pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 1, pp. 13~21 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.1.13

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Streptomycin 및 Dihydrostreptomycin 동시시험법 개발

이한솔 · 도정아* · 박지수 · 박신민 · 조성민 · 신혜선 · 장동은 · 최영내[1] · 정용현 · 이강봉
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, [1]한국식품과학연구원

Development of Simultaneous Analytical Method for Streptomycin and Dihydrostreptomycin Detection in Agricultural Products Using LC-MS/MS

Han Sol Lee, Jung-Ah Do*, Ji-Su Park, Shin-Min Park, Sung Min Cho, Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Young-Nae Choi[1], Yong-hyun Jung, and Kangbong Lee
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
[1]Korea Advanced Food Research Institute, Uiwang, Korea
(Received November 7, 2018/Revised November 30, 2018/Accepted December 4, 2018)

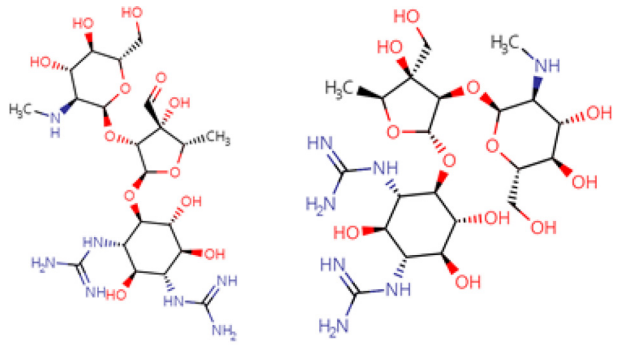
ABSTRACT - A method was developed for the simultaneous detection of an antibiotic fungicide, streptomycin, and its metabolite (dihydrostreptomycin) in agricultural products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted using methanol adjusted to pH 3 using formic acid, and purified with a HLB (Hydrophilic lipophilic balance) cartridge. The matrix-matched calibration curves were constructed using seven concentration levels, from 0.001 to 0.1 mg/kg, and linearity of five agricultural products (hulled rice, potato, soybean, mandarin, green pepper), with coefficients of determination (R^2) ≥ 0.9906, for streptomycin and dihydrostreptomycin. The mean recoveries at three fortification levels (LOQ, LOQ × 10, LOQ × 50, n = 5) were from 72.0~116.5% and from 72.1~116.0%, and relative standard deviations were less than 12.3% and 12.5%, respectively. The limits of quantification (LOQ) were 0.01 mg/kg, which are satisfactory for quantification levels corresponding with the Positive List System. All optimized results satisfied the criteria ranges requested in the Codex guidelines and the Food Safety Evaluation Department guidelines. The present study could serve as a reference for the establishment of maximum residue limits and be used as basic data for detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in food.

Key words : Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Antibiotic fungicide, Agricultural product, Simultaneous analysis

스트렙토마이신(Streptomycin)은 아미노글리코사이드계 항생물질로써 토양의 방선균 중 하나인 *Streptomyces griseus* 으로부터 생성되며 그람음성균을 비롯하여 광범위한 병원미생물의 단백질 합성을 저해한다. 국내에서는 소, 돼지, 닭 등 가축 및 가금에 동물용의약품으로 허가되어 그람음성균 감염의 일차 치료제로 사용되고 있으며, 과수 및 채소의 무름병, 궤양병 등을 방제하기 위하여 농약으로 등록되어 있다[1-2]. 디히드로스트렙토마이신(Dihydrostreptomycin)은 스트렙토마이신의 촉매 환원으로 생성되는 항생물질로써 항균활성, 작용기작 등은 스트렙토마이신과 같다[3]. 스트렙토마이신[4]과 디히드로스트렙토마이신[5]은 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 각각 –7.49와 –7.35로 극성이 크고, 분자량이 581.58 ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$)과 583.59 ($C_{21}H_{41}N_7O_{12}$)로 비교적 큰 염기성 화합물이며 분자 구조는 Fig. 1과 같다.

스트렙토마이신의 잔류물의 정의는 축산물의 경우 우리나라와 JECFA, 일본에서 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 합으로 정의하고 있으며 유럽이 스트렙토마이신 모화합물만을 잔류물로 정하여 관리하고 있다. 하지만 농산물의 경우에는 일본과 미국에만 잔류물의 정의가 설정되어 있어 국내 및 국외의 기준 설정이 필요한 실정이다. 잔류허용기준(Maximum residue limits; MRL)은 JECFA와 유럽의 경우 축산물에만 적용되어 0.2~1.0 mg/kg

*Correspondence to: Jung-Ah Do, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Chungcheongbuk-do 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4211, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: jado@korea.kr



(A) (B)

Fig. 1. Molecular structures of streptomycin (A) and dihydrostreptomycin (B).

범위로 설정하고 있으며, 미국은 농산물에만 적용되어 0.15~6.0 mg/kg으로 설정하고 있다. 일본에서는 축산물과 농산물을 포함하여 0.02~1.0 mg/kg의 MRL이 설정되어 있으며, 국내에서는 동물용의약품으로써 사용하는 스트렙토마이신에 대해서 불검출부터 1.0 mg/kg까지 설정되어 있고 농약으로써 사용하는 스트렙토마이신에 대해서는 기준이 신설될 예정이다[6-11].

현재 국내 식품공전 잔류동물용의약품시험법 8.3.22[12]에서는 SPE (Solid phase extraction) 카트리지를 이용한 정제 후 LC-FLD (Liquid chromatography-fluorescence detector)로 분석하는 방법이 두 성분의 동시정량시험법으로 제시되고 있다. 하지만 유도체화 방법을 이용하여 FLD로 분석하는 방법은 감도가 현격히 떨어져 최근에는 MS/MS (Tandem mass spectrometry)를 이용한 분석법이 추세[13-14]이며, 시험법 적용범위가 벌꿀과 우유에만 한정되어있어 국내 및 수입 농산물에서의 잔류성 시험에 적용될 수 없으므로 분석대상 품목을 확대 적용한 시험법의 개발이 필요하다. 또한 식품공전 잔류동물용의약품시험법 8.3.1[15]에는 두 화합물을 포함한 10종의 아미노글리코사이드계 항생제 동시분석법이 수록되어 있다. 분석법은 검체를 삼염화초산이 함유된 인산완충용액으로 추출한 후 SPE 카트리지를 이용하여 정제하고 LC-MS/MS로 분석한다는 점에서 효율적이지만 위와 같이 적용범위가 축산물에 제한되어 있고, 정량한계(Limit of quantitation)가 0.02 mg/kg으로 PLS (Positive list system) 제도에 맞는 잔류허용기준 수준을 만족할 수 없다. 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신 시험법에 관한 국외 연구로는 Bruijnsvoort 등[16]이 벌꿀과 우유 중의 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 연구 보고가 있으며, 벌꿀 중의 두 분석 물질을 인산완충용액을 이용하여 추출하고 LC-MS/MS로 분석한 연구가 있다[17]. 또한 Oliveira 등[18]과 Gremilogianni 등[19]은 LC-MS/MS를 이용하여 우유 중의 잔류량을 분석할 수 있는 시험법을 개발하였다. 하지만 이들의 연구는 벌꿀과 우유의 한정된 시료만 분석이 가능한 시험법이므로 곡류, 서류, 과일류 등에는 적용 가능하지 않은 시험법이다.

따라서 본 연구에서는 곡류(현미), 서류(감자), 두류(대두), 과일류(감귤), 채소류(고추)를 대상으로 한 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 동시 분석법을 개발하여 국내 농산물 중 농약의 잔류허용기준 신설 및 잔류농약 검사를 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 기구

Streptomycin sulfate (93.3%) 및 dihydrostreptomycin sesquisulfate (98.0%) 표준품은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 메탄올(Methanol) 및 아세토니트릴(Acetonitrile)은 Merck (Darmstadt, Germany)사에서 HPLC용을 구입하여 사용하였고, 염화나트륨(Sodium chloride)은 Wako (Osaka, Japan), 포름산(Formic acid)과 포름산암모늄(Ammonium formate)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HLB (Hydrophilic lipophilic balance) SPE 카트리지(6 cc, 500 mg)는 Waters (Milford, MA, USA)에서 구입하였고, 실린지 필터(Nylon, 0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma (Barcelona, Spain)로부터 구입하였다. 검체는 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류) 및 고추(채소류)를 대표 시료로 선택하고 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 폴리에틸렌 지퍼백에 담아 −50°C에 보관하고 실험에 사용하였다. 시료는 Tokyo Rikakikai Co. Ltd. (Tokyo, Japan)의 교반진탕기(Eyela MMV-1000W)를 사용하여 추출하였고, 추출액의 pH 조절시에는 Mettler-Toledo GmbH (Greifensee, Switzerland)사의 pH미터기(Seven Compact S220)를 사용하였으며 원심분리시에는 Thermo Fisher Scientific (Osterode am Harz, Germany)사의 냉장원심분리기(Heraeus Megafuge 16R Centrifuge)를 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

스트렙토마이신 및 디히드로스트렙토마이신 표준품은 황산염이 반응·결합된 것으로 순도를 고려하여 각각 13.4 mg과 12.8 mg을 10 mL의 증류수에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였으며, 이를 증류수로 희석하여 10 및 100 μg/mL의 표준용액을 조제하고 4°C에 보관하였다. 정량을 위한 matrix-matched 검량선은 10 μg/mL의 표준용액을 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 μg/mL으로 단계적으로 희석하고, 각각 40 μL에 농산물 시료 무처리 추출액 360 μL를 첨가하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하여 구하였다. Matrix-matched 표준용액은 실험시 즉시 만들어 사용하였으며, 아미노글리코사이드계 항생제는 유리 흡착성이 있으므로 실험에

사용된 모든 용기는 폴리프로필렌 재질을 사용하였다[20].

시료 전처리

검체를 분쇄하여 균질화한 후 5 g(곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 5 g, 서류, 과일류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄한 후 5 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류의 경우 증류수 5 mL, 두류의 경우 증류수 10 mL를 넣어 습윤화하고 방치하지 않음) 메탄올 20 mL를 가한 뒤 강하게 흔들고 포름산을 첨가하여 추출액의 pH를 3으로 조절하였다. 추출물에 염화나트륨 2 g을 추가하여 강하게 흔들고 15분간 진탕한 후, 4°C, 7,500 *G*에서 10분간 원심분리하여 상등액 전량을 취하고(두류의 경우 원심분리관을 4°C, 7,500 *G*에서 5분간 한 번 더 원심분리하여 상등액 전량을 취하고 앞의 상등액과 합함), 새 원심분리관에 취하여진 상등액은 메탄올을 이용하여 부피를 25 mL로 맞추었다. HLB SPE 카트리지에 메탄올 3 mL와 증류수 3 mL를 차례로 가하여 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버린 후 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정에서 얻은 용액 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출하여 받았으며, 고정상 상단이 노출되기 전에 메탄올 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출하여 앞서 받은 액과 합하였다. 정제된 용액은 최종 부피가 10 mL가 되게 한 뒤 Nylon 실린지 필터로 여과하여 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하였다.

Table 1. LC-MS/MS parameters for the analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin

Parameter	Condition		
Instrument	LC: Acquity UPLC MS/MS: Xevo TQ-S		
Column	XBridge® Amide (2.1 mm I.D × 100 mm, 3.5 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Column temp.	40°C		
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 150 mM Ammonium formate in water (pH 4.5 adjusted with formic acid)		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	95	5
	2.0	95	5
	6.0	0	100
	7.0	0	100
	7.1	95	5
	10.0	95	5
MS/MS condition			
Capillary	3.25 kV		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	500°C		
Desolvation gas flow	800 L/hr		
Cone gas flow	150 L/hr		

LC-MS/MS 분석 조건

스트렙토마이신과 디히드스트렙토마이신은 Waters (Milford, MA, USA)사의 액체크로마토그래프-질량분석기 (Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, Acquity UPLC-Xevo TQ-S)를 이용하여 분석하였다. 칼럼은 XBridge® Amide (2.1 mm I.D × 100 mm, 3.5 μm)를 선택하고, 이동상으로는 아세토니트릴과 포름산을 이용하여 pH를 4.5로 조절한 150 mM 포름산암모늄 함유 물을 선택하여 최적화된 기울기 용리 방식을 적용하여 대상성분을 분리하였다. 각 대상성분은 ESI (Electrospray ionization)법의 positive-ion mode로 최적의 정량이온과 정성이온을 선택한 후 cone voltage 및 collision energy 값을 선정하였다. LC-MS/MS 분석 조건은 Table 1과 같다.

시험법 유효성 검증

확립된 시험법의 선택성, 직선성, 기기상 검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한계(Limit of quantitation, LOQ), 시험법 정량한계, 정확성 및 재현성을 검증하였다. 선택성은 표준용액과 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하고, 직선성은 matrix-matched 표준용액을 분석하여 각 피크 면적으로 검량선을 작성하고 결정계수(Coefficients of determination, R^2)를 구하여 평가하였다. 또한 기기상 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 검출된 피크의 신호 대 잡음비(Signal-to-noise ratio, S/N)가 각각 3 이상과 10 이상을 나타내는 성분의 농도를 의미하며, 시험법 정량한계는 기기상 정량한계와 주입량, 시료량 및 분석과정 중의 희석배율을 이용하여 산출하였다. 시험법의 정확성 및 재현성은 5종의 농산물에 시험법 정량한계 수준과 정량한계 10배 및 50배의 수준에 해당하는 표준용액을 첨가한 후 분석하여 5반복 실험의 회수율 평균과 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)를 구하여 평가하였다.

Results and Discussion

추출 및 정제조건 확립

EURL-SRM (EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods)에서 제시한 "QuPPe (Quick, polar pesticide)-Method[21]"는 농산물 중 스트렙토마이신과 같은 극성이 큰 농약성분을 동시 분석하기 위하

여 포름산이 첨가된 메탄올을 이용하여 추출한 후 내부표준물질을 이용하여 LC-MS/MS로 분석하는 방법이다. 또한 농약 분석에 흔히 사용되고 있는 “QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe)” 분석법에 적용할 수 없는 성분들을 분석할 수 있는 대체방법으로 소개되고 있다. 본 연구 또한 농산물 시료에 함유된 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신을 추출하기 위해 사용한 용매는 메탄올이다. 극성이 큰 두 분석 물질은 시료의 입자 표면이나 내부에 존재하고, 시료 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 직접 사용할 경우 내부로의 침투가 어려워 충분한 추출 효율을 얻을 수 없다[22]. 따라서 검체 내부로의 침투성을 용이하게 하고자 수용성 유기용매이면서 다른 용매에 비하여 두 화합물의 용해도가 비교적 높은 메탄올을 추출용매로 선택하고 포름산을 첨가하여 pH를 3으로 조절해 두 화합물을 완전히 해리시켜 추출하였다. 또한 시료의 수분에 분포해 있는 분석 물질을 유기용매 쪽으로의 분배 효율을 높이기 위해서 염화나트륨을 첨가하여 이온강도를 증가시켰다[23].

분석하고자하는 대상성분이 비극성이면서 흡착 원리에 의한 머무름으로 불순물과의 분리를 하고자 할 때 일반적으로 플로리실(Florisil) 및 실리카(Silica) 카트리지가 사용된다. 하지만 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신은 매우 극성을 띠는 약염기성 화합물이며 분자가 pKa를 가지고 있기 때문에 이 경우에는 이온교환 카트리지를 사용하는 것이 정제 효율이 높다. HLB (Hydrophilic lipophilic balance) SPE 카트리지는 극성 물질을 머무르게 하는 원리를 가지고 있으며 넓은 pH 범위(pH 0~14)에서도 적용이 가능하다[24]. 본 연구에서는 두 대상 물질의 특성을 감안하여 HLB 카트리지를 선택한 결과, 앞서 확립한 추출 및 전처리 과정에서 두 성분은 우수한 회수율을 보였고 다양한 매트릭스 간섭물질로부터 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신을 효과적으로 정제할 수 있었다(Fig. 2).

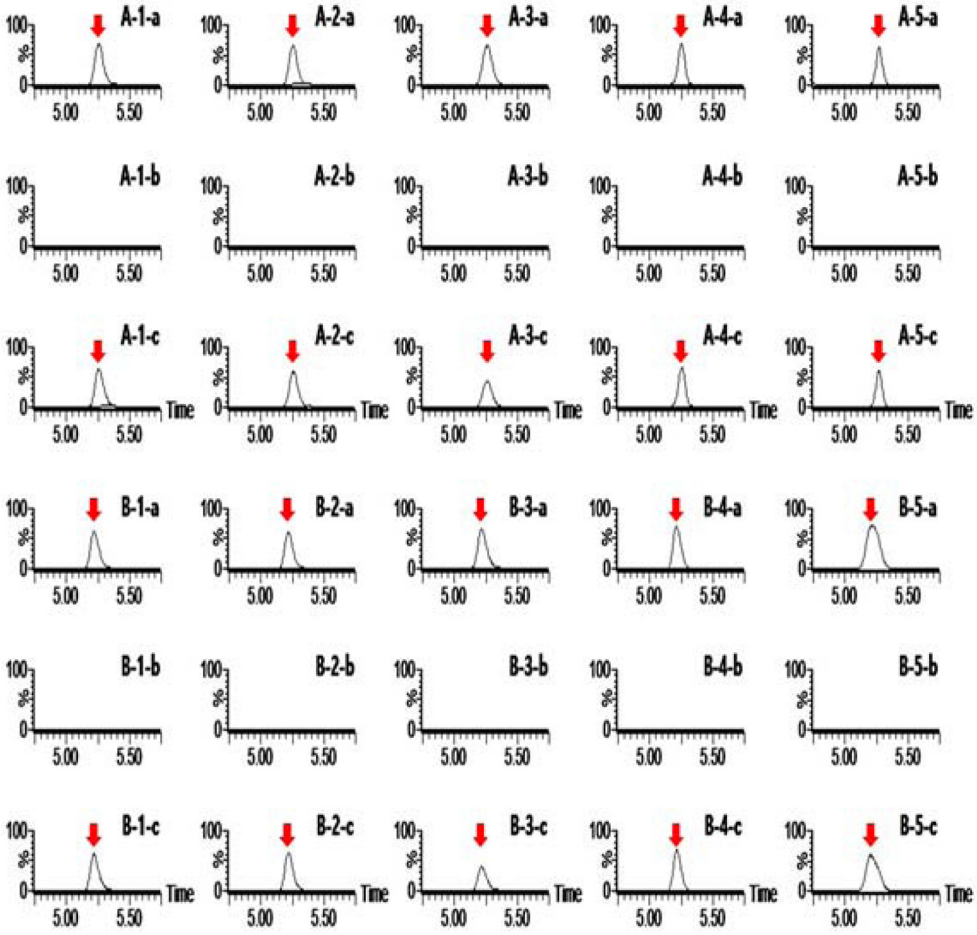


Fig. 2. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatogram (fortification concentration: 0.05 mg/kg) of (A) streptomycin (582.27 > 263.18) and (B) dihydrostreptomycin (584.29 > 263.18) in (1) hulled rice, (2) potato, (3) soybean, (4) mandarin and (5) green pepper at (a) matrix-matched standard, (b) control and (c) recovery.

Table 2. Molecular weight (MW), precursor and product ions, cone voltage (CV), collision energy (CE) and retention time (RT) of streptomycin and dihydrostreptomycin for analysis in ESI positive mode

Compounds	MW (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CV (V)	CE (eV)	RT (min)
Streptomycin	581.58	582.27	221.16 246.15 263.18[1)]	84	36 38 30	5.2
Dihydrostreptomycin	583.59	584.29	221.16 246.15 263.18[1)]	46	35 37 30	5.2

[1)]Quantification ion

기기분석조건 확립

스트렙토마이신 및 디히드로스트렙토마이신과 같은 극성이 큰 물질의 경우 잔류 분석에 흔히 사용하는 C_{18} 역상 칼럼을 사용하면 머무름이 전혀 없는 것으로 나타나 많은 연구논문에서는 HILIC (Hydrophilic interaction chromatography) 칼럼을 적용하거나 이온쌍시약이 함유된 이동상을 사용하고 있다. Jadhav 등[25)]의 연구에서는 스트렙토마이신 분석 시 피크 모양의 개선과 칼럼 내 물질의 머무름 향상을 위해 이온쌍시약인 PFBA (Perfluorobutyric acid)를 이동상에 첨가하였다. 하지만 이온쌍시약을 적용할 시에는 칼럼의 오염 또는 이온 억압의 문제가 발생한다[19)]. 본 연구에서는 극성 물질 분석에 적합한 HILIC 및 Amide 칼럼을 비교하였고, 결과 HILIC 칼럼 사용 시에는 머무름 시간이 짧아 간섭 물질과의 분리 목적에 적합하지 않았고 피크 tailing 현상이 있어 감도가 저하되는 것을 확인하였다. 따라서 머무름 시간을 증가시켜 간섭 물질과의 분리가 가능하고 피크를 개선할 수 있는 Amide 컬럼을 선택하였다. 이동상 용매로는 포름산암모늄이 함유된 증류수를 사용 시 피크의 대칭성을 확인하였고, 포름산암모늄의 농도가 150 mM까지 높아질수록 피크는 더욱 대칭성을 보였으며 감도도 향상되었다. 이러한 양상은 Kumer 등[26)]의 연구에서 아미노글리코사이드계인 젠타마이신 C_1을 LC-MS/MS로 분석할 때 이동상 중 염의 농도가 75 mM에서 175 mM까지 높아질수록 피크 모양과 감도가 향상되는 것을 알 수 있다. 또한 이동상 용매인 물에 포름산을 첨가하여 pH를 4.5로 조정하고, 분석 시 이동상의 기울기 용리 방식을 선택하여 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신이 머무르는 시간에 물 비율을 높게 주어 피크 broad 현상을 줄이는 방법으로 최적의 기기분석 조건을 확립하였다(Table 1).

각 대상성분의 표준용액을 칼럼을 통과시키지 않고 직접 질량분석기에 주입하여 ESI의 positive-ion mode에서 mass spectrum을 통해 최적의 생성이온(Product ion), 선구이온(Precursor ion), cone voltage 및 collision energy를 선정하였다. 첫번째로 각 성분의 생성이온을 확인하기 위하여 90~600 질량 대 전하비(*m/z*)의 범위로 MS scan을한 스펙트럼을 얻었다. 관측질량이 581.26인 스트렙토마이신은 질량이 $[M+H]^+$ 형태인 582.27 *m/z* 값을 확인하였고, 관측질량이 583.28인 디히드로스트렙토마이신은 질량이 $[M+H]^+$ 형태인 584.29 *m/z* 값을 확인하였다. 이 때 cone voltage의 변화(10~80 V)에 따른 최적화 과정을 통해 스트렙토마이신은 84 V, 디히드로스트렙토마이신은 46 V에서 최대의 피크 강도가 나타남을 확인하였다. 두번째로 각 성분의 생성이온을 확인하기 위해 최적화된 cone voltage 조건에서 90~600 *m/z*의 범위로 daughter scan을한 스펙트럼을 얻었다. 두 분석 물질 모두 이 때 가장 좋은 감도를 보이는 선구 이온 263.1 *m/z*을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 선구 이온 246.1, 221.1 *m/z*을 정성이온(qualification ion)으로 설정하였고 collision cell에서의 collision energy의 변화(5~50 eV)에 따른 정량이온의 세기는 30 eV에서 최대를 나타내었다. 질량분석기 최적의 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

시험법 유효성 검증

스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 선택성을 평가한 결과 검체 중 두 분석 물질의 머무름 시간과 질량대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않았으므로 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 5종의 농산물 무처리 추출액으로 희석한 표준용액 0.001~0.1 μg/mL의 농도로 matrix-matched 검량선의 결정계수를 확인한 결과 0.9906 이상으로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 기기상 검출한계와 정량한계는 각각 0.0005 mg/kg과 0.001 mg/kg으로 나타났고, 시험법 정량한계는 아래의 계산식에 의해 0.01 mg/kg으로 산출되었다. 이러한 결과는 PLS 도입에 따라 잔류허용기준이 정하여 있지 않은 농산물의 불검출 기준인 0.01 mg/kg 수준에 만족할 수 있는 감도이다.

시험법 정량한계(mg/kg)
= (최소검출량[1)](ng)/주입량(μL)) × (최종희석부피(mL)/시료량(g)) × 희석배수[2)]
= (0.005 ng/5 μL) × (25 mL/5 g) × 2 = 0.01 mg/kg

[1)]최소검출량 = 기기상의 정량한계(ng/μL) × 주입량(μL)
[2)]희석배수 = 희석부피(mL)/분취량(mL)

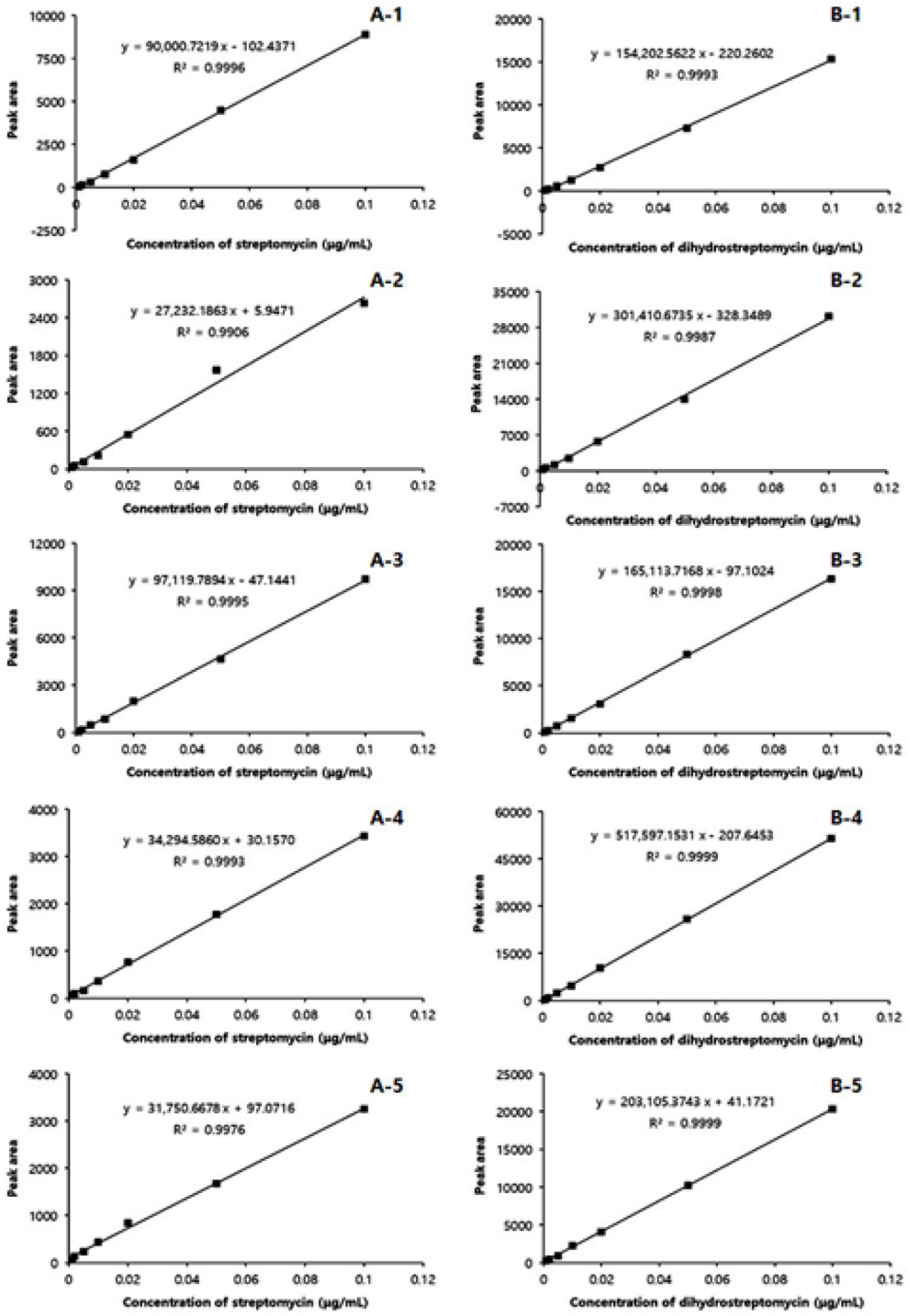


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of (A) streptomycin and (B) dihydrostreptomycin in (1) hulled rice, (2) potato, (3) soybean, (4) mandarin and (5) green pepper.

시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 5종의 농산물에 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수율 실험을 한 결과 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 평균 회수율은 각각 72.0~116.5%와 72.1~116.0%이었고, 상대표준편차는 각각 12.3%와 12.5% 이하로 조사되었다(Table 3, 4). 따라서 본 시험법은 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(CAC/GL 40-1993, 2003)[27] 및 식품의약품안전평가원의 식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)[28]에 따라 적합함을 확인할 수 있었다.

Table 3. Inter-laboratory validation results of analytical method for the detection of streptomycin residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1] (%)		Ave.[4] (%)	CV[5] (%)
		LAB1[2]	LAB2[3]		
Hulled rice	0.01	116.5 ± 1.3	78.9 ± 2.8	97.7	21.2
	0.1	96.3 ± 4.6	73.0 ± 3.5	84.7	15.7
	0.5	92.8 ± 2.5	73.6 ± 2.9	83.2	13.0
Potato	0.01	102.7 ± 9.0	90.6 ± 7.0	96.7	10.1
	0.1	93.4 ± 12.3	85.1 ± 4.1	89.3	10.5
	0.5	106.5 ± 10.9	83.9 ± 4.4	95.2	15.2
Soybean	0.01	78.5 ± 8.9	82.2 ± 1.5	80.4	7.5
	0.1	73.4 ± 2.1	77.8 ± 7.5	75.6	7.3
	0.5	72.0 ± 3.1	88.4 ± 2.6	80.2	11.6
Mandarin	0.01	100.0 ± 5.5	80.6 ± 4.1	90.3	12.7
	0.1	87.8 ± 8.2	77.8 ± 4.7	82.8	9.8
	0.5	94.7 ± 4.3	83.4 ± 6.9	89.1	9.0
Green pepper	0.01	86.2 ± 11.5	88.5 ± 10.0	87.4	11.1
	0.1	80.8 ± 4.9	80.8 ± 3.8	80.8	4.9
	0.5	85.4 ± 8.5	84.8 ± 5.2	85.1	7.4

[1]RSD: Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation
[2]LAB1: Ministry of Food and Drug Safety
[3]LAB2: Korea Advanced Food Research Institute
[4]Ave.: Recovery average of inter-laboratory
[5]CV: Coefficient of variation of inter-laboratory

Table 4. Inter-laboratory validation results of analytical method for the detection of dihydrostreptomycin residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1] (%)		Ave.[4] (%)	CV[5] (%)
		LAB1[2]	LAB2[3]		
Hulled rice	0.01	116.0 ± 2.3	86.3 ± 0.3	101.2	16.1
	0.1	91.7 ± 2.4	74.1 ± 2.3	82.9	11.9
	0.5	88.7 ± 5.4	80.3 ± 10.2	84.5	10.2
Potato	0.01	87.2 ± 6.8	76.6 ± 4.1	81.9	9.4
	0.1	107.2 ± 6.4	75.4 ± 2.8	91.3	19.7
	0.5	102.6 ± 12.5	77.4 ± 4.3	90.0	17.9
Soybean	0.01	96.1 ± 8.0	73.7 ± 2.1	84.9	15.7
	0.1	74.0 ± 1.5	88.4 ± 2.7	81.2	10.0
	0.5	72.1 ± 3.3	83.2 ± 2.0	77.7	8.4
Mandarin	0.01	79.5 ± 5.1	80.9 ± 1.1	80.2	4.2
	0.1	91.4 ± 3.2	71.6 ± 1.2	81.5	13.6
	0.5	90.1 ± 3.4	100.4 ± 1.7	95.3	6.4
Green pepper	0.01	106.2 ± 10.6	80.1 ± 2.2	93.2	17.0
	0.1	78.5 ± 6.7	75.3 ± 4.2	76.9	6.9
	0.5	85.8 ± 4.2	96.0 ± 1.6	90.9	6.9

[1]RSD: Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation
[2]LAB1: Ministry of Food and Drug Safety
[3]LAB2: Korea Advanced Food Research Institute
[4]Ave.: Recovery average of inter-laboratory
[5]CV: Coefficient of variation of inter-laboratory

실험실간 시험법 검증

시험법의 유효성을 확인하기 위해 외부기관인 한국식품과학연구원과 실험실간 검증을 수행하고자 개발한 시험법을 제공한 후 동일한 방법으로 분석을 수행하여 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 평균 회수율은 각

각 73.0~90.6%와 71.6~100.4%이었고, 상대표준편차는 각각 10.0%와 10.2% 이하로 조사되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 스트렙토마이신이 75.6~97.7%, 디히드로스트렙토마이신이 76.9~101.2%이며 변이계수(CV) 또한 각각 21.2%와 19.7% 이하로 모든 처리군에서 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)[27] 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)[28]에서 제시한 기준 처리농도 > 1 mg/kg와 ≤ 0.01 mg/kg의 45%, > 0.01 mg/kg와 ≤ 0.1 mg/kg의 32%보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Table 3, 4).

Acknowledgment

본 연구는 2018년도 식품의약품안전평가원 “2018년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(18161식품위013)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 2018년 국내식품 중 신규 기준설정 예정 농약인 스트렙토마이신의 잔류 농약 검사를 위한 공정시험법을 마련하기 위하여 수행하였다. 스트렙토마이신은 아미노글리코사이드계 항생제로 소, 돼지, 닭 등 가축 및 가금에 동물용의약품으로 허가되어 세균성 질병치료에 사용되고 있다. 또한 우리나라에서는 감귤, 매실, 참다래, 복숭아 등에 발병하는 세균성 병해를 방지하기 위하여 농약으로 등록되어 있다. 국내에서는 스트렙토마이신의 잔류물의 정의를 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 합으로 정하여 관리하고 있으며 잔류허용기준은 동물용의약품으로 사용 시 불검출부터 1.0 mg/kg까지 설정되어 있다. 농약으로 사용 시 농산물 중 잔류허용기준은 설정되어 있지 않으며 식품공전의 시험법 역시 동물용의약품에 적용되는 시험법으로 설정되어 있다. 이에 농산물 중 잔류허용기준 설정을 위한 시험법 마련이 시급하여 본 연구에서는 식품공전에서 정하고 있는 대표농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)을 포함한 잔류시험법을 개발하고자 하였다. 따라서 수용성 유기용매인 메탄올의 적용과 포름산을 이용한 pH 조절을 통한 추출법 및 HLB 카트리지를 이용한 정제법을 최적화하여 LC-MS/MS에 의한 분석법을 확립하였다. 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 시험법 정량한계는 0.01 mg/kg으로 PLS 제도에 맞는 잔류허용기준 수준을 만족하였다. 스트렙토마이신과 디히드로스트렙토마이신의 평균 회수율은 각각 72.0~116.5%와 72.1~116.0%이었고, 상대표준편차는 각각 12.3%와 12.5% 이하로 조사되어 이러한 결과는 국제식품규격위원회 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석기준 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 적합한 수준임을 검증하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물 중 스트렙토마이신의 잔류검사를 위한 공정시험법으로 활용할 수 있으며 유사 농산물에 대한 적용도 가능하리라 판단되어 향후 국내 농산물 중 농약의 잔류허용기준 신설 및 잔류농약 검사의 기초자료로 활용 가능할 것이다.

References

1. Korea Crop Protection Association (KCPA), Using guideline of crop protection agents. Available at http://www.koreacpa.org/korea/bbs/board.php?bo_table=3_3 (2018).
2. Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Streptomycin. Available at https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=5569295&cid=61233&categoryId=61233 (2018).
3. Encyclopedia of Life Science, Dihydrostreptomycin. Available at https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=425088&cid=60261&categoryId= 60261 (2014).
4. Chemicalize, Streptomycin. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (2018).
5. Chemicalize, Dihydrostreptomycin. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (2018).
6. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), MRLs in Veterinary drugs. Available at http://www.foodsafetykorea.go.kr/residue/vd/mrls/list.do?current PageNo=1&searchCode=&menuKey=2&subMenuKey=83&subChildMenuKey=&searchConsonantFlag=&searchConsonantFlag2=&searchValue2=&searchFlag=vd&searchClassLCode=&searchClassMCode=&searchClassScode=&searchValue=%EC%8A%A4%ED%8A%B8%EB%A0%99%ED%86%A0%EB%A7%88%EC%9D%B4%EC%8B%A0 (2018).
7. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), MRLs in Pesticide. Available at http://www.foodsafetykorea.go.kr/residue/prd/mrls/list.do?currentPageNo=1&searchCode=&searchFoodCode=&menuKey=1&subMenuKey=161&subChildMenuKey=&searchConsonantFlag=&searchConsonantFlag2=&searchValue2=&searchFlag=prd&searchClassLCode=&searchClassMCode=&searchClassScode=&searchValue=%EC%8A%A4%ED%8A%B8%EB%A0%99%ED%86%A0 (2018).
8. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Online Edition: “Residues of some veterinary drugs in foods and animals”. Available at http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs /details/en/c/41/ (2018).
9. The Japan Food Chemical Research Foundation, Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods. Available at https://db.ffcr.or.jp/front/ pesticide_detail?id=29800 (2018).
10. European Commission, EU Pesticides database. Available at http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/? event=pesticide.residue.Current MRL&language=EN (2018).

11. United States Environmental Protection Agency (US EPA), Regulation of Pesticide Residues on Food. Available at https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text- idx?SID=3dcd650aebb-04d701750379c98587a8a&mc=true&node=se40.26.180 _1245 &rgn=div8 (2018).
12. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code. pp. 1449-1452 (2018).
13. Shim Y. E., Myung S. W.: Analysis of streptomycin in honey by LC-MS/MS. *Anal. Sci. Technol.*, **21**, 424-431 (2008).
14. Do J. A., Lee M. Y., Cho Y. J., Chang M. I., Hong J. H., Oh J. H.: Determination of streptomycin in kiwifruit samples using LC-ESI-MS/MS. *Anal. Sci. Technol.*, **28**, 299-307 (2015).
15. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code. pp. 1377-1382 (2018).
16. Bruijnsvoort, M. van, Ottink, S. J. M., Jonker, K. M., Boer, E. de: Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1058**, 137-142 (2004).
17. Bohm, D. A., Stachel, C. S., Gowik, P.: Confirmatory method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam.*, **29**, 189-196 (2012).
18. Oliveira, R. C. de, Paschoal, J. A. R., Sismotto, M., Airoldi, F. P. da S., Reyes, F. G. R.: Development and validation of an LC-APCI-MS-MS analytical method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk. *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 756-761 (2009).
19. Gremilogianni, A. M., Megoulas, N. C., Koupparis, M. A.: Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk based on mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.*, **1217**, 6646-6651 (2010).
20. Kang Y. W., Joo H. J., Kim Y. S., Cho Y. J., Kim H. Y., Lee G. H., Kim M. H. Analysis and monitoring of residues of aminoglycoside antibiotics in livestock products. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 1-5 (2011).
21. EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM), Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPe-Method). Version 9.3. Available at http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe-PO_ EurlSRM.pdf (2017).
22. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Pesticide analytical residues manual in food code. pp. 13-14 (2013).
23. Ko A. Y., Abd El-Aty, A. M., Rahman, M. M., Jang J., Kim S. W., Choi J. H., Shim, J. H.: A modified QuEChERS method for simultaneous determination of flonicamid and its metabolites in paprika using tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, **157**, 413-420 (2014).
24. Millership, J. S., Hare, L. G., Farry, M., Collier, P. S., McElnay, J. C., Shields, M. D., Carson, D. J.: The use of hydrophilic lipophilic balanced (HLB) copolymer SPE cartridges for the extraction of diclofenac from small volume paediatric plasma samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 871-879 (2001).
25. Jadhav, M. R., Utture, S. C., Banerjee, K., Oulkar, D. P., Sabale, R., Ahammed, S. T. P.: Validation of a residue analysis method for streptomycin and tetracycline and their food safety evaluation in pomegranate (*Punica granatum L.*). *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 8491-8498 (2013).
26. Kumar, P., Rubies, A., Companyo, R., Centrich, F.: Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. *J. Sep. Sci.*, **35**, 498-504 (2011).
27. CODEX Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. CAC/GL 40-1993 (2003).
28. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines on standard procedures for preparing analysis method (2016).