pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 3, pp. 235~241 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.3.235

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

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Kasugamycin 시험법 개발

이한솔 · 도정아* · 박지수 · 조성민 · 신혜선 · 장동은 · 정용현 · 이강봉
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

Development of Analytical Method for Kasugamycin in Agricultural Products using LC-MS/MS

Han Sol Lee, Jung-Ah Do*, Ji-Su Park, Sung Min Cho, Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Yong-hyun Jung, 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
(Received March 15, 2019/Revised April 8, 2019/Accepted April 23, 2019)

ABSTRACT - An analytical method was developed for the determination of an antibiotic fungicide, kasugamycin, in agricultural products (hulled rice, potato, soybean, mandarin and green pepper) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples were extracted with methanol adjusted to pH 13 using 1 N sodium hydroxide, and purified with a HLB (hydrophilic lipophilic balance) cartridge. Linearity of a matrix-matched calibration curve using seven concentration levels, from 0.001 to 0.1 mg/kg, was excellent with a correlation coefficient (R^2) of more than 0.9998. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of instrument were 0.0005 and 0.001 μg/mL, respectively, and the LOQ of analytical method calculated as 0.01 mg/kg. The average recoveries at three spiking levels (LOQ, LOQ×10, LOQ×50, n=5) were in the range of 71.2~95.4% with relative standard deviation of less than 12.1%. The developed method was simple and all optimized results was satisfied with the criteria ranges requested in the Codex guidelines and Food Safety Evaluation Department guidelines. The present study could be served as a reference for the establishment of maximum residue limits (MRL) of kasugamycin and be used as basic data for safety management relative to kasugamycin residues in imported and domestic agricultural products.

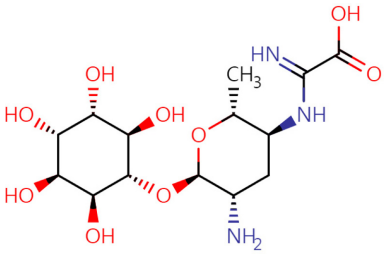
Key words : Kasugamycin, Antibiotic fungicide, Agricultural product, Analytical method, LC-MS/MS

가스가마이신(Kasugamycin)은 아미노글리코사이드계 항생물질로서 1965년 *Streptomyces*속 박테리아인 *Streptomyces kasugaensis*로부터 최초 분리되었다[1]. 가스가마이신은 단백질 합성과정 중 번역 개시 단계를 저해하여 균의 증식을 억제하는 작용기작을 가지고 있으며 특히 사상균인 *Piricularia oryzae*에 의해 발병하는 도열병을 예방하는 데 효과적이다[2-3]. 현재 국내에 가스가마이신을 유효성분으로 하여 등록된 농약은 총 14품목이며, 단제로 사용되거나 살균효과를 가진 다양한 유효성분과 합제로 사용되어 과수 및 채소의 무름병, 노균병 등을 방제하고 있다[4]. 가스가마이신(IUPAC name: 2-amino-2-[(2*R*,3*S*,5*S*,6*R*)-5-amino-2-methyl-6-[(2*R*,3*S*,5*S*,6*S*)-2,3,4, 5,6-pentahydroxycyclohexyl]oxyoxan-3-yl]iminoacetic acid)은 n-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 –5.75로 극성이 큰 염기성 화합물이며 분자 구조 및 물리·화학적 특성은 Table 1과 같다[5].

가스가마이신에 대한 국외 농산물 중 잔류허용기준(Maximum Residue Limits; MRL)은 미국과 일본, 캐나다 등에서 각각 0.04~0.6(호두 등 4품목), 0.04~0.2(벼 등 52품목), 0.04~3.0(배 등 45품목) mg/kg으로 설정되어 있으며, 잔류물의 정의는 미국의 경우 대사산물과 분해산물을 포함한 가스가마이신으로 하고 일본과 캐나다의 경우 대사산물을 제외한 가스가마이신 모화합물 만을 잔류물로 정하여 관리하고 있다. 현재 우리나라에는 농산물 중 가스가마이신의 잔류물의 정의가 설정되어 있지 않고 모화합물 만을 잔류물의 정의로 예정하고 있다. 또한 2019년 3월 현재 잔류허용기준이 설정된 농산물이 없기 때문에

*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

Table 1. Molecular structure and physicochemical characteristics of kasugamycin

Common name	Kasugamycin
Structure	
Formula	$C_{14}H_{25}N_3O_9$
Molecular weight	379.366 g/mol
Exact mass	379.159 g/mol
Melting point	203°C
Vapor pressure	$< 1.3 \times 10^{-4}$ mmHg (25°C)
Dissociation constants	pKa_1 = 3.23 (carboxylic acid) pKa_2 = 7.73 (cyclic primary amine) pKa_3 = 11.0 (secondary amine)
Solubility in water	1×10^6 mg/L (25°C)

모든 국내 재배 농산물 또는 수입 농산물 유통 시 실시하는 잔류농약 검사에서 농약 허용물질목록관리제도(Positive List System; PLS)에 의하여 잔류량이 0.01 mg/kg 이하가 되어야 한다[6-10].

현재 국내 식품공전 잔류동물용의약품시험법 8.3.1[11]에서는 가스가마이신과 같은 아미노글리코사이드계열인 겐타마이신(Gentamycin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 카나마이신(Kanamycin) 등 10종의 항생제 동시분석법이 수록되어 있다. 분석법은 검체를 산이 함유된 인산완충용액으로 추출하고 HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) 및 WCX (Weak Cation Exchange) SPE (Solid Phase Extraction) 카트리지로 정제한 후 LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 이용하게 규정되어 있다. 또한 구조상 아미노 그룹의 존재로 C_{18}과 같은 역상 칼럼에 머무름이 저하되는 문제를 해결하기 위하여 이동상에 이온쌍시약인 HFBA (Heptafluorobutyric acid)를 첨가한다. 하지만 위 분석법은 적용범위가 축산물에만 한정되어 있어 국내 및 수입 농산물에서의 잔류농약 검사에 활용될 수 없으므로 분석대상 품목을 농산물에 적용한 시험법의 개발이 필요하다.

농산물 중 가스가마이신 분석에 관한 국외 연구로는 Alechaga 등[3]이 토마토와 근대를 포함한 5종의 채소 중 가스가마이신과 스트렙토마이신을 LC-MS/MS를 이용하여 동시 분석한 연구 보고가 있다. 또한 Wang 등[12]은 사과와 오이, 상추 등에서, Zhang 등[13]은 현미, 옥수수 등에서 pH를 5.5로 조정한 물과 메탄올 혼합 용액으로 가스가마이신과 발리다마이신 에이(Validamycin-A)를 추출하고 SPE 카트리지를 이용하여 정제하는 시험법을 개발하였다. 이들의 연구는 0.01 mg/kg 이하의 정량한계 수준 및 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(CAC/GL 40-1993, 2003)[14]에 따른 회수율 결과 등에 대해서는 우수한 시험법이지만 식품의약품안전평가원의 식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)[15]에서 제시한 잔류농약 시험법의 검증 대상시료가 곡류와 서류, 두류, 과일류, 채소류 등 5종이므로 5종 모두에서 회수율을 만족하는 분석법이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 곡류(현미), 서류(감자), 두류(대두), 과일류(감귤), 채소류(고추)를 대상으로 한 가스가마이신의 분석법을 개발하여 국내 및 수입 농산물 유통 시 다양한 작물에서의 잔류허용기준 적부 판정을 할 수 있는 공정 시험법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 검체

가스가마이신(Kasugamycin hydrochloride, 98.2%) 표준품은 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하여 사용하였고, 메탄올(Methanol) 및 아세토니트릴(Acetonitrile)은 Merck (Darmstadt, Germany)사에서 HPLC용을 구입하여 사용하였다. 포름산(Formic acid)과 1 N 수산화나트륨(1 N Sodium hydroxide)은 Sigma-Aldrich로 부터 구입하였고 HLB SPE 카트리지(6 cc, 500 mg)는 Waters (Milford, MA, USA)에서 구입하였다. 검체는 식품의약품안전처에서 정한 대표농산물인 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류) 및 고추(채소류) 5종을 선택한 후, 모두 무농약 농산물을 구입하였다. 곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄하고 서류, 과일류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄하여 균질화한 후 폴리에틸렌 지퍼백에 담아 -50°C에서 냉동보관 하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액 조제

가스가마이신 표준품은 염산염이 반응·결합된 것으로 순도를 고려하여 22.32 mg을 20 mL의 증류수에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하고 이를 메탄올로 희석하여 100 μg/mL의 표준원액을 조제하였다. 검량선을 위한 표준용액은 100 μg/mL을 메탄올로 희석하여 10 μg/mL의 중간표준용액을 조제한 뒤 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 μg/mL으로 단계적으로 희석하였다. 정량을 위한 matrix-matched 검량선은 메탄올에 용해된 7 point 각각의 표준용액 100 μL에 농산물 검체 무처리 추출액 900 μL를 첨가하여 90% 이상의 matrix를 포함하도록 하였다. 또한 정량한계 수준의 회수율 시료를 정량할 시에는 0.005 μg/mL의 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액으로 희석하여 검량선에 포함하였다. 표준용액은 실험 시 즉시 만들어 사용하였으며, 표준원액과 표준용액은 4°C에 보관하여 실험

에 사용하였다. 또한 아미노글리코사이드계 항생제는 유리 흡착성이 있으므로 실험에 사용된 모든 용기는 폴리프로필렌 재질을 사용하였다[16].

시료 전처리

균질화된 각각의 검체 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고 메탄올 20 mL(곡류 및 두류의 경우 25 mL)를 가하여 강하게 흔든 후 1 N 수산화나트륨 용액을 이용하여 추출용액의 pH를 13으로 조절하였다. 추출액의 pH를 조절한 뒤 강하게 흔들고 교반진탕기(Eyela MMV-1000W, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 10분간 진탕하였다. 시료는 원심분리기(Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany)를 사용하여 4°C, 7,000×*G*에서 10분간 원심분리하고 상등액 전량을 취한 후 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 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정에서 얻은 용액 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출하여 받았다. 이어서 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 실린지 필터(Nylon, 0.2 μm × 13 mm, Teknokroma, Barcelona, Spain)로 여과하고 2 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 최적화된 기기 조건에 따라 분석하였다.

기기분석 조건

가스가마이신을 분석하기 위하여 Shimadzu (Kyoto, Japan) 사의 액체크로마토그래프(Nexera X2 UPLC)와 질량분석기(LCMS-8060)를 이용하였다. 칼럼은 XBridge Amide(2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3.5 μm)를 선택하고, 이동상은 0.1% formic acid가 함유된 아세토니트릴과 0.1% formic acid가 함유된 증류수를 사용하여 최적화된 기울기 용리 방식으로 대상 성분을 분리하였고, 정량 분석을 위해 LC-MS/MS의 ESI (Electro-Spray Ionization) positive mode로 최적의 정량이온과 정성이온을 선택한 후 collision energy 값을 선정하였다.

시험법 유효성 검증

확립된 가스가마이신 시험법의 선택성(Selectivity), 직선성(Linearity), 기기상 검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한계(Limit of quantification, LOQ), 시험법 정량한계, 정확성(Accuracy) 및 반복성(Repeatability)을 검증하였다. 시험법의 선택성은 표준용액을 첨가한 회수율 시료와 현미, 감자, 대두, 감귤, 고추 5종의 무처리 시료 크로마토그램을 서로 비교함으로써 평가하였고, 직선성은 7 point의 matrix-matched 표준용액을 분석하여 얻어진 각 피크 면적으로 검량선을 작성하고 결정계수(Correlation 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 최소 검출농도와 분석과정 중의 희석배율을 이용하여 산출하였다. 시험법의 정확성 및 반복성은 5종의 농산물에 시험법 정량한계 수준과 정량한계 10배 및 50배의 수준에 해당하는 표준용액 200 μL를 첨가한 후 분석하여 5반복 실험의 회수율(Recovery) 평균과 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)를 구하여 평가하였다.

Results and Discussion

추출 및 정제 과정 확립

가스가마이신은 Log P_{ow} 값이 -5.75로 극성을 띄는 화합물이며 물 또는 메탄올에 용해도가 높다. 농약 성분은 검체 입자 표면이나 내부에 존재하고, 검체 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 직접 사용할 경우 검체 내부로의 침투성이 낮아 충분한 추출 효율을 얻을 수 없다[17]. 따라서 검체 내부로의 침투성을 용이하게 하고자 수용성 유기용매이면서 용해도가 비교적 높은 메탄올을 추출용매로 선택하여 가스가마이신의 추출 효율을 확인하였다. 먼저 감귤 시료 5 g에 메탄올 20 mL를 가하여 pH를 측정한 후 각 시험구에 포름산 및 수산화나트륨 용액을 첨가하여 추출 용액의 pH를 조절하였다. pH를 조절한 후 10분간 진탕 및 원심분리(7,000×*g*, 10 min)하여 상등액 전량을 취한 뒤 메탄올을 이용하여 부피를 25 mL로 맞추고 분석하였다. 각 시험구의 회수율을 비교 검토한 결과 pH 2에서 평균 회수율은 77.9%, pH 13에서 평균 회수율은 74.4%를 나타내었다(Fig. 1). 가스가마이신은 넓은 pH 범위에서 이온화되어 있으며[18] 유기용매로 인한 추출효율을 높이기 위해서는 이온 억압 조건을 성

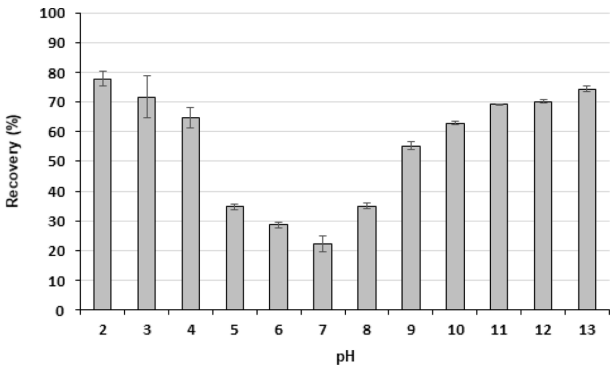


Fig. 1. Extraction efficiency of kasugamycin depending on pH in mandarin matrix.

Table 2. Recovery results of kasugamycin with HLB cartridge in four fraction of methanol

Elution solvent	Fraction	Recovery ± RSD[1)](%)
Methanol	1(Loading 5 mL)	59.8 ± 1.2
	2	39.6 ± 0.5
	3	1.9 ± 0.6
	4	ND
Total		101.2 ± 1.3

[1)]Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

립하여야 한다. 따라서 상대적으로 이온이 억압되는 pH를 찾기 위하여 pH를 조절하였으며 본 시험법에서는 회수율 표준편차 및 기기상 감도를 고려하여 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 13으로 조절한 후 화합물을 추출하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

일반적으로 잔류농약분석 정제 시 사용하는 카트리지는 플로리실(Florisil)이나 실리카(Silica) 카트리지이나, 추출 용액의 높은 pH와 수산화나트륨 용액의 첨가로 인해 유기용매와 수용액이 혼합된 점을 감안하여 높은 pH 범위에서도 안정적이며 친수성과 습윤성의 특성을 갖는 흡착제의 카트리지를 사용하는 것이 정제효율이 높다고 판단되었다. 따라서 상기의 조건을 만족하는 HLB 카트리지를 이용하여 가스가마이신의 용출 특성을 확인하였다. 먼저 메탄올 3 mL와 증류수 3 mL로 미리 활성화된 카트리지에 메탄올에 용해된 0.1 ppm 표준용액 5 mL를 가하여 유출시켜 받고, 고정상 상단이 노출되기 전에 메탄올 5 mL 씩 3개의 분획을 받아 분석하였다. 각 분획의 회수율을 비교 검토한 결과 분획1과 2에서 받은 용출액의 회수율 합이 약 100%로 우수한 결과를 보였다(Table 2). 따라서 본 시험법에서는 HLB 카트리지를 이용하여 다양한 매트릭스 간섭물질로부터 가스가마이신을 효과적으로 정제할 수 있었다.

LC-MS/MS 분석조건 확립

아미노글리코사이드계 항생물질은 흔히 유도체화 후 형광검출기를 이용한 액체크로마토그래프 형광검출기(Fluorescence detector, FLD)분석법이 많이 이용되었다. 그러나 시험법이 오래 걸리고 복잡한 단점이 있어 비교적 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 PLS 제도 도입에 따른 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보 할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기를 분석기기로 선정하였다. 또한 아미노글리코사이드계 농약의 경우 극성이 크기 때문에 잔류분석에 많이 사용되는 C_{18} 칼럼으로 분석을 하면 칼럼 내 머무름이 저하되는 것으로 알려져 있다[19]. 따라서 극성물질 분석에 흔히 사용하는 amide 컬럼을 선택하였고, 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 증류수를 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 가스가마이신 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 대상성분의 이온화법으로는 ESI법의 positive-ion mode를 사용하였고 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 최적 기기분석 확립 조건은 Table 3과 같다.

관측질량이 379.16 g/mol인 가스가마이신 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 $[M+H]^+$형태인 380.20 *m/z* 값을 확인하였다. 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였으며, collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온

Table 3. LC-MS/MS analytical conditions for the determination of kasugamycin

Condition	Content		
Instrument	LC: Nexera X2 UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) MS/MS: LCMS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan)		
Chromatographic separation			
Column	XBridge Amide (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3.5 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	2 μL		
Column temp.	40°C		
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in water B: 0.1% Formic acid in acetonitrile		
Gradient	Time (min)	A (%)	B(%)
	0.0	10	90
	2.0	10	90
	2.1	30	70
	7.0	90	10
	7.5	90	10
	8.0	10	90
	10.0	10	90
MS/MS parameters			
Interface temp.	300°C		
Heating block temp.	400°C		
Desolvation line temp.	250°C		
Heating gas flow	10.0 L/min		
Nebulizer gas flow	3.0 L/min		

Table 4. Exact mass, precursor and product ions, collision energy and retention time of kasugamycin for analysis in ESI positive mode

Compounds	Exact mass (g/M)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1] (eV)	RT[2] (min)
Kasugamycin	379.16	380.20	112.10[3]	21	3.7
			156.20	14	
			200.10	15	

[1]CE: Collision energy
[2]RT: Retention time
[3]Quantitation ion.

Table 5. Matrix effect, recoveries, and LOQ for the detection of kasugamycin residues in agricultural samples

Sample	Matrix effect[1] (%)	Recovery ± RSD[2] (%)			LOQ (mg/kg)
		LOQ	LOQ×10	LOQ×50	
Hulled rice	-15.4	81.0 ± 4.7	95.4 ± 1.9	94.2 ± 0.4	0.01
Potato	-21.8	90.8 ± 5.3	84.9 ± 2.5	82.1 ± 3.0	
Soybean	-28.1	90.6 ± 8.3	88.5 ± 1.1	86.3 ± 2.6	
Mandarin	-24.0	75.5 ± 4.4	74.9 ± 1.8	74.0 ± 2.1	
Green pepper	-27.2	94.0 ± 12.1	72.3 ± 0.8	71.2 ± 1.0	

[1]Matrix effect(%)={(Peak area of standard in matrix-peak area of standard in solvent)/peak area of standard in solvent}×100
[2]Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation.

(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다. 100~400 *m/z*의 범위로 daughter scan을 수행한 결과, 가장 좋은 감도를 보이는 선구 이온 112.10 *m/z*을 정량이온으로, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 선구 이온 156.20, 200.10 *m/z*을 정성이온으로 설정하였고 collision cell에서의 5~50 eV의 collision energy 변화에 따른 정량이온의 세기는 21 eV에서 최대를 나타내었다. 질량분석기 최적의 분석조건은 Table 4에 나타내었다.

시험법 유효성 검증

시험법의 선택성을 평가한 결과 5종의 농산물 무처리 시료 중 가스가마이신의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않아 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2). “Matrix effect”는 LC-MS/MS 분석 시 검체의 추출성분에 의한 간섭 현상으로 이온 억압 또는 증강 현상을 초래한다. 대상 성분인 가스가마이신의 matrix effect를 조사한 결과 5종의 작물에서 -15.4~-28.1%의 이온 억압 현상을 나타내었다(Table 5). 따라서 정량을 위한 검량선은 5종의 농산물 무처리 추출액으로 희석한 표준용액 0.001~0.1 mg/kg의 농도로 작성하였으며 matrix-matched 검량선의 결정계수는 0.9998 이상으로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 기기상 검출한계와 정량한계는 각각 0.0005 μg/mL과 0.001 μg/mL으로 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.

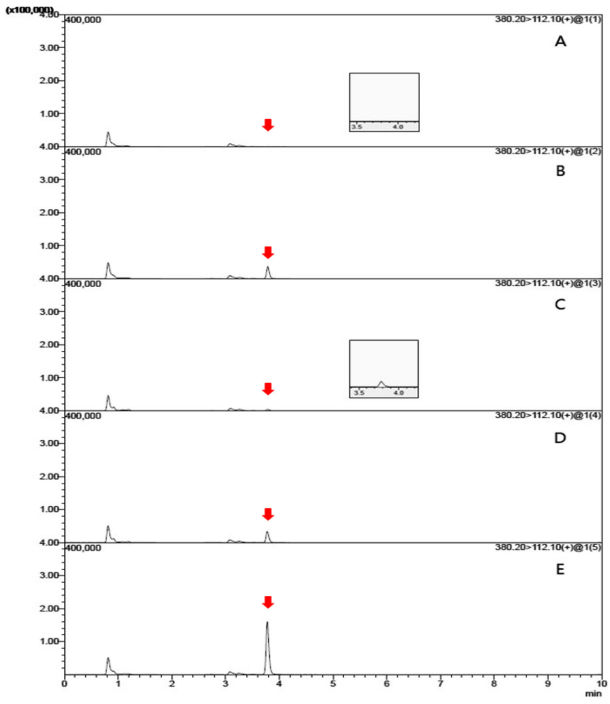


Fig. 2. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms (fortification concentration: 0.1 μg/mL) of kasugamycin in (A) hulled rice control, (B) matrix-matched standard solution at 0.1 mg/kg, (C) spiked at 0.01 mg/kg, (D) spiked at 0.1 mg/kg, and (E) spiked at 0.5 mg/kg.

시험법 정량한계 (mg/kg)
= 최소검출농도 (μg/mL) × 희석배수*

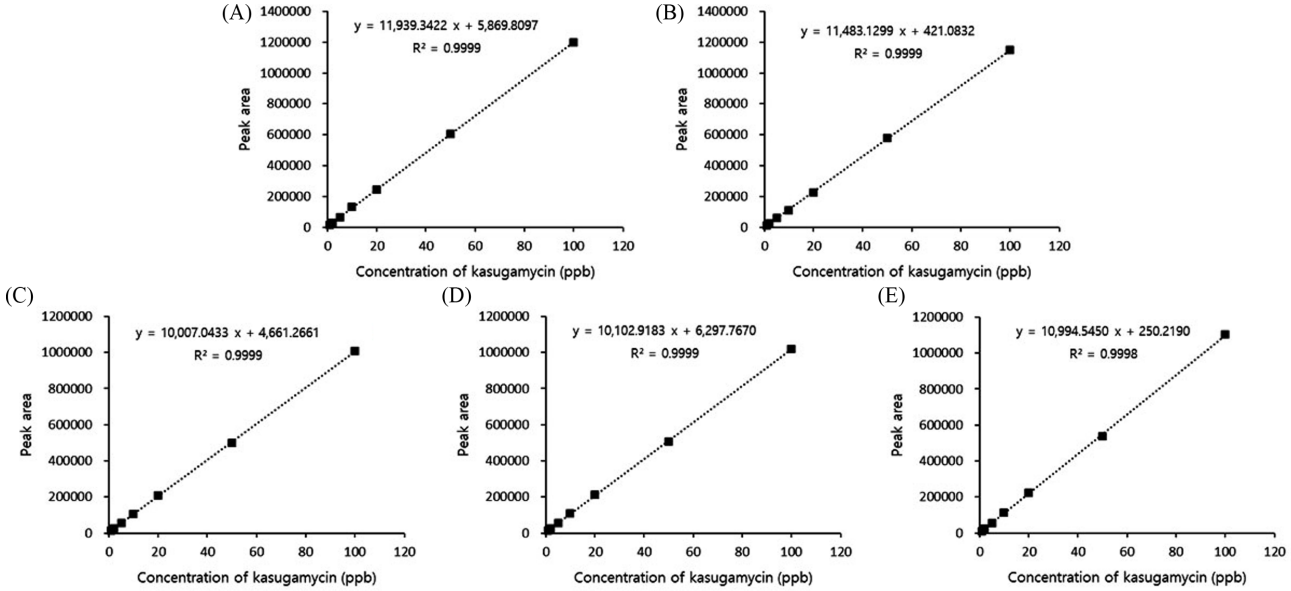


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of kasugamycin in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin, and (E) green pepper.

= 0.001 μg/mL × (25 mL/5 g × 10 mL/5 mL) = 0.01 mg/kg

*희석배수 = 추출용매량 (mL)/시료량 (g) × 희석부피 (mL)/분취량 (mL)

시험법의 정확성 및 반복성을 평가하기 위하여 5종의 농산물에 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수율 실험을 한 결과 평균 회수율은 71.2~95.4%이었고, 상대표준편차는 12.1% 이하로 조사되었다(Table 5). 따라서 본 시험법은 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(CAC/GL 40-1993, 2003)[14] 및 식품의약품안전평가원의 식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)[15]에서 제시한 기준 처리농도 >1 μg/kg와 ≤10 μg/kg의 60~120%, >10 μg/kg와 ≤100 μg/kg의 70~120%, >100 μg/kg와 ≤1000 μg/kg의 70~110% 회수율 범위에 적합함을 확인할 수 있었다.

Acknowledgment

본 연구는 2019년도 식품의약품안전평가원 “2019년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(19161식위생020)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 농산물 중 잔류허용기준 신설 예정 농약인 가스가마이신의 안전 관리를 위한 공정 시험법을 개발하기 위하여 수행되었다. 가스가마이신은 단백질 합성과정 중 번역 개시 단계를 저해하여 균의 증식을 억제하는 작용기작을 가지고 있으며 특히 사상균인 *Piricularia oryzae*에 의해 발병하는 도열병을 예방하는 데 효과적이다. 현재 우리나라에는 농산물 중 가스가마이신의 잔류물의 정의가 설정되어 있지 않고 모화합물 만을 잔류물의 정의로 예정하고 있다. 또한 잔류허용기준이 설정된 농산물이 없기 때문에 모든 국내 재배 농산물 또는 수입 농산물 유통 시 실시하는 잔류농약 검사에서 농약 허용물질목록관리제도(Positive List System; PLS)에 의하여 잔류량이 0.01 mg/kg 이하가 되어야 한다. 이에 농산물 중 잔류농약 분석 및 검사를 위한 공정 시험법 마련이 시급하여 본 연구에서는 대표농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)을 대상으로 시험법을 개발하고자 하였다. 따라서 수용성 유기용매인 메탄올의 적용과 수산화나트륨을 이용한 pH 조절을 통한 추출법 및 HLB 카트리지를 이용한 정제법을 최적화하여 LC-MS/MS에 의한 분석법을 확립하였다. 가스가마이신의 시험법 정량한계는 0.01 mg/kg이며 5종의 농산물에 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 회수율 실험을 한 결과 평균 회수율은 71.2~95.4%이었고, 상대표준편차는 12.1% 이하로 조사되었다. 이러한 검증 결과는 국제식품규격위원회 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 적합한 수준임을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 국내 및 수입 농산물 중 가스가마이신의 안전 관리를 위한 공정시험법으로 활용될 수 있으며 잔류물의 정의 및 잔류허용기준을 설정하는 데 기초자료로써 활용 가능할 것이다.

References

1. Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M., Takeuchi, T.: A new antibiotic kasugamycin. *J. Antibiot. Ser. A*, **18**, 101-104 (1965).
2. Wikipedia, Kasugamycin. Available at https://en.wikipedia.org/wiki/Kasugamycin (2019) (Accessed 18 April 2019).
3. Alechaga, E., Moyano, E., Galceran, M.T.: Simultaneous analysis of kasugamycin and streptomycin in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*, **7**, 3600-3607 (2015).
4. Rural Development Administration (RDA), Pesticide registration status. Available at http://www.nongsaro.go.kr/portal/ps/psa/psab/psaba/openApiAgchmRegistInfoLst.ps?sAgPrdlstNm=%EA%B0%80%EC%8A%A4%EA%B0%80%EB%A7%88%EC%9D%B4%EC%8B%A0&sAgPrpos=&sAgBrandNm=&sAgCropsYn1=Y&sAgCropsNm1=&sAgCropsYn2=Y&sAgCropsNm2=&sAgDbyhsYn=Y&sAgApplcDbyhs=&menuId=PS00116&pageIndex=1&pestiCode=&diseaseUseSeq=&sDcsnAt=Y (2019) (Accessed 18 April 2019).
5. Pubchem, Kasugamycin. Available at https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/kasugamycin#section=Top (2019) (Accessed 18 April 2019).
6. United States Environmental Protection Agency (US EPA), Regulation of Pesticide Residues on Food. Available at https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=40ea4c2379e88c6bb1c09d58b46d0099&mc=true&node=se40.26.180_1614&rgn=div8 (2019) (Accessed 18 April 2019).
7. 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=15600 (2019) (Accessed 18 April 2019).
8. Health Canada, Maximum Residue Limits for Pesticides. Available at http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/mrl-lrm/results-eng.php (2019) (Accessed 18 April 2019).
9. Government of Canada, Residue definitions for chemicals with maximum residue limits regulated under the pest control products act. Available at https://www.canada.ca/en/health-canada/services/consumer-product-safety/pesticides-pest-management/public/protecting-your-health-environment/pesticides-food/residue-definitions-chemicals-maximum-residue-limits-regulated-under-pest-control-products-act.html (2019) (Accessed 18 April 2019).
10. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Pesticide information. Available at https://www.foodsafetykorea.go.kr/residue/prd/info/list.do?currentPageNo=1&searchCode=&menuKey=1&subMenuKey=9&subChildMenuKey=&searchConsonantFlag=&searchFlag=prd&searchValue2=&searchConsonantFlag2=&excelSave=&excelSaveInput=&etcFlag=&searchValue=kasugamycin (2019) (Accessed 18 April 2019).
11. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code. pp. 1377-1382 (2018).
12. Wang, C., Li, H., Wang, N., Li, H., Fang, L., Dong, Z., Du, H., Guan, S., Zhu, Q., Chen, Z., Yang, G.: Simultaneous analysis of kasugamycin and validamycin-A in fruits and vegetables using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and consecutive solid-phase extraction. *Anal. Methods*, **9**, 634-642 (2017).
13. Zhang, H., Wang, C., Li, H., Nie, Y., Fang, L., Chen, Z.: Simultaneous determination of kasugamycin and validamycin-A residues in cereals by consecutive solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A*, **35**, 487-497 (2018).
14. CODEX Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. CAC/GL 40-1993 (2003).
15. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines on standard procedures for preparing analysis method (2016).
16. 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).
17. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Pesticide analytical residues manual in food code. pp. 13-14 (2013).
18. Chemicalize, kasugamycin. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (2019) (Accessed 19 June 2019).
19. Houda, B., Juan, C. M., Jordi, M., Guillermina, F.: Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. *J. Sep. Sci.*, **33**, 1-8 (2010).