 주입하였다.

검출은 Thermo Scientific사의 TSQ Altis MS 시스템을 사용하였으며, H-ESI (Heated Electrospray Ionization) 이온원에서 Table 2와 같은 조건에서 negative/positive 이온 모드로 SRM (Selected Reaction Monitoring) 분석을 수행하였다.

식품공전에서 제시하고 있는 8종의 곰팡이 독소의 특성이온 조건을 사용하였으며, 개별관리 하는 DON의 특성이온 조건은 positive 이온 모드에서 m/z 297 $\rightarrow$ 177.1(CE 23), 203.1(CE 19), 그리고 249.1(CE 14)으로 검출하였다.

Table 1. LC solvent gradient condition

Column : Kinetex 2.6 μ m XB-C18	
Dimensions : 150 x 2.1 mm	
Part No. : QOF-4496-AN	
Mobile Phase : A: 5 mM, d-Water with 0.1 Formic Acid	
B: 5 mM, MeOH with 0.1 Formic Acid	
Gradient : Time (min)	% B
0.0	5
0.5	5
2.0	40
9.0	100
11.5	100
12.0	5
15.0	5
Flow Rate : 0.5 mL/min	
Injection Volume : 1 μ L	
LC System : TSQ Altis MS	
Detection : SRM	
Detector : Thermo Scientific	

Table 2. Ion source condition

Ion Source : H-ESI
Spray Voltage (Positive) : 3,500 V
Spray Voltage (Negative) : 2,500 V
Sheath Gas : 50 (Arb)
Aux Gas : 10 (Arb)
Sweep Gas : 1 (Arb)
Ion Transfer Tube Temp. : 325 $^{\circ}$ C
Vaporizer Temp. : 350 $^{\circ}$ C

결과

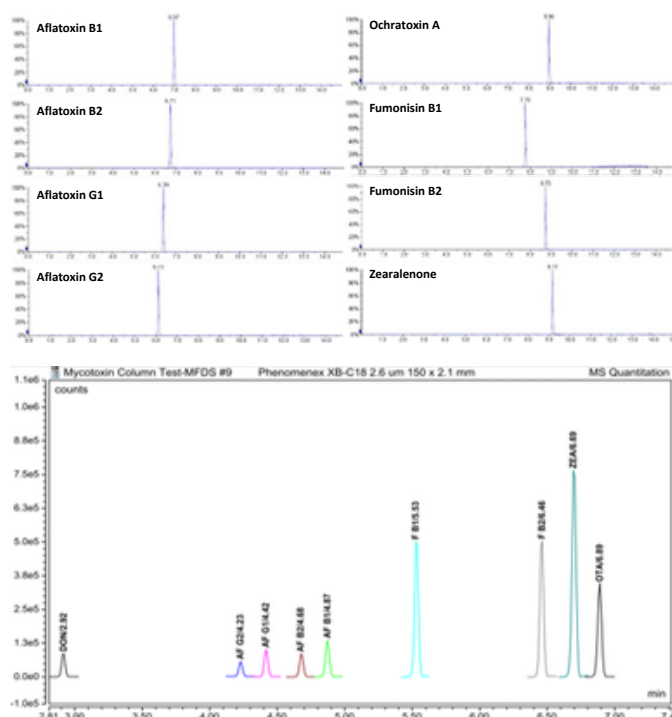


Figure 1. Chromatograms of mycotoxin standards. Upper: Representative chromatograms presented in the Korean Food Code using a conventional C18 column (3 μ m, 150 x 3.0 mm) [11], and Lower: using Kinetex XB-C18 (2.6 μ m, 150 x 2.1 mm).

식품공전에서는 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, FB2 및 ZEA의 총 8종을 LC-MS/MS로 동시에 분석하도록 제시하고 있다. 본 연구에서는 기존 동시분석 대상 8종에 개별 시험법으로 관리되는 DON을 추가하여 총 9종의 곰팡이독소를 하나의 LC-MS/MS 분석법으로 동시에 분석할 수 있는지 평가하였다.

Figure 1은 식품공전에서 제시하는 일반 C18 컬럼의 대표적인 크로마토그램(Figure 1, upper)과 동일한 이동상 및 gradient 조건에서 Kinetex XB-C18 컬럼을 적용하여 얻은 크로마토그램(Figure 1, lower)을 비교한 결과이다.

Kinetex XB-C18 컬럼에서는 DON부터 OTA까지 모든 분석 대상 성분이 약 2.92–6.89 min 범위에서 검출되었으며, 각 성분은 독립적인 피크로 확인되었다. 특히 기존 공전에서 개별 시험법으로 관리되는 DON을 포함하였음에도 기존 8종과의 피크 중첩 없이 하나의 분석조건에서 총 9종의 동시분석이 가능함을 확인하였다.

구조적으로 가장 유사하여 분리 난이도가 높은 Aflatoxin 계열은 AFG2 → AFG1 → AFB2 → AFB1 순으로 순차적으로 용출되었으며, 모든 인접 피크에서 충분한 분리를 확보하였다. 또한 FB1, FB2, ZEA 및 OTA 역시 각각 독립적인 피크를 형성하여 전체 분석 시간 약 7분 이내에 9종 모두를 안정적으로 검출할 수 있었다.

Table 3. Chromatographic performance of nine mycotoxins using the Kinetex XB-C18 column.

Conventional C18						
Name	RT (min)	ΔRT	Width 50% (min)	Peak Asymmetry (As)	Resolution (Rs)	Theoretical Plates
DON	-	-	-	-	-	-
AFG2	6.11	0.28	-	-	-	-
AFG1	6.39	0.32	-	-	-	-
AFB2	6.71	0.26	-	-	-	-
AFB1	6.97	0.78	-	-	-	-
FB1	7.75	0.98	-	-	-	-
FB2	8.73	0.23	-	-	-	-
OTA	8.96	0.21	-	-	-	-
ZEA	9.17	-	-	-	-	-

Kinetex XB-C18						
Name	RT (min)	ΔRT	Width 50% (min)	Peak Asymmetry (As)	Resolution (Rs)	Theoretical Plates
DON	2.92	1.31	0.029	0.90	26.65	54954
AFG2	4.23	0.19	0.029	1.00	3.70	116308
AFG1	4.42	0.26	0.031	1.03	4.83	113655
AFB2	4.68	0.19	0.032	1.15	3.67	118090
AFB1	4.87	0.66	0.032	0.91	12.23	131290
FB1	5.53	0.93	0.031	1.16	17.53	173515
FB2	6.46	0.23	0.032	0.88	4.13	231308
ZEA	6.69	0.20	0.034	1.09	3.45	209219
OTA	6.89	-	0.033	0.92	-	239214

* Resolution was calculated using the USP equation based on peak width at half height.

Table 3에 각 분석물질의 크로마토그래피 성능을 정리하였다. 인접 피크 간 분리도(resolution, Rs)는 3.45–26.65 범위로 계산되었으며, 이는 일반적으로 baseline separation 기준으로 사용되는 $Rs \geq 1.5$ 를 크게 상회하는 값이다. 특히 구조적으로 유사한 Aflatoxin 계열에서도 최소 $Rs=3.67$ 이상의 분리도를 나타내어 정성 및 정량 분석에 충분한 분리 성능을 확보하였다.

피크 형상(peak shape) 역시 매우 양호하였다. 모든 성분의 peak asymmetry (As)는 0.88–1.16 범위로 나타났으며, 이상적인 대칭 피크($As \approx 1$)에 근접하였다. 이는 극성이 크게 다른 DON, Aflatoxin류, Fumonisin류, ZEA 및 OTA를 동시에 분석하는 조건에서도 심한 peak tailing 또는 fronting 없이 안정적으로 성능이 유지되었음을 의미한다. 또한 이론단수(theoretical plates)는 약 5.5×10^4 – 2.39×10^5 범위로 확인되어 Core-Shell 입자의 높은 컬럼 효율을 반영하였다.

한편 Figure 1에서 확인할 수 있듯이, OTA와 ZEA의 상대적인 용출 순서는 일반 C18 컬럼과 Kinetex XB-C18 컬럼에서 서로 다르게 나타났다. 식품공전의 일반 C18 컬럼에서는 OTA가 ZEA보다 먼저 용출되는 반면(Figure 1, upper), Kinetex XB-C18에서는 ZEA가 먼저 용출되고 OTA가 이후에 검출되었다(Figure 1, lower). 이러한 용출 순서의 변화는 분석법의 이상 현상이 아니라 정지상 선택성(selectivity)의 차이에 기인한 정상적인 현상으로 해석된다.

일반적으로 동일한 C18 계열 컬럼이라 하더라도 리간드 구조, 결합 밀도, 잔류 silanol의 접근성, 표면 차폐 구조 및 phase ratio의 차이에 따라 분석물질에 대한 상대 선택성이 달라질 수 있다. OTA는 carboxylic acid, amide 및 phenolic group을 포함하는 반면, ZEA는 resorcylic acid lactone 골격을 가지며 두 물질은 이온화 특성과 정지상에 대한 상호작용 양상이 서로 다르다. 이러한 구조적 차이와 XB-C18의 표면 특성이 상대 선택성 변화에 영향을 미친 것으로 판단된다. 그러나 이러한 선택성 변화에도 불구하고 ZEA와 OTA 사이의 분리도는 $Rs=3.45$ 로 baseline separation 기준을 충분히 만족하였으며, 각각의 As 역시 1.09와 0.92로 양호한 피크 형상을 유지하였다. 따라서 용출 순서의 변화는 정성 및 정량 분석 성능을 저하시키는 요인으로 판단되지 않았다.



■ 결론

본 연구에서는 식품공전의 이동상 및 gradient 조건에 Kinetex XB-C18 컬럼을 적용하여, 기존 8종에 DON을 추가한 총 9종의 곰팡이독소 동시분석 가능성을 평가하였다.

모든 인접 피크는 $R_s=3.45$ 이상의 충분한 분리도를 나타냈으며, $As=0.88-1.16$ 으로 양호한 피크 형상을 보였다. 또한 OTA와 ZEA의 용출 순서는 일반 C18 컬럼과 다르게 나타났으나, 이는 정지상 선택성 차이에 따른 결과이며 두 성분 간 분리는 충분히 유지되었다.

종합하면, Kinetex XB-C18 컬럼은 식품공전의 LC-MS/MS 조건을 유지하면서 기존 8종 분석법을 DON을 포함한 9종 동시분석으로 확장할 수 있는 충분한 크로마토그래피 성능을 제공하였다. 따라서 본 컬럼은 식품 및 농산물 중 곰팡이독소의 다성분 동시분석에 적용할 수 있는 실용적인 대안이 될 것으로 기대된다.

■ 참고문헌

- [1] Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. **2003**, 16, 497–516.
- [2] Pitt, J. I.; Miller, J. D. A Concise History of Mycotoxin Research. J. Agric. Food Chem. **2017**, 65, 7021–7033.
- [3] IARC. Chemical Agents and Related Occupations. IARC Monographs, Vol. 100F, **2012**.
- [4] IARC. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs, Vol. 56, **1993**.
- [5] IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monographs, Vol. 82, **2002**.
- [6] EFSA. Risks to Human and Animal Health Related to the Presence of Deoxynivalenol and Its Acetylated and Modified Forms in Food and Feed. EFSA J. **2017**, 15, e04718.
- [7] EFSA. Scientific Opinion on the Risks for Public Health Related to the Presence of Zearalenone in Food. EFSA J. **2011**, 9, 2197.
- [8] 식품의약품안전처. 「식품의 기준 및 규격」. 식품의약품안전처 고시 제 2025-56호, **2025**.
- [9] European Commission. Commission Regulation (EU) 2023/915 on Maximum Levels for Certain Contaminants in Food. Off. J. Eur. Union **2023**, L119, 103–157.
- [10] Codex Alimentarius Commission. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (CXS 193-1995).
- [11] 식품의약품안전처. 「식품의 기준 및 규격」 제8. 일반시험법, 9.2 곰팡이독소 시험법, **2025**.
- [12] 식품의약품안전처. 『식품공전 곰팡이독소 시험법 실무해설서』, **2023**.
- [13] Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: A Review. Anal. Chim. Acta **2009**, 632, 168–180.
- [14] Vacklavikova, M.; Zachariasova, M.; Hajsova, J. Current Trends in LC-MS/MS-Based Multimycotoxin Analysis in Food. World Mycotoxin J. **2013**, 6, 229–247.
- [15] Phenomenex. Kinetex XB-C18 HPLC/UHPLC Columns Product Information.
- [16] Kirkland, J. J.; Truszkowski, F. A.; Dilks, C. H.; Engel, G. S. Superficially Porous Silica Microspheres for Fast High-Performance Liquid Chromatography of Macromolecules. J. Chromatogr. A **2000**, 890, 3–13.
- [17] Marchetti, N.; Cavazzini, A.; Gritti, F.; Guiochon, G. Gradient Elution Separation and Peak Capacity of Columns Packed with Porous Shell Particles. J. Chromatogr. A **2007**, 1163, 203–211.
- [18] Gritti, F.; Guiochon, G. Mass Transfer Kinetics, Band Broadening and Column Efficiency of Columns Packed with Core-Shell Particles: A Review. J. Chromatogr. A **2012**, 1228, 2–19.

본 기술자료는 (주)성문시스텍에서 Phenomenex 제품으로 한국분석과학연구소(KIAST)에서 수행한 결과입니다.

정확하고 신뢰할 수 있는 분석 데이터를 제공하기 위해 전문성 및 최적화된 분석 환경에서 수행되었습니다.

KIAST 한국분석과학연구소
Korea Institute of Analytical Science and Technology

*KIAST는 (주)성문시스텍의 파트너 연구기관입니다.

㈜성문시스텍은 Phenomenex의 대한민국 공식 대리점으로서 다양한 분석 및 분리 솔루션을 제공하고 있습니다. 본 자료에 포함된 제품명, 상표, 로고 및 서비스명은 해당 소유권자의 등록상표 또는 상표입니다. 모든 기술 자료, 응용 데이터 및 성능 비교 결과는 특정 분석 조건에서 얻어진 참고용 정보이며, 실제 결과는 사용 환경, 장비 구성, 시료 특성 및 분석 조건에 따라 달라질 수 있습니다. 비교 데이터는 모든 응용 분야를 대표하지 않을 수 있습니다. Phenomenex®, Kinetex®, Luna®, Biozen®, Strata®, SecurityGuard® 및 기타 관련 제품명은 Phenomenex, Inc.의 상표 또는 등록상표입니다. 본 자료의 내용은 제품 정보 제공을 목적으로 작성되었으며 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다. 본 자료의 전부 또는 일부를 ㈜성문시스텍의 사전 서면 승인 없이 복제, 배포, 수정 또는 상업적으로 활용하는 것을 금합니다. 제품의 사용 적합성은 사용자가 최종적으로 검토 및 판단하여야 합니다. FOR RESEARCH USE ONLY. Not for use in clinical diagnostic procedures. © 2026 Sungmoon Systech Co., Ltd. All rights reserved.



이 방법 구현에 대해 궁금한 점이 있거나 자세한 정보를 원하시면 언제든지 문의해 주세요!
cjy@phenomenex.co.kr 로 메일주시면 저희 기술 전문가와 상담하실 수 있습니다.