

LC-MS/MS를 이용한 닭 간과 신장 중 곰팡이 독소 6종 동시분석법 개발

김수희 · 김광남 · 김효비 · 송재영 · 박성원[†]

농림축산검역본부 동물약품평가과

Method Development for Determination of Multi-Mycotoxins in Chicken Liver and Kidney Tissues by LC-MS/MS

Soohee Kim, Kwang-Nam Kim, Hyobi Kim, Jae-Young Song and Sung-Won Park[†]

Veterinary Drugs & Biologics Division, Animal and Plant Quarantine Agency (QIA), Gimcheon 39660, Republic of Korea

ABSTRACT Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds, such as *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, that have adverse effects on animals and humans. Aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, fumonisin and deoxynivalenol are the mycotoxins of greatest agro-economic importance and cause acute disease called mycotoxicoses. Mycotoxicosis in poultry birds results in decreased meat/egg production, immunosuppressant, and hepatotoxicosis. Some of toxins or their metabolites may be retained in animal or human tissues and induce health problems. This study was designed to develop a sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous detection and quantification of mycotoxins, such as aflatoxin B₁, aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone, fumonisin B and deoxynivalenol, in chicken liver and kidney tissues. The mycotoxins were extracted and purified using modified QUECHERS methods, separated by LC and detected by an electrospray ionisation interface (ESI) and tandem MS. Good precision and linearity were observed for most of six mycotoxins. The recovery test for each mycotoxin in liver and kidney tissues mostly indicated good average recovery rates between 80.94% and 98.10% and the coefficient of variation mostly under 13.78%, except for aflatoxin M₁ and fumonisin B₁. The limit of detection (LOD) for six mycotoxins was 7.6~145.79 µg/kg in liver tissues and 6.07~197.20 µg/kg in kidney tissues. The quantification limits (LOQ) for 6 mycotoxins were in the range 23.04~441.78 µg/kg in liver tissues and 18.40~597.59µg/kg in kidney tissues, respectively. The developed multi-mycotoxin method in this study permits simultaneous, simple, and rapid determination of several co-existing mycotoxins in chicken liver and kidney tissues.

(Key words: mycotoxins, chicken, liver, kidney, LC-MS/MS)

서 론

곰팡이 독소는 곡식의 재배, 저장, 유통 과정 중에 생성되는 곰팡이(mold)의 이차대사산물로서 *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* 등에 의해 생성된다(Solfrizzo et al., 2011; Whittlow et al., 2005). 사람의 경우, 곰팡이 독소에 오염된 식품에 의해 직접적으로 노출되거나, 곰팡이 독소에 오염된 곡식이나 사료에 의해 곰팡이 독소에 노출된 식육을 섭취하는 과정에서 노출될 수 있다. 오염된 가축 사료에서 주로 확인되는 곰팡이 독소는 아플라톡신 B₁·M₁, 오크라톡신 A, 푸모니신 B₁, 데옥시니발레놀, 제랄레논 등이며, 유럽위원회(European Commission)에서는 가축사료에서 곰팡이 독소 5

종(아플라톡신 B₁, 데옥시니발레놀, 제랄레논, 푸모니신 B₁+B₂, 오크라톡신 A)에 대한 최대 허용치를 설정하여 관리하고 있다(Solfrizzo et al., 2011; Streit et al., 2012).

곰팡이 독소는 다양한 화학구조를 가지며, 독소를 생성하는 곰팡이의 종류, 구조 및 작용메커니즘에 의해서 분류된다. 곰팡이 독소에 오염된 사료의 경우, 한가지 이상의 곰팡이를 포함하며, 한 종의 곰팡이가 하나 또는 여러 종류의 독소를 생산하고, 각각의 곰팡이 독소는 다른 곰팡이에 의해서 생산될 수 있다(Hussein and Brasel, 2001; Lee et al., 2002). 여러 종의 곰팡이 독소가 오염된 사료의 경우, 섭취 시 상승작용으로 추가적인 독성을 유발할 수 있다(Shang et al., 2015).

곰팡이 독소는 낮은 분자량의 비휘발성 물질로 상대적으

[†] To whom correspondence should be addressed : pasawa@korea.kr

로 열에 안정하며, 노출 시 간, 신장, 장내 점막 등 특정 장기에 영향을 미친다(Pier et al., 1980). 특히 곰팡이 독소에 오염된 사료 섭취는 영양소 흡수 및 성장 저하, 면역억제, 생식교란을 유발하여 가축의 생산성 저하 및 질병에 대한 민감도를 증가시켜 큰 경제적 손실을 유발한다(Shang et al., 2015). 뿐만 아니라 곰팡이 독소는 가축에서 발암, 신장독성, 간독성, 신경독성을 유발하며, 노출 시 임상증상으로는 설사, 장기(간, 신장) 손상, 호흡기 부종, 구토, 빈혈, 종양 등이 있다(Bryden, 2012).

닭은 낮은 농도의 곰팡이 독소에 의해서도 독성이 유발되는 감수성이 높은 가축 중 하나이다. 닭의 경우, 종양이 생성될 만큼 장기간 생존하지 않지만, 곰팡이 독소와 관련하여 성장과 생산성 저하에 영향을 미치며(Jestoi et al., 2007), 특히 아플라톡신은 양계산업에서 사료요구율 저하, 사망률 증가로 경제적 손실을 초래하며, 간 손상, 소화효소활성 억제, 면역억제 등 다양한 대사 장애를 유발한다는 보고가 있다(Oliveira et al., 2015). 그 외 여러 곰팡이 독소 중독이 닭에서 보고되고 있으며, 아플라톡신에 의한 turkey-X disease 및 간괴사, 아플라톡신, 오크라톡신 등 다수 곰팡이 독소 동시 노출에 의한 간염, 살모넬라증, 콕시디아 감염의 발생 증가와 관련이 있다(Hussein and Brasel, 2001; Jand et al., 1995).

동물에서 곰팡이 독소 노출 또는 중독 여부를 확인하기 위해 간, 신장 등 장기 조직에 잔류된 독소를 분석하는 방법이 보고되고 있다. 오염된 가축 사료에서 주로 확인되는 6종의 곰팡이 독소도 간, 신장에 잔류되는 것이 알려져 있다. 오크라톡신은 높은 안정성 때문에 사료에 의해 노출된 동물의 순환계, 간, 근육, 지방 등 조직에 축적되어 먹이사슬에 의해 인체에까지 노출되며, 푸모니신의 경우 가축에서 노출 시 근육 조직, 유, 알에서는 곰팡이 독소가 정제되지 않았지만, 간과 신장에서 소량 정제된다는 것이 알려져 있다(Schlatter et al., 1996; Bucci et al., 1998). 마우스를 이용한 동물실험에서 구강으로 섭취된 데옥시니발레놀은 혈장, 간, 비장, 뇌에서 섭취 후 5분에서 24시간 사이에 확인되었고, 심장과 신장에서는 5분 후부터 8시간까지 확인되었다(Turner et al., 2009). 돼지에서 사료에 의해 노출된 아플라톡신 B₁은 주로 B₁, M₁의 형태로 간, 신장, 근육에 잔류되며, 간에서 잔류가 확인된 아플라톡신은 아플라톡신 중독증 진단 시 활용된다(Chiavaro et al. 2005). 가금에서도 400 ppb 이상의 아플라톡신 B₁이 포함된 사료를 섭취하는 경우 간에서 잔류된 아플라톡신 B₁이 검출되었다(Hussain et al., 2016). 또한 제랄레논은 간에서 주로 대사되며, 가금을 이용한 실험에서 경구로 독소를 섭취하였을 때 1시간 내에 간, 신장, 소장에서 검출되었다

(Buranatragool et al., 2015).

현재까지 곰팡이 독소 확인을 위한 liquid-liquid extraction, supercritical fluid extraction, solid phase extraction 등의 시료 전처리 방법과 thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, gas chromatography, and capillary electrophoresis, ELISA 등의 분석법이 보고되어 있으며(Turner et al., 2009), 1980년대 atmospheric pressure ionization 기술이 선보인 후에 주로 LC-MS/MS가 잔류 분석에 사용되고 있다(Turner et al., 2009; Kim et al., 2015).

본 연구에서는 곰팡이 독소에 대한 노출을 확인하기 위한 목적으로 닭의 간, 신장 조직에서 곰팡이 독소 6종 추출, 정제 조건 및 LC-MS/MS를 이용한 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 표준품 및 시약

곰팡이 독소 표준품 아플라톡신 B₁, 아플라톡신 M₁, 오크라톡신 A, 푸모니신 B₁, 데옥시니발레놀, 제랄레논과 개미산은 Sigma-Aldrich(saint Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴은 Merck(HPLC grade, Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 정제를 위한 EMR dSPE(5982-1010)와 EMR polish(5982-0101)는 Agilent Technologies(CA, USA)에서 구입하였다.

2. 분석 조건

LC는 Nexera X2(Shimadzu, Kyoto, JAPAN), MS는 LCMS-8040(Shimadzu)를 이용하였고, 컬럼은 XTerra MS C₁₈ 5 μ L, 2.1 \times 150 mm(Waters Corporation, MO, USA)를 사용하였다. 이동상으로는 10 mM 아세트산암모늄 수용액과 2% 아세트산 포함 메탄올을 사용하였고, 이동상 속도는 0.4 mL/min로 시료는 5 μ L를 주입하였다. 질량분석기의 경우 ESI 모드를 사용하였으며, 분석기기 조건은 Table 1과 같다.

3. 추출 및 정제

닭 간, 신장 조직의 추출 및 정제는 QUECHERS법을 기본으로 수정된 방법을 적용하였다. 균질화된 닭 간 또는 신장 조직 2 g을 정밀히 달아 5% 개미산이 포함된 아세토니트릴 10 mL를 첨가한 후 10분간 진탕 후 5,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한다. 상층액을 EMR dSPE와 혼합하여 강하게 흔든 후 5,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한다. 상층액을 다시 EMR polish를 이용하여 추가적으로 정제하여 원심분리한 후 상층액을 시험용액으로 사용하였다.

Table 1. Analytical conditions for the determination of mycotoxins

LC ^a conditions	Instrument	LC: Nexera X2 MS/MS: LCMS-8040		
	Column	Waters XTerra MS C ₁₈ 5 μ L, 2.1 \times 150 mm		
	Column temperature	40°C		
	Flow rate	0.4 mL/min		
	Injection volume	5 μ L		
	Mobile phase	A : 10 mM Ammonium acetate in water B : 2% Acetic acid in methanol		
Gradient program	Time(min)	A(%)	B(%)	
	0	98	2	
	3	45	55	
	7~8	15	85	
MS/MS ^b conditions	DL ^d temperature	11	98	2
	Ion mode	ESI ^c +/-		
	Capillary voltage	-3.5 kV		
	Nebulizing	2.9 L/min		
	Drying gas flow	15.0 L/min		

^a Liquid chromatography, ^b Tandem mass spectrometry, ^c Electrospray ionization interface, ^d Desolvation line.

4. 분석법 검증

모든 시료는 3번 반복하여 분석하였다. 확립된 분석법의 직선성, 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery), 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)에 대해 유효성을 검증하였다. 혼합 표준용액을 1~7,000 ng/mL 수준으로 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 검량선을 작성하였고, 상대표준편차를 기울기로 나누어 3을 곱한 값을 검출한계, 10으로 곱한 값을 정량한계로 나타내었다. 회수율 측정은 공시료에 최종농도가 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1 mg/kg이 되도록 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 3회 반복하여 회수율을 분석하여 얻은 결과의 상대표준편차로 분석의 재현성을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. LC-MS/MS 분석조건 확립

곰팡이 독소의 LC-MS/MS에서의 분석 조건을 확립하기 위해 표준용액(100 ng/mL)을 주입하여 양이온 모드와 음이온 모드에서 분석하였다. 아플라톡신 B₁·M₁, 오크라톡신 A, 푸모닌신 B₁은 양이온 모드에서, 데옥시니발레놀, 제랄레논은 음이온 모드에서 더 좋은 감도를 나타내었다. MS/MS 분석 시 multiple reaction ionization(MRM) 모드로 최적화된 분석 조건에서 product ion 및 collision energy 값을 선정하였다. 각 곰팡이 독소에서 3개의 product ion을 선정하였고, 가장 높은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로 나머지 두 개의 이온을 정성이온(qualification ion)으로 선정하였다. 분석 시 이용된 MS/MS 조건과 확립된 MRM parameter는 Table 1 및 Table 2에 각각 나타내었으며, 선정된 precursor ion과 product ion은 기존의 연구들과 대부분 일치하였다(Rasmussen et al., 2010; Solfrizzo et al., 2011).

Table 1에서와 같이 LC 컬럼은 Waters XTerra MS C₁₈(5 μ L, 2.1 \times 150 mm) 사용하였으며, 10 mM 아세트산암모늄 수용액과 2% 아세트산이 포함된 메탄올을 이동상으로 사용하여 농도 구배 조건을 설정하였다.

6종의 곰팡이 독소는 확립된 분석 조건을 이용하여 약 1~7,000 ng/mL 범위의 농도에서 R²값은 0.99 이상의 우수한 직선성을 나타내었다.

2. 추출 및 정제조건 확립

QUECHERS 법은 Anastassiades(2003)이 AOAC(Association of Official Agricultural Chemist)에 발표한 것으로 고체상 시약(염화나트륨, 황산마그네슘) 또는 고상흡착제를 시료에 직접 넣어 추출, 정제하는 분석방법이다. 본 연구에서도 변형된 형태의 QUECHERS 법을 사용하였다. 닭의 간 및 신장 조직 2 g에 5% 개미산이 포함된 아세토니트릴을 첨가하여 진탕한 후 C₁₈/PSA대신 상용화된 EMR-dSPE와 EMR polish을 사용하여 정제하였다. 본 전처리 방법은 6종의 곰팡이 독소를 동일한 과정으로 정제하여 분석시간을 최소화하였으며, EMR-dSPE와 EMR polish를 사용하여 매트릭스의 간섭을 줄일 수 있었다. 닭의 간 및 신장조직의 추출 및 정제 과정을 Fig. 1에 제시하였다.

3. 동시분석법 검증

확립된 분석법을 검증하기 위해 정밀도(precision)와 정확도(accuracy)를 평가하였다. 정밀도는 시료를 반복하여 분석하였을 때의 분석값의 상대표준편차로 확인하였으며, 정확도는 일정 농도로 회수율 실험을 반복하여 평가하였다. 임

Table 2. LC/MS/MS MRM^a parameters for mycotoxin analysis

Mycotoxin	Q1 ^b	Ion	Polarity	Q1 pre bias	Q3 ^c	CE ^d	Q3 pre bias
Aflatoxin B ₁	313.10	[M+H] ⁺	Positive	-30	285.05*	-23	-19
					240.95	-38	-25
					213.00	-46	-23
Aflatoxin M ₁	328.90	[M+H] ⁺	Positive	-29	273.05*	-24	-30
					259.00	-24	-17
					228.95	-42	-24
Ochratoxin A	404.00	[M+H] ⁺	Positive	-10	238.95*	-24	-26
					358.10	-14	-26
					220.95	-36	-23
Fumonisin B ₁	722.30	[M+H] ⁺	Positive	-26	334.20*	-42	-23
					352.25	-38	-25
					95.00	-55	17
Deoxynivalenol	355.00	[M+CH ₃ COO] ⁻	Negative	15	295.05*	9	22
					265.05	12	19
					59.00	22	23
Zearalenone	317.00	[M-H] ⁻	Negative	13	174.90*	23	19
					130.95	29	25
					273.10	18	20

^a Multiple reaction monitoring, ^b Precursor ion, ^c Production ion, ^d Collision energy (eV).

* Quantification ion.

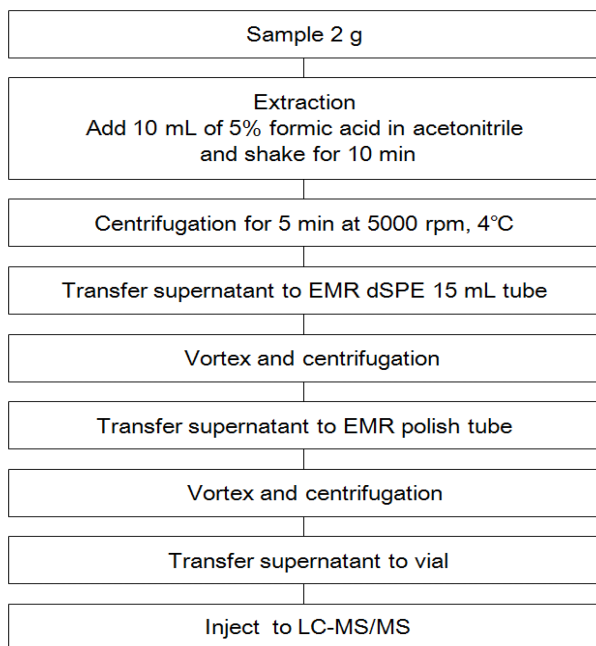


Fig. 1. Preparation procedure of chicken liver and kidney tissues for mycotoxin analysis by LC-MS/MS.

의로 닭의 간과 신장 조직에 곰팡이 독소를 추가하여 분석하였을 때의 LC-MS/MS 크로마토그램을 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 제시하였다.

정확도를 평가하기 위해 닭의 신장과 간 조직 시료에 검출한계의 10배 수준의 농도로 회수를 실험을 3회 이상 반복하여 수행하였다(Table 3). 실험 결과, 닭의 간과 신장 조직에서 곰팡이 독소 4종(아플라톡신 B₁, 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 제랄레논)의 평균 회수율은 80.94~98.10%이고, 상대표준편차도 14% 미만으로 조사되어 높은 정확도와 정밀도를 확인할 수 있었다. 아플라톡신 M₁은 간(75.82%)과 신장(55.15%)조직에서 푸모니신 B₁은 간(64.21%)조직에서 다소 낮은 회수율을 보였으나, 상대표준편차는 10% 이하로 높은 정밀도를 보였다. 닭의 간과 신장조직에서 곰팡이 독소 6종이 모두 높은 정밀도와 정확도를 확인하지는 못했지만, 동일한 추출·정제 조건으로 효율적으로 곰팡이 독소 6종을 모두 검출해 낼 수 있는 방법을 확립한 것으로 생각된다.

검출한계와 정량한계는 검량선에 근거하여 산출하였다(Table 4). 검량선에서 잔차의 표준편차를 검량선의 기울기

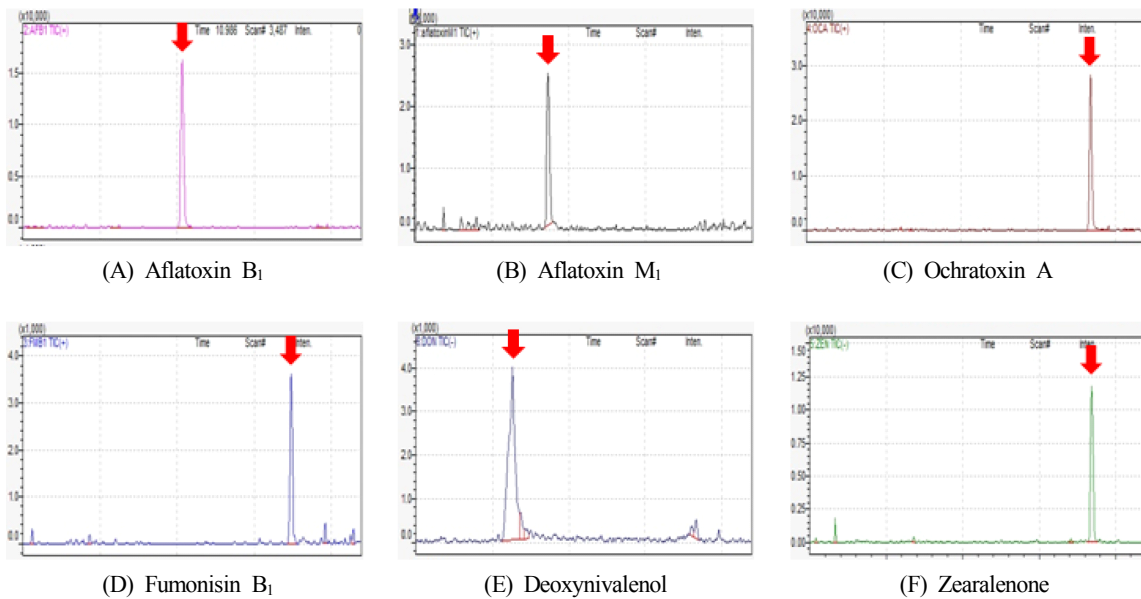


Fig. 2. Chromatogram of mycotoxins in chicken liver tissues by LC-MS/MS. Total ion chromatogram of chicken liver sample of aflatoxin B₁ (A), Aflatoxin M₁ (B), Ochratoxin A (C), Fumonisin B₁ (D), Deoxynivalenol (E), and Zearalenone (F) at the retention time of mycotoxins indicated by arrows.

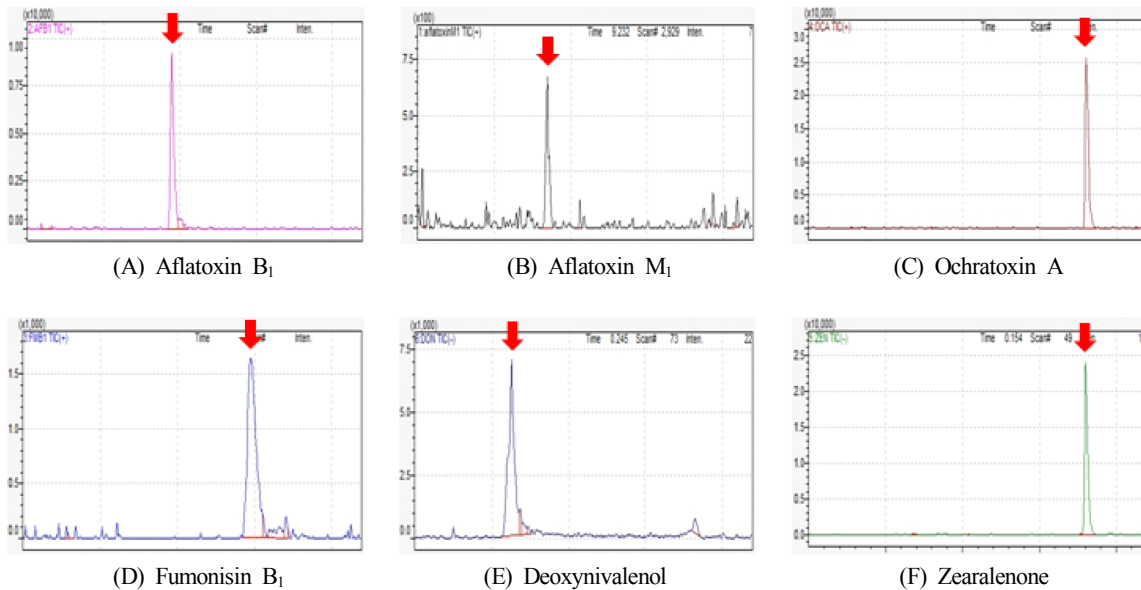


Fig. 3. Chromatogram of mycotoxins in chicken kidney tissues by LC-MS/MS. Total ion chromatogram of chicken kidney sample of Aflatoxin B₁ (A), Aflatoxin M₁ (B), Ochratoxin A (C), Fumonisin B₁ (D), Deoxynivalenol (E), and Zearalenone (F) at the retention time of mycotoxins indicated by arrows.

로 나누어 3을 곱한 값을 검출한계, 10을 곱한 값을 정량한계로 구하였다. 닭 간 시료의 경우, 검출한계는 7.6~145.79 µg/kg, 정량한계는 23.04~441.78 µg/kg이었다. 닭 신장의 경우, 검출한계는 6.07~197.20 µg/kg, 정량한계는 18.40~597.59 µg/kg으로 나타났다.

푸모니신 B₁은 닭 간과 신장 조직 모두에서 검출한계가 각각 145.79 µg/kg, 197.20 µg/kg으로 높게 나타났으며, 데옥시니발레놀은 간조직에서 검출한계가 105.50 µg/kg으로, 아플라톡신 B₁, 오크라톡신 A, 제랄레논은 정량한계가 13 µg/kg 이하로 확인되었다. 현재 우리나라에서는 식품공전상 육류

Table 3. Mean recoveries and precision of the method for mycotoxin analysis in chicken liver and kidney tissues by LC-MS/MS

Mycotoxins	Liver			Kidney		
	Fortificated concentration (mg/kg)	Recovery (%)	RSD ^a (%)	Fortificated concentration (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
Aflatoxin B ₁	0.10	88.01	8.72	0.10	83.75	2.80
Aflatoxin M ₁	0.01	75.82	9.39	0.01	55.15	4.99
Ochratoxin A	0.10	82.36	9.41	0.10	95.61	7.02
Fumonisin B ₁	1.00	64.21	4.54	1.00	86.52	5.26
Deoxynivalenol	1.00	80.94	9.09	1.00	83.18	0.73
Zearalenone	0.10	87.51	13.78	0.10	98.10	2.68

^a Relative standard deviation.

Table 4. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of mycotoxins in chicken liver and kidney tissues by LC-MS/MS

Mycotoxins	Liver				Kidney			
	Linear range (ng/mL)	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Linear range (ng/mL)	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Aflatoxin B ₁	4.6~370.4	0.9996	10.02	30.36	4.6~370.4	0.9975	24.98	75.70
Aflatoxin M ₁	4.1~333.3	0.9997	7.60	23.04	4.1~333.3	0.9998	6.07	18.40
Ochratoxin A	1.52~370.4	0.9995	10.45	31.66	1.5~370.4	0.9998	5.90	17.87
Fumonisin B ₁	88.2~7,142.9	0.9998	145.79	441.78	88.2~7,142.9	0.9996	197.20	597.59
Deoxynivalenol	41.2~3,333.3	0.9995	105.50	319.71	41.2~3,333.3	0.9999	41.00	124.24
Zearalenone	5.9~476.2	0.9996	12.88	39.02	5.9~476.2	0.9999	4.78	14.47

에서의 곰팡이 독소 기준은 설정되어 있지 않지만, 식품에서 곰팡이 독소를 기준으로 하였을 때 본 연구에서 확립된 곰팡이 독소 6종 동시 분석법은 모두 각각의 독소 기준치 이하까지 분석 가능함을 알 수 있다.

현재까지, 식물, 동물 등 다양한 시료에서 곰팡이 독소를 분석하는 여러 방법이 보고되어 사용되고 있다. LC-MS/MS를 이용하여 닭의 간, 신장에서 곰팡이 독소 6종의 선택성, 직선성 및 회수율로 측정한 정확성 및 반복 재현성 분석 결과, 본 연구에서 확립된 실험방법은 생체시료에서 효율적인 곰팡이 독소 동시 분석법으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서는 곰팡이 독소에 대한 노출을 확인하기 위한 목적으로 닭의 간, 신장 조직에서 곰팡이 독소 분석법을 확립하였다. 곰팡이 독소의 경우 닭에서 독성이 강하며, 본 실

험에서는 가축의 사료에서 주로 확인되는 곰팡이 독소 6종(아플라톡신 B₁·M₁, 오크라톡신 A, 푸모니신 B₁, 데옥시니발레놀, 제랄레논)을 선별하여 추출, 정제조건을 확립하고 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 확립된 분석조건에서 검량선은 R²값이 0.99 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다. QUECHERS법을 응용하여 닭 간, 신장 시료에서 곰팡이 독소를 추출, 정제하여 분석하였을 때 곰팡이 독소 4종(아플라톡신 B₁, 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 제랄레논)의 평균 회수율은 80.94~98.10%이고, 상대표준편차도 14% 미만으로 조사되어 높은 정확도와 정밀도를 확인할 수 있었다. 검량선에 근거하였을 때 곰팡이 독소 6종에 대하여 닭 간 시료의 경우 검출한계는 7.6~145.79 µg/kg, 정량한계는 23.04~441.78 µg/kg이었다. 닭 신장의 경우 검출한계는 6.07~197.20 µg/kg, 정량한계는 18.40~597.59 µg/kg으로 나타났다. 본 연구의 결과 LC-MS/MS를 이용하여 닭의 간, 신장에서 곰팡이 독소 6종 동시 분석법을 확립하였으며, 이는 생체시료에

서 효율적인 곰팡이 독소 동시 분석법으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농림축산검역본부 농림축산검역검사기술개발 사업의 지원에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ 2003 Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86:412-431.
- Bryden WL 2012 Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 173:134-158.
- Bucci TJ, Howard PC, Tolleson WH, Laborde JB, Hansen DK 1998 Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals. *Toxicol Pathol* 26:160-164.
- Buranatragool K, Poapolathepa S, Isariyodomb S, Imsilpa K, Klangkaewa N, Poapolathep A 2015 Dispositions and tissue residue of zearalenone and its metabolites α -zearalenol and β -zearalenol in broilers. *Toxicology Reports* 2:351-356.
- Chiavaro E, Cacchioli C, Berni E, Spotti E 2005 Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxins B₁ and M₁ in pig liver: Comparison with high-performance liquid chromatography determination. *Food Addit Contam* 22:1154-1161.
- Hussain Z, Rehman HU, Manzoor S, Tahir S, Mukhtar M 2016 Determination of liver and muscle aflatoxin B₁ residues and select serum chemistry variables during chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Vet Clin Pathol* doi: 10.1111/vcp.12336. [Epub ahead of print].
- Hussein HS, Brasel JM 2001 Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.
- Jand SK, Singh PP, Singh A 1995 Observations on occurrence of poultry diseases associated with mycotoxin in fed. *Indian J Anim Sci* 65:1063-1967.
- Jestoi M, Rokka M, Peltonen K 2007 An integrated sample preparation to determine coccidiostats and emerging Fusarium-mycotoxins in various poultry tissues with LC-MS/MS. *Mol Nutr Food Res* 51:625-637.
- Kim KN, Kim S, Kim H, Yang SI, Kim H, Song JY, Park SW 2015 Simultaneous detection of aflatoxin B₁, deoxynivalenol, and fumonisin B₁ in blood with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Prev Vet Med* 39:108-113.
- Lee HK, Kim MJ, Hwang YH, Kim MK, Lee HS 2002 Toxicity and metabolism of mycotoxins occurring in foods and feeds. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45:1-10.
- Oliveira AA, Keller KM, Deveza MV, Keller LAM, Dias EO, Martini-Santos BJ, Leitão DFGM, Cavaglieri LR, Rosa CAR 2015 Effect of three different anti-mycotoxin additives on broiler chickens exposed to aflatoxin B-1. *Arch Med Vet* 47:175-183.
- Pier AC, Richard JL, Cysewski SJ 1980 Implications of mycotoxins in animal disease. *J Am Vet Med Assoc* 176:719-724.
- Rasmussen RR, Storm IM, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF 2010 Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 397:765-776.
- Schlatter C, Studer-Rohr J, Rásonyi T 1996 Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 13:43-44.
- Shang QH, Yang ZB, Yang WR, Li Z, Zhang GG, Jiang SZ 2015 Toxicity of mycotoxins from contaminated corn with or without yeast cell wall adsorbent on broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* 29:674-680.
- Solfrizzo M, Gambacorta L, Lattanzio VM, Powers S, Visconti A 2011 Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B₁ in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Anal Bioanal Chem* 401:2831-2841.
- Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald IP 2012 Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-Focus on Europe. *Toxins* 4:788-809.
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA 2009 Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta* 632:168-180.

Whitlow LW, Hagler WM 2005 Mycotoxins in dairy cattle:
Occurrence, toxicity, prevention and treatment. In Proc
Southwest Nutr Conf 124-138.

Received May 31, 2016, Revised Jun. 15, 2016, Accepted
Jun. 16, 2016