

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살균제 Validamycin A의 시험법 개발

박지수 · 도정아* · 이한솔 · 박신민 · 조성민 · 신혜선 · 장동은 · 조명식¹ · 정용현 · 이강봉

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, ¹광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Development of Analytical Method for Detection of Fungicide Validamycin A Residues in Agricultural Products Using LC-MS/MS

Ji-Su Park, Jung-Ah Do*, Han Sol Lee, Shin-min Park, Sung Min Cho,

Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Myong-Shik Cho¹, 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

(Received November 15, 2018/Revised December 24, 2018/Accepted December 25, 2018)

ABSTRACT - Validamycin A is an aminoglycoside fungicide produced by *Streptomyces hygroscopicus* that inhibits trehalase. The purpose of this study was to develop a method for detecting validamycin A in agricultural samples to establish MRL values for use in Korea. The validamycin A residues in samples were extracted using methanol/water (50/50, v/v) and purified with a hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridges. The analyte was quantified and confirmed by liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) in positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). Matrix-matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.005~0.5 ng) into a blank extract with $R^2 > 0.99$. The limits of detection and quantification were 0.005 and 0.01 mg/kg, respectively. For validation validamycin A, recovery studies were carried out three different concentration levels (LOQ, LOQ × 10, LOQ × 50, $n = 5$) with five replicates at each level. The average recovery range was from 72.5~118.3%, with relative standard deviation (RSD) less than 10.3%. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL 40-1993, 2003) and the NIFDS (National Institute of Food and Drug Safety) guideline (2016). Therefore, the proposed analytical method is accurate, effective and sensitive for validamycin A determination in agricultural commodities.

Key words : Validamycin A, LC-MS/MS, Antibiotics, Analytical method, Aminoglycoside

발리다마이신 에이(Validamycin A)는 1972년 Takeda chemical industries사에서 개발한 Aminoglycoside계 항생제로 *Streptomyces hygroscopicus*에 의하여 생성되며 이탄당인 균당을 2개의 포도당으로 분해하는 trehalase의 작용을 저해하여 균 증식을 억제한다. 발리다마이신은 A~H로 구성되어 있으며 그 중 가장 활성이 강한 것은 A이다(Fig. 1)¹⁾. 발리다마이신 에이는 벼의 도열병 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 합성농약과 다르게 환경에 무해하며 침투성이 높고 선택성이 우수하여 널리 사용되고 있다²⁾. 우리나라에서는 벼, 고추, 복숭아, 마늘, 양파, 참다

래 등에 세균성 병해를 방제하기 위해 농약으로 등록되어 있으며³⁾ 잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)은 2019년 신설될 예정이다. 일본에서는 잔류허용기준이 감자 등 43품목에서 0.05-0.06 mg/kg으로 설정되어 있고 유럽의 경우 불검출 기준인 0.01 mg/kg으로 일률 기준을 적용하고 있다. 미국의 경우 zero tolerance를 적용하고 있고 Codex에서는 기준이 설정되어 있지 않다⁴⁻⁶⁾. 잔류물의 정의는 농산물의 경우 일본에서는 발리다마이신 에이로 규정하였으며 국내에서도 발리다마이신 에이로 규정하여 관리할 예정이다.

발리다마이신 에이의 농산물 중 잔류시험법에 관한 선행연구로는 Chuanxian⁷⁾등이 쌀, 버섯, 아몬드, 배추, 토마토, 시금치 등의 시료에서 메탄올/물 혼합액을 이용하여 추출 후 HLB (hydrophilic-lipophilic balance) 카트리지를 이용하여 정제하고 LC-MS/MS로 분석한 연구가 보고되었으며, Chenchen⁸⁾등은 사과, 오이, 가지, 상추, 및 양배추에

*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: 82-43-719-4206
E-mail: jado@korea.kr

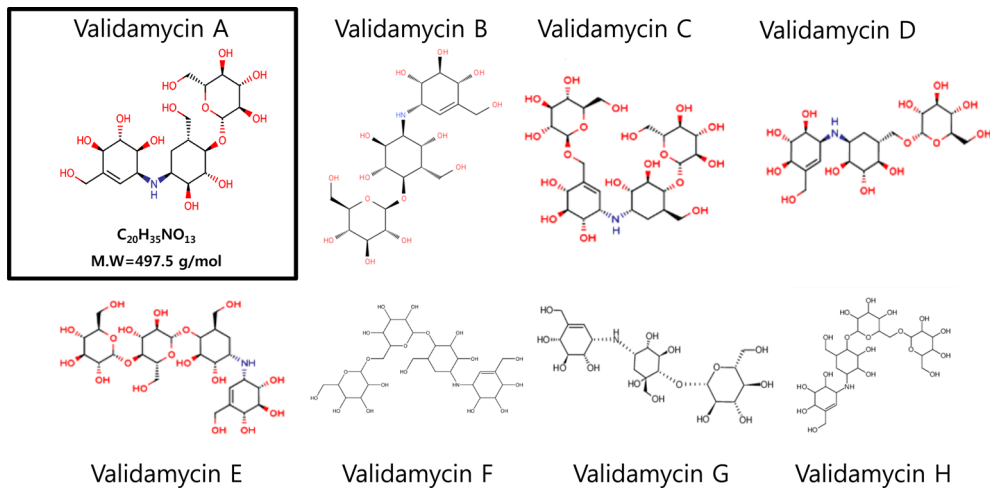


Fig. 1. Structures of validamycin A to H.

서 HLB 및 SCX (Strong cation exchange) 카트리지를 이용하여 정제하는 분석법을 보고하였다. 또한 Na^9 등은 벗집 및 현미, 쌀겨의 시료에 메탄올/물 혼합액을 가하여 추출 후 추출액에 흡착제를 넣어주어 간섭물질들을 흡착하여 제거하는 분석법인 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 방법을 이용하였다¹⁰. 흡착제로는 C_{18} , GCB (graphitized carbon black) 및 PSA (primary secondary amine)을 첨가하여 간섭물질을 제거하였으며 회수율은 77.7~94.3%로 우수하였다. 국내 연구의 경우 Han²이 파프리카, 브로콜리, 배추, 쌀 등에서 물을 가하여 추출하였으며, WCX (weak cation exchange)를 이용하여 정제한 방법이 보고되어 있으나 발리다마이신 에이에 대한 선행연구가 많지 않은 편이다. 한편, Cho¹¹ 등과 Kang¹² 등은 축산 식품 시료에서 aminoglycoside계 항생제에 대하여 10 mM phosphate buffer를 이용하여 추출 후 HLB 및 WCX 카트리지를 이용하여 정제하는 분석법이 보고되었지만 적용 범위가 축산물 시료에 한정되어져 있다. 따라서 본 연구에서는 국내 농산물 중 잔류허용기준 신설에 따라 식품공전상 대표 농산물로 분류하고 있는 곡류(현미), 서류(감자), 두류(대두), 과일류(감귤), 채소류(고추)에 적용하여 발리다마이신 에이의 적부관정을 위한 공정시험법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

발리다마이신 에이(95.0%) 표준품은 Wako (Osaka, Japan)사에서 구입하여 사용하였고, 아세토니트릴 (ACN), 메탄올 (MeOH) 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 또한, 고상추출 (solid phase extraction, SPE) 카트리지 (cartridge)는 hydrophilic-

lipophilic balance (HLB, 1 g, 6 cc)로 Waters (Milford, MA, USA)에서 구입하여, 활성화 과정을 거쳐 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였고 아세트산암모늄 (Ammonium acetate)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Syringe filter (PVDF, $0.2 \mu m \times 13 mm$)는 Teknokroma (SantCugat Del Valles, Barcelona, Spain)에서 구입하여 사용하였다. 시료는 교반진탕장비 (MMV-1000W, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 추출하였다. 시료는 식품공전상 대표농산물 5종인 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 $-50^\circ C$ 에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

발리다마이신 에이 표준품을 메탄올 용해하여 1,000 $\mu g/mL$ 의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 농산물 시료의 무처리 추출물 900 μL 에 10 $\mu g/mL$ 표준용액 100 μL 를 넣어 1 $\mu g/mL$ 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 발리다마이신 에이는 유리에 서서히 흡착할 가능성이 있는 물질로 모든 시험과정은 폴리프로필렌으로 된 용기에 담아 $4^\circ C$ 에 보관하여 실험에 사용하였다¹².

추출 및 정제

본 실험에 앞서 과일류, 서류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄하고, 곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm 를 통과하도록 분쇄하였다. 시료 5 g을 폴리프로필렌 재질의 용기에 정밀히 달아 메탄올/물(50/50, v/v) 10 mL 가한 후 진탕기에서 10 분간 진탕하였다. $4^\circ C$, 5,000 G에서 10

Table 1. LC-MS/MS parameters for the analysis of validamycin A

Parameter	Condition				
Instrument	LC: Acquity UPLC MS/MS: Xevo TQ-S				
Column	XBridge® Amide (2.1 × 150 mm, I.D., 3.5 μm)				
Flow rate	0.2 mL/min				
Injection volume	5 μL				
Oven temp.	40°C				
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 5 mM Ammonium acetate in water				
	Time (min)	A (%)	B (%)		
	0.0	100	0		
	2.5	100	0		
Gradient	2.6	10	90		
	7.0	10	90		
	8.0	100	0		
	10.0	100	0		
MS/MS condition					
Capillary	3.0 kV				
Source temp.	150°C				
Desolvation temp.	500°C				
Desolvation gas flow	1000 L/hr				
Cone gas flow	150 L/hr				
MRM condition	Molecular weight	Exact mass	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	CE ¹⁾ (eV)
	497.5	497.2	498	178 ²⁾ 336	23 26
Ionization mode	ESI positive				

¹⁾Collision energy (eV)²⁾Quantification ion

분간 원심분리 후 상등액 전량을 취하였다. 다시 메탄올/물(50/50, v/v)을 10 mL를 가하여 상기의 추출과정을 반복하였다. 추출액을 이전의 추출액과 합한 후 부피를 25 mL로 맞추었다. 메탄올 3 mL와 물 3 mL로 미리 활성화시킨 HLB 카트리지에 추출액의 5 mL를 흡착시켜 받고 물 5 mL를 용출시켜 받았다. 정제된 용액의 최종 부피를 10 mL로 맞추어 후 syringe filter (PVDF, 0.2 μm)로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다.

LC-MS/MS 분석조건

분석기기는 Waters (Milford, MA, USA)사의 액체크로마토그래피-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem mass Spectrometry, Acquity UPLC-Xevo TQ-S)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 X-Bridge® Amide (2.1 × 150 mm I.D.,

3.5 μm, Waters, Dublin, Ireland)를 이용하여 분리하였다. 컬럼 온도는 40°C를 유지하였으며 이동상으로는 5 mM 아세트산암모늄 함유 물과 아세토니트릴을 이동상으로 사용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 electrospray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하여 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 선택한 후 정량이온(quantification ion) 및 정성이온(qualification ion)을 선택하여 MRM (multiple reaction monitoring) 조건을 확립하였다. LC-MS/MS 분석 기기조건은 Table 1과 같다.

시험법의 유효성 검증

매트릭스(matrix)에 따라서 정량에 큰 영향을 미치므로 매트릭스의 종류에 따라 추출 및 정제방법이 동일하여도 검량선의 기울기, 정확성, 검출한계 및 정량한계가 달라질 수 있으므로 각 매트릭스별 유효성 검증이 필요하다¹³⁾. 그러므로 확립된 시험법의 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 재현성(reproducibility), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ)에 대한 유효성은 식약처 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’ 및 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)을 토대로 검증하였다^{14,15)}. 직선성 확인을 위하여 발리다마이신 에이 표준용액을 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 및 0.1 μg/mL 농도가 되도록 무처리 시료 시험 용액으로 희석하였다. 각 농도 범위에 대한 peak의 면적을 이용하여 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였고, 검량선의 결정계수(r^2)를 구하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 정밀성을 검증하기 위해 대표 농산물 5종의 무처리 시료에 대하여 발리다마이신 에이의 표준용액을 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배에 해당하는 농도로 처리하였으며 각각의 농도 및 시료에 대하여 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 시험법의 정확성과 정밀성 및 반복성을 평가하였다.

Results and Discussion

최적기기분석조건 확립

발리다마이신 에이는 아미노글리코사이드계 항생물질로 구조상 Chromophore가 없어 UV 흡광도가 약하여 HPLC-UVD (Ultraviolet detector)로 분석하기 어렵고 많은 hydroxyl기가 포함되어 있는 극성화합물(Log P_{ow} = -4.21)이다(Fig. 1). 아미노글리코사이드계 항생물질은 흔히 유도체화 후 형광검출기를 이용한 분석법이 이용되어왔으나¹⁶⁾ 시간이 많이 소요되고 실험 과정이 복잡한 단점이 있어 적용되기

가 어렵다. 따라서 선택성이 높고, 최근 농약 PLS (positive list system) 도입에 따른 기준이 엄격해짐에 따라 낮은 정량한계 설정 및 시료의 간섭물질에 대한 영향을 배제하기 위해 LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였다^{8,9,17}. 분석컬럼은 C₁₈컬럼을 사용할 경우 머무름이 전혀 없어 이온쌍 시약 트리플로로아세트산(Trifluoroacetic acid, TFA)과 헵타플로로부티르산(Heptafluorobutyric acid, HFBA)을 사용할 경우 시료 중 분석물질과의 이온교환을 통해 간섭물질과의 머무름의 차이가 발생하여 분리가 되나 컬럼의 안정화 시간이 많이 소요되고 충전제의 표면에 강하게 흡착하므로 제거하기 어렵다는 단점이 있다^{11,12,17,18}. Log P_{ow}를 고려하여 극성물질 분석에 흔히 사용하는 HILIC (Hydrophilic interaction chromatography) 컬럼 및 amide 컬럼을 비교하여 머무름 시간을 비교한 결과 HILIC 컬럼은 사용시 머무름 시간이 짧아 간섭 물질과의 분리하는 목적에 적합하지 않아 머무름을 증가시켜 간섭물질과의 분리할 수 있는 amide 컬럼을 선택하였다. 이동상은 아세트산암모늄 함유 물을 사용시 peak broad 현상이 관찰되어 포름산이나 아세트산 함유 아세토니트릴을 사용하여 측정하였다. 그 결과, peak의 모양이 개선되었으나 감도가 떨어지는 것을 확인하여 산을 포함하지 않는 아세토니트릴과 아세트산암모늄 함유 물을 선택하였고, 발리다마이신 에이가 머무르는 시간에 물 비율을 높여 peak의 broad 현상을 줄이는 방법으로 최적의 기기분석 조건을 확립하였다. 아세트산암모늄과 같은 첨가제는 이동상의 pH와 이온화 효율 제어에 효과적이므로 pH의 영향으로 이온화 형태가 달라지는 발리다마이신 에이가 시료에 따라 머무름 시간이 달라지는 문제를 해결하기 위해 사용하였다. 평균질량이 497.5 (Exact mass: 497.2)인 발리다마이신 에이 표준용액(0.1 µg/mL)을 일정한 속도(10 µL/min)로 직접 주입한 결과 [M+H]⁺형태인 498.2 mass값을 확인하였다. 이후, cone voltage의 변화(5~60 V)에 따른 최적화 과정을 통해 30 V에서 최대 peak가 나타남을 확인하였으며, 최적화된 cone voltage에서 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM mode로 분석하였다. Collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion), 그 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다(Table 1). 또한 시료에 따른 대상 성분의 이온화 역압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 시료별로 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

정제 조건 확립

Na⁹등은 QuEChERS method를 참고하여 발리다마이신 에이를 C₁₈, GCB 및 PSA등의 d-SPE (dispersive solid phase extraction)를 이용하여 정제하였다고 보고하였으나,

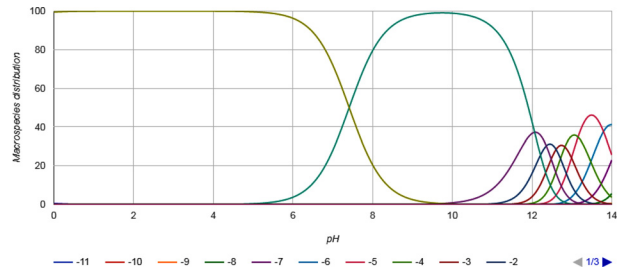


Fig. 2. pKa graph of validamycin A.

Table 2. Comparison of solvent ratio on validamycin A elution efficiency using HLB cartridge

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	Recovery (%)
Methanol/water	0/100	1 (loading 5 mL)	64
		2 (5 mL)	33
		3 (5 mL)	-
		4 (5 mL)	-
		5 (5 mL)	-
Total	10/90		97

AOAC 2007.01 및 CEN 15662 method¹⁹를 검토해 본 결과 대상 성분을 회수할 수 없었다. 이는 추출액에 첨가한 MgSO₄가 시료 중의 수분과 발열 반응을 발생하게 되고 이온화 되어진 발리다마이신 에이가 흡착되어 회수하지 못한 것이라고 판단되어진다. 발리다마이신 에이는 분자 내에 다수의 하이드록실기와 하나의 질소 원자를 갖고 있는 물질로 용매의 pH에 따라 해리도가 달라지는 약염기성 화합물이다. pH에 따라 분자 내 질소 원자에 protonation을 할 수 있는 상태(HA⁺), 수소원자하나가 부족한 상태(A: 이온억압상태)와 분자 내 하나의 하이드록실기의 수소가 부족한 상태(HA⁻)로 존재하며, 헨더슨-하텔바흐식에 의해 pKa와 pH가 같아지는 pH 6.14에서는 HA⁺와 A의 수가 같다. HA⁻는 pH 12.4일 때 20% 정도로 밖에 존재하지 못하며 A와 HA⁻의 수가 같아지는 pH는 없기 때문에 발리다마이신 에이의 pKa는 하나이다(Fig. 2). 분자가 pKa를 가지는 경우에는 보통 일반적으로 잔류농약분석에 사용하는 플로리실(florisil)이나 실리카(silica) 카트리지보다는 이온교환 카트리지를 사용하는 것이 정제효율이 높다고 판단되었으며 많은 문헌들에서도 HLB, WCX 카트리지 및 SCX 카트리지를 이용한 정제과정이 보고 되어있다^{2,7,8,11,12}. 본 시험법에서는 메탄올에 용해된 표준용액을 이용하여 HLB와 WCX 카트리지의 정제효율을 검토한 결과 WCX 카트리지의 경우 산을 첨가한 메탄올로 2회 용출하였으나 용출되지 않았으며 HLB 카트리지의 경우 Table 2와 같은 결과를 확인 할 수 있었다. 실험 결과에 따라 5품목의 농산물 시료에 HLB 카트리지를 적용하였고 이를 통해 다양

Table 3. Comparison of solvent ratio on validamycin A extraction efficiency

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Recovery (%)
Methanol/water	100	93.5
	90/10	99.5
	80/20	80.7
	50/50	79.5
	100 (containing 1% formic acid)	69.2
	0 (containing 1% formic acid)	68.2

Table 4. Comparison of extraction efficiency by wetting in soy-bean

Amount of water	Solvent	Recovery (%)
0 mL	50% MeOH	84.9
	90% MeOH	70.4
5 mL ¹⁾	50% MeOH	81.0
	90% MeOH	67.3

¹⁾Stand for 1 h.

Table 5. Comparison of extraction efficiency by repeat shaking

Solvent	Recovery (%)		
	1 time	2 times	3 times
MeOH	71.5	91.3	93.8
90% MeOH	73.0	96.5	88.9
50% MeOH	72.0	92.2	93.1

한 매트릭스 간섭물질로부터 발리다마이신 에이를 효과적으로 정제할 수 있었다.

추출 조건 확립

발리다마이신 에이는 유기용매에 낮은 용해도를 보이나 비교적 메탄올(62.3 g/L)에 높은 용해도를 보이며 물에 대한 용해도는 610 g/L (20°C)로 메탄올과 물 혼합액을 추출 용매로 사용하여 비교하였다. 감귤, 감자, 고추 시료를 적용한 결과 메탄올/물(90/10, v/v)을 이용한 추출에서 회수율이 가장 높았다(Table 3). 건조시료의 경우 수용성 유기용매인 아세트니트릴, 메탄올 등에 의한 추출 효율이 낮아 추출 전에 물을 첨가하는 습윤화 과정이 필요하기 때문에²⁰⁾ 대두를 이용하여 습윤화의 유무에 따른 추출 효율을 비교하였다. 메탄올/물(90/10)을 추출 용매로 사용시 습윤화를 진행하는 것이 회수율이 더욱 높았지만 메탄올/물(50/50)을 추출 용매로 사용시 습윤화 유무와 관계없이 추출 효율이 81.0% 이상으로 우수하였다(Table 4). 이는 습윤화 과정을 생략하여도 추출 용매에 함유된 물이 건조시료를 습윤화하는데 충분하기 때문에 추출용매로 사용하기 적합하다고 판단하였다. 감귤, 감자, 고추의 경우 메탄올/물(50/50, v/v)을 추출 용매로 사용시 회수율이 낮

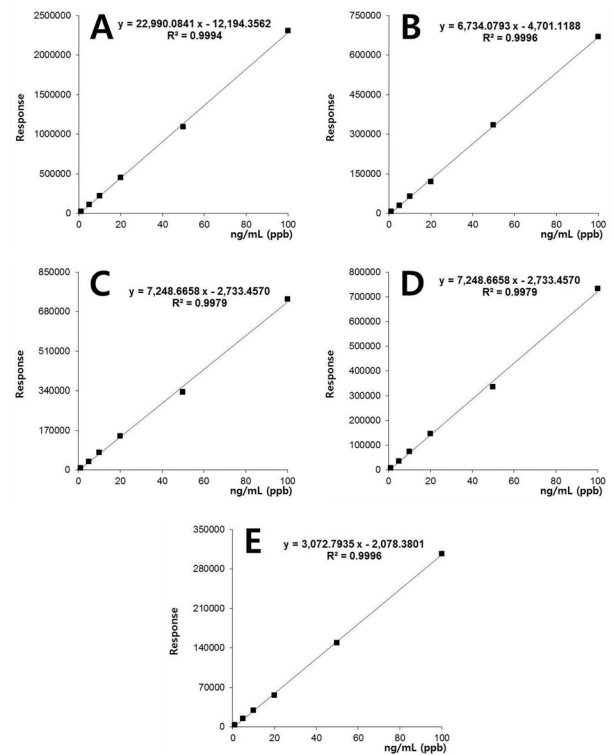


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of corresponding to validamycin A in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

아 pH를 조절하여 추출 효율을 높이고자 하였으나 69.9~79.5%로 큰 차이가 없었으며 2회 진탕 추출을 진행함으로써 회수율이 91.3~96.5%로 추출 효율의 증가하였고 재현성 있는 결과를 확인할 수 있었다(Table 5). 본 연구는 모든 농산물을 광범위하게 적용할 수 있는 시험법을 개발하고자 함으로 추출 용매의 단일화를 위하여 메탄올/물(50/50, v/v)을 이용하여 반복 추출하는 방법으로 선정하였다.

시험법 유효성 검증

발리다마이신 에이의 선택성(selectivity)은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 확인하였다. 무처리 시료 중 발리다마이신 에이의 머무름 시간과 질량 대 전하비(m/z)가 동일한 간섭물질이 검출되지 않아 본 시험법은 대상 성분을 분석함에 있어 높은 분리능과 선택성을 확인할 수 있었다. 개발된 시험법의 직선성을 확인하기 위하여 표준원액을 무처리 시험용액으로 희석하여 0.001~0.1 µg/mL로 제조한 후 5 µL를 LC-MS/MS를 주입하여 분석한 결과 농산물 5종 시료 표준용액에서 결정계수(r²) 0.99이상으로 높은 직선성을 확인하였다(Fig. 3). 발리다마이신 에이의 검출한계는 기기의 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)

Table 6. Inter-laboratory validation results of analytical method for validamycin A in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery \pm RSD ¹⁾ (%)		Mean ²⁾ (%)	CV ³⁾ (%)
		Lab1 ⁴⁾	Lab2 ⁵⁾		
Hulled rice	0.01	118.3 \pm 7.3	95.3 \pm 4.1	106.8	12.8
	0.1	103.7 \pm 7.0	91.9 \pm 6.7	97.8	9.1
	0.5	99.0 \pm 6.9	82.4 \pm 4.8	90.7	11.6
Potato	0.01	107.7 \pm 2.5	103.6 \pm 7.9	105.7	5.4
	0.1	111.8 \pm 5.0	108.4 \pm 5.7	110.1	4.7
	0.5	110.9 \pm 5.8	114.5 \pm 4.2	112.7	4.4
Soybean	0.01	72.5 \pm 1.8	99.2 \pm 3.6	85.9	17.3
	0.1	75.8 \pm 4.0	75.9 \pm 5.7	75.9	5.8
	0.5	84.8 \pm 2.0	103.4 \pm 1.8	94.1	11.0
Mandarin	0.01	89.8 \pm 10.3	117.7 \pm 1.4	103.8	16.0
	0.1	98.4 \pm 8.7	93.3 \pm 0.8	95.9	6.5
	0.5	105.7 \pm 8.3	101.3 \pm 1.1	103.5	5.6
Green pepper	0.01	87.2 \pm 5.7	70.9 \pm 1.0	79.1	12.2
	0.1	93.7 \pm 2.5	72.3 \pm 1.7	83.0	14.3
	0.5	88.2 \pm 4.1	76.2 \pm 3.0	82.2	8.9

¹⁾RSD: Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation

²⁾Recovery average of inter-laboratory.

³⁾Coefficient of variation of inter-laboratory.

⁴⁾Ministry of Food and Drug Safety

⁵⁾Gwangju Regional Food and Drug Administration

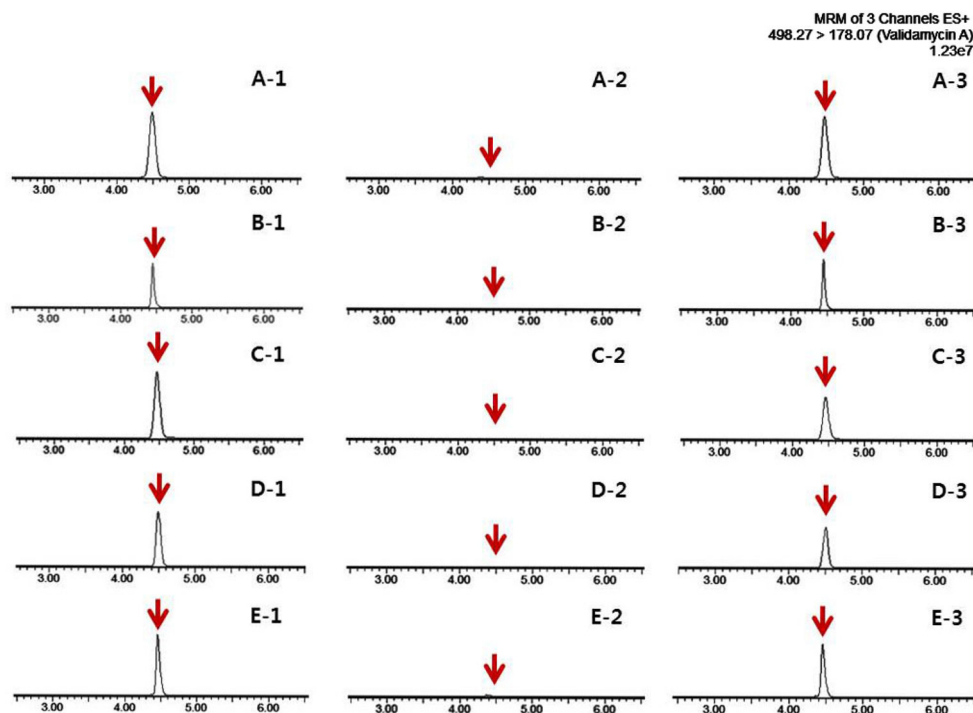


Fig. 4. Representative MRM(quantification ion) recovery chromatogram (fortification concentration: 0.1 mg/kg) of validamycin A (m/z 498 \rightarrow 178) in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper at (1) matrix-matched standard, (2) control and (3) recovery.

를 3 이상, 정량한계는 10 이상으로 결정하였다. 대표 농산물 5종에 대하여 분석기기의 최소검출량에 따른 검출한

계는 0.005 mg/kg이었으며, 정량한계는 0.01 mg/kg이었다. 검출한계와 정량한계의 산출식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned} \text{검출한계(mg/kg)} &= \\ & \text{최소검출농도}(\mu\text{g/mL}, S/N \geq 3) \times \text{희석배수}^1) \\ &= 0.0005(\mu\text{g/mL}) \times \left(\frac{25(\text{mL})}{5(\text{g})} \times \frac{10(\text{mL})}{5(\text{mL})} \right) = 0.005\text{mg/kg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{정량한계(mg/kg)} &= \\ & \text{최소정량농도}(\mu\text{g/mL}, S/N \geq 10) \times \text{희석배수}^1) \\ &= 0.001(\mu\text{g/mL}) \times \left(\frac{25(\text{mL})}{5(\text{g})} \times \frac{10(\text{mL})}{5(\text{mL})} \right) = 0.01\text{mg/kg} \end{aligned}$$

$$^1)\text{희석배수} = \text{희석부피}(\text{mL})/\text{분취량}(\text{mL})$$

시험법의 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배 수준인 0.01, 0.1과 0.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수율 실험을 통해 시험법의 정확성과 정밀성(반복성)을 평가하였다. 그 결과 평균 회수율은 72.5~118.3%였으며, 상대표준편차가 10.3% 이하로 확인되었다(Table 6). 따라서 본 연구 결과는 잔류물 분석에 관한 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40-1993, 2003) 및 식품의약품안전평가원 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 부합하므로^{14,15)} 농산물 중 잔류하는 발리다마이신 에이를 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다. 농산물 5종에 대한 회수율 크로마토그램은 다음과 같다(Fig. 4).

실험실간 시험법 검증

시험법의 유효성을 확인하기 위해 외부 실험기관인 광주지방식품의약품안전청과 실험실간 검증을 수행하고자 개발한 시험법을 제공한 후 동일한 방법으로 분석을 수행하여 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 발리다마이신 에이의 평균 회수율은 70.9~117.7%이었고, RSD는 7.9% 이하로 조사되었다(Table 6). 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 75.9~112.7%이며 RSD는 18%미만으로 모든 처리구에서 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)¹⁴⁾ 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)¹⁵⁾에서 제시한 기준 처리농도 > 1 μg/kg, ≤ 0.01 mg/kg의 46%, 처리농도 > 0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 34%, 처리농도 > 0.1 mg/kg, ≤ 1 mg/kg의 25%보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다.

Acknowledgement

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

발리다마이신 에이는 아미노글리코사이드계 항생물질로 이탄당인 균당을 2개의 포도당으로 분해하는 효소(trehalase)의 작용을 저해하여 균 증식을 억제한다. 우리나라에서는 벼, 고추, 복숭아, 마늘, 양파, 참다래 등에 세균성 병해를 방제하기 위해 농약으로 등록되어 있다. 국외의 경우 일본에 잔류허용기준(MRLs)이 감자 포함 43품목에서 0.05-0.06 mg/kg으로 기준이 설정되어 있고, 유럽은 0.01 mg/kg 일률 기준을 적용하고 있으며 국내의 경우 기준이 설정될 예정이다. 축산물의 경우 잔류물의 정의를 설정하고 있지 않으나 농산물의 경우 잔류물의 정의는 일본에서 모화합물로 설정되어 있으며 국내에서도 모화합물로 규정할 예정이다. 따라서 발리다마이신 에이의 잔류허용기준 신설에 따른 안전관리를 위하여 공정시험법을 개발하였다. 분석기기는 발리다마이신 에이의 물리·화학적 특성을 고려하여 선택성과 감도가 우수한 LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였고 메탄올/물(50/50, v/v)을 이용하여 진탕 추출 후 HLB 카트리지를 이용한 정제 조건을 확립하여 시험법을 개발하였다. 발리다마이신 에이의 직선성은 결정계수(r^2)가 0.99이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.005, 0.01 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배 수준으로 회수율 실험한 결과 평균 회수율(5반복)은 72.5-118.3%이었으며 분석오차는 10.3% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 검증 결과 각 농도별 발리다마이신 에이의 평균 회수율은 70.9~117.7%이었고, 상대표준편차(RSD)는 7.9% 이하로 조사되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 75.9~112.7%이며 RSD는 18%미만으로 본 연구는 국제식품규격위원회 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 적합한 수준임을 검증하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물 중 발리다마이신 에이의 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.

Reference

1. Yueqiao, L., Zhen, H.W., Linqun, B., Zixin, D., Jian, J.Z.: Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *J. Biotechnol.*, **142**, 271-274 (2009).
2. Han, S.H.: Analysis of kasugamycin-validamycin in agricultural products by liquid chromatography-mass spectrometry.

- Seoul National University, Korea (2009).
3. Using guideline of crop protection agents. Korea Crop Protection Association (KCPA), Available at <http://www.koreacpa.org/korea/> (2018).
 4. EU Pesticides database. European Commission, Available at <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN> (2018).
 5. Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods. The Japan Food Chemical Research Foundation, Available at <http://db.ffcr.or.jp/front/> (2018).
 6. MRLs in Pesticide. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Cheongju, Korea (2018).
 7. Chuanxian, W., Zhigang, Z., Yan, S., Zhengan, T., Dunming, X., Chao, H.: Determination of valdamycin A in agricultural food samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, **169**, 150-155 (2015).
 8. Chenchen, W., Hongge, L., Ni, W., Huidong, L., Liping, F., Zhan, D., Hongxia, D., Shuai, G., Qian, Z., Zilei, C., Guosheng, Y.: Simultaneous analysis of kasugamycin and validamycin-A In fruits and vegetables using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and consecutive solid-phase extraction. *Analytical Methods*, **4**, (2016).
 9. Na, L., Fengshou, D., Jun, X., Xingang, L., yongquan, Z.: Determination of Aminoglycoside Fungicide Validamycin A in Rice Plant by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach Using Ultra High performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods*, **9**, 1736-1744 (2016).
 10. Michelangelo, A., and Steven, J.L.: 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**(3), 412-431 (2003).
 11. Cho, Y.J., Choi, S.J., Kim, M.A., Kim, M.K., Yoon, S.J., Chang, M.I., Lee, S.M., Kim, H.J., Jeong, J.Y., Rhee, G.S., Lee, S.J.: Simultaneous Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Meat using Liquid Chromatography Tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Saf.*, **29**(2), 123-130 (2014).
 12. 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), 1-5 (2011).
 13. Park, M.S., Lee, J.J., Myung, S.W.: Analysis of Phosim Residue in Animal Food Production (Cattle and Pig) by LC/ESI-MS/MS. *J. Korean Chem. Soc.*, **55**(4), 626-632 (2011).
 14. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993. CAC (Codex Alimentarius Commission), Rome, Italy (2003).
 15. Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Cheongju, Korea (2016).
 16. Clarot, I., Chaimbault, P., Hasdenteufel, F., Netter, P., Nicolas, A.: Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A.*, **1031**, 281-287 (2004).
 17. Y. Tao., D. Chen., H. Yu., L. Huang., Z. Liu., X. Cao., C. Yan., Y. Pan., Z. Liu., Z. Yuan.: Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography=tandem mass spectrometry. *Food chem.*, **135**, 676-683 (2012).
 18. Kim, C.S., Ryu, H.D., Chung, E.G., Kim, Y.S., Rhew, D.H.: Determination of Veterinary Antibiotic Residues: III. Analytical Methods A Review. *J. Korean Soc. water Environ.*, **32**(6), 649-669 (2016).
 19. Tomasz, R., Tomasz, T.: A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.*, **13**(1), 980-1010 (2015).
 20. Lee, Y.D.: Practical book of Korea Food Code pesticide residue analysis method, 4 th ed, 11-15, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Cheongju, Korea (2013).