pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 3, pp. 227~234 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.3.227

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

QuEChERS법 및 LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Oxytetracycline의 잔류시험법 개발 및 검증

조성민 · 도정아* · 이한솔 · 박지수 · 신혜선 · 장동은 · 조명식[1] · 정용현 · 이강봉
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[1]식품의약품안전처 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Development and Validation of the Analytical Method for Oxytetracycline in Agricultural Products using QuEChERS and LC-MS/MS

Sung Min Cho, Jung-Ah Do*, Han Sol Lee, Ji-Su Park, Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Myong-Shik Cho[1], 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
[1]Hazardous Substances Analysis Division,Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju, Korea
(Received March 5, 2019/Revised April 8, 2019/Accepted April 11, 2019)

ABSTRACT - An analytical method was developed for the determination of oxytetracycline in agricultural products using the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). After the samples were extracted with methanol, the extracts were adjusted to pH 4 by formic acid and sodium chloride was added to remove water. Dispersive solid phase extraction (d-SPE) clean-up was carried out using $MgSO_4$ (anhydrous magnesium sulfate), PSA (primary secondary amine), C_{18} (octadecyl) and GCB (graphitized carbon black). The analytes were quantified and confirmed with LC-MS/MS using ESI (electrospray ionization) in positive ion MRM (multiple reaction monitoring) mode. The matrix-matched calibration curves were constructed using six levels (0.001~0.25 μg/mL) and coefficient of determination (r^2) was above 0.99. Recovery results at three concentrations (LOQ, 10×LOQ, and 50×LOQ, n=5) were from 80.0 to 108.2% with relative standard deviations (RSDs) less than of 11.4%. For inter-laboratory validation, the average recovery was in the range of 83.5~103.2% and the coefficient of variation (CV) was below 14.1%. All results satisfied the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL 40-1993, 2003) and the Food Safety Evaluation Department guidelines (2016). The proposed analytical method was accurate, effective and sensitive for oxytetracycline determination in agricultural commodities. This study could be useful for safety management of oxytetracycline residues in agricultural products.

Key words : Pesticide, Oxytetracycline, Fungicide, Analytical method, Agricultural product, LC-MS/MS

옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)은 테트라사이클린(tetracycline)계 항생제로써, *Treptomyces rimosus*의 발효에 의해 생성되었고, 소, 돼지, 닭 등 가축 및 가금류에 동물용의약품으로 허가되었다. 옥시테트라사이클린은 30S와 50S 리보솜 sub unit에 결합하여 리보솜 A site에 amino-acyl tRNA와 termination factors RF1과 가 결합하여 세균의 단백질 생합성을 저해하고, 닭의 만성호흡기질환(chronic respiratory disease, CRD) 등을 조절한다[1]. 또한 농약으로써 침투이행성 살균제로 배추, 담배, 고추, 복숭아 등의 농산물에 무름병, 줄기속마름병에 사용된다. 옥시테트라사이클린의 물리·화학적 특징을 살펴보면 화학식은 $C_{22}H_{24}N_2O_9$, 분자량은 460.4 g/mol이고 n-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 -4.42로 극성 화합물의 특성을 나타낸다[2].

국내에서는 옥시테트라사이클린을 동물용의약품으로 사용할 경우에 잔류물의 정의를 oxytetracycline, chlortetracycline 및 tetracycline의 합으로 정하여 관리하고 있으며 잔류허용

*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

기준은 소의 근육 등 30개 품목에 대하여 0.1~1.2 mg/kg으로 설정하고 있다[3]. 2019년 현재, 농산물 중 잔류물의 정의와 잔류허용기준은 설정되어 있지 않고 미국(The Electronic Code of Federal Regulations, ECFR)[4] 및 일본(The Japan Food Chemical Research Foundation, JFCRF)[5]에서는 옥시테트라사이클린을 모화합물로 정하여 기준을 설정하고 있다. 따라서 국내 농산물 중 옥시테트라사이클린의 잔류물의 정의는 모화합물로 규정하여 관리할 예정이다.

옥시테트라사이클린의 독성은 미국 EPA (United State Environmental Protection Agency)[6]에서는 마우스 경구 투여에 대해 낮은 급성독성(Category IV)을 가지고, 인체에서 위해발암성은 없다고 보고하였다. 개(dog) microbial study를 독성종말점(toxicological end point)으로 NOAEL (The no observed adverse effect level)을 0.05 mg/kg bw/day로 설정하였고, NOAEL에 안전계수 100을 적용하여 cRfD (chronic reference dose, cRfD=NOAEL/UF)를 0.0005 mg/kg/day로 설정하였다. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)[7]의 경우 인체연구를 독성종말점으로 NOAEL 2 mg/day로 설정하였고, NOAEL에 안전계수 100을 고려하여 ADI (acceptable daily intake)를 0.03 mg/kg bw/day로 설정하였다.

2019년 현재, 일본의 잔류허용기준(Maximum Residue Limits, MRL)은 수산물과 농산물을 포함하여 38품목에 대하여 0.05~0.3 mg/kg[5]으로, 미국은 농산물에만 적용되어 사과 등 3품목에 대하여 0.35 mg/kg[4]으로 설정되었다. 국내의 경우 2019년 이후 잔류허용기준을 신설할 예정으로 이에 따른 공정시험법을 개발하고자 하였다. 옥시테트라사이클린 시험법에 관한 연구로는 saksit 등[8]이 새우 중 55종의 항생제를 아세토니트릴과 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)로 추출한 후 LC-MS/MS를 이용하여 동시 분석한 연구가 있으며, 그 외 벌꿀에서 oxytetracycline과 tetracycline의 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 동시 분석한 연구가 있다[9]. 또한 버팔로(buffalo)의 간에서 tetracycline계 항생제(tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, doxycycline)를 확인하기 위하여 QuEChERS를 이용하여 LC-MS/MS로 분석한 보고가 있다[10]. 하지만 이들의 연구는 벌꿀과 축·수산물의 한정된 시료만 분석이 가능한 시험법이고 아직 국내에 곡류, 서류, 과일류 등에 적용한 옥시테트라사이클린 시험법에 관한 연구가 보고된 바 없다. 국내 식품공전 잔류동물용의약품시험법 8.3.39[11]에서는 옥시테트라사이클린 외 4성분을 축, 수산물에 적용하여 EDTA와 옥살산을 첨가한 아세토니트릴/아세트산에틸(2/1, v/v) 혼합액으로 추출한 후 LC-MS/MS로 분석하는 방법이 제시되고 있으며, 8.3.119[11]에서는 옥시테트라사이클린 외 9성분을 벌꿀에 적용하여 HLB 카트리지를 이용하여 정제 후 LC-MS/MS로 분석하는 방법이 제시되고 있다. 하지만 시험법 적용범위가 벌꿀과 축·수산물에만 한정되어 있어 국내 및 수입 농산물에서의 잔류성 시험에 적용될 수 없으므로 분석대상 품목을 확대 적용한 시험법의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에 기준 신설 예정인 옥시테트라사이클린의 농산물 중 잔류가능성에 대한 안전관리와 국내 유통 농산물의 잔류농약 검사를 위해 곡류(현미), 서류(감자), 두류(대두), 과일류(감귤), 채소류(고추)를 대상으로 한 공정 시험법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

옥시테트라사이클린(100%) 표준품은 U.S. pharmacopeia (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴, 메탄올은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany), 무수황산마그네슘($MgSO_4$), 염화나트륨은 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 포름산은 Sigma Aldrich (St. Louise, MO, USA), PSA (primary secondary amine)는 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), GCB (graphitized carbon black)와 C_{18} (octadecyl)은 Waters (Milford, MA, USA), PTFE 필터(0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma (Barcelona, Spain)에서 구입하여 사용하였다. 검체는 식물성 원료로 분류된 대표농산물 5종 감귤(과일류, mandarin), 감자(서류, potato), 고추(채소류, green pepper), 대두(두류, soybean), 현미(곡류, hulled rice) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

옥시테트라사이클린 표준품 10.00 mg을 10 mL의 메탄올에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였으며, 100 μg/mL가 되게 희석하여 혼합표준용액으로 하였다. 이를 시료 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.25 μg/mL로 조제하여 90% 이상의 무처리 추출물이 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

검체를 분쇄하여 5 g(곡류, 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 5 g, 서류, 과일류, 채소류는 약 1 kg을 분쇄한 후 5 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류 및 두류의 경우 증류수 5 mL를 가한 후 10분간 방치) 메탄올 15 mL를 가하여 강하게 흔들고, 추출물에 포름산을 첨가하여 pH 4로 조절한 후, 염화나트륨을 1 g 추가하여 10분간 진탕하고 4,500 *G*에서 10분간 원심분리 하였다. $MgSO_4$ 1,200 mg, PSA 400 mg, C_{18} 400 mg, GCB 45 mg이 담긴 15 mL 원심분리관 추출

로부터 얻은 메탄올 층 8 mL를 넣고 1분간 진탕 후 이를 3,000 *G*에서 10분간 원심분리 하였다. 정제된 상징액을 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

LC-MS/MS 분석조건

옥시테트라사이클린 분석을 위해 Shimadzu (Kyoto, Japan) 사의 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Spectrometer, LC-MS/MS-8060)를 이용하여 분석하였다. 분석용 칼럼은 역상 칼럼인 Cadenza CW-C_{18} (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 3.0 μm)을 사용하고, 0.1% 포름산이 함유된 아세토니트릴과 0.1% 포름산이 함유된 수용액을 사용하여 최적화된 기울기 용리방식으로 대상성분을 분리하였다. 정량분석을 위하여 LC-MS/MS의 ESI (electrospray ionization)법의 positive mode로 최적의 정량이온과 정성이온을 선택한 후 collision energy (CE) 값을 선정하였고, LC-MS/MS의 분석조건은 Table 1과 같다.

시험법의 검증

본 연구는 '식품등의 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[13]을 근거로 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 기기상의 검출한계(Limit of dection, LOD), 시험법의 정량한계(Limit of quantification, LOQ), 정확성(accuracy), 재현성(reproducibility), 반복성(repeatability)에 대한 유효성을 검증하였다. 선택성 확인은 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 비교하였고, 직선성 확인을 위하여 옥시테트라사이클린을 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준 용액 0.001~0.25 μg/mL의 농도범위에 대한 각각의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(Coefficient of determination, r^2)를 구하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio, S/N)를 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 반복성을 확인하기 위하여 무처리 시료에 옥시테트라사이클린의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 확인하였다. 회수율 실험의 처리 농도는 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배에 해당하는 농도로 수행하였으며, 각 농산물 검체의 처리구는 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)를 계산하고, 시험법의 재현성은 광주지방식품의약품안전청과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

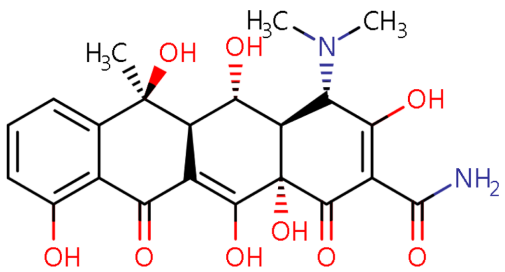
Table 1. LC-MS/MS parameters of analysis condition for oxytetracycline

Parameter	Condition		
Instrument	LC: Nexera X2 UHPLC (Shimazu, Kyoto, Japan) MS/MS: LCMS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan)		
Column	Cadenza CW-C_{18} (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 3.0 μm)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	1 μL		
Oven temp.	40°C		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in acetonitrile B: 0.1% formic acid in water		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	5	95
	4.1	95	5
	5.7	5	95
	6.0	0	100
	8.1	5	95
	10.0	5	95
MS/MS condition			
Interface temp.	150°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		

Results and Discussion

기기선정 및 분석조건 확립

옥시테트라사이클린은 아미노기(-NH_2), 페닐기에 -OH가 결합한 방향족 화합물(phenolic hydroxyl)을 가지고 있어 극성이 크고, 증기압이 1.2 × 10^{-5} Pa (20°C)로 휘발성이 낮고 열분해 가능성이 있어 GC 분석 시 재현성이 낮아 HPLC 분석이 용이할 것으로 판단하였다. 옥시테트라사이클린의 구조는 방향족 탄화수소인 벤젠고리를 포함하고 있어 HPLC-UVD 분석이 가능할 것으로 판단되었지만, 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 PLS (Positive List System) 도입에 따른 정량한계 0.01 mg/



$C_{22}H_{24}N_2O_9$

M.W. 460.4

Fig. 1. Molecular structure of oxytetracycline.

kg 수준을 확보 할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다 (Fig. 1). 분석용 칼럼은 옥시테트라사이클린의 극성(Log P_{ow} = -4.42)을 고려하여 비극성 물질과 극성물질 모두 분리가 가능한 C_{18} 역상 칼럼을 선택하였다. 이동상은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이용한 기울기 용리 방식으로 분석하였다. 이동상에 쓰인 포름산은 옥시테트라사이클린 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이한 protonation enhancer로 작용하였다[14]. 각 대상성분은 ESI법의 positive mode를 사용하여 TIC (total ion chromatogram)와 mass spectrum을 통해 최적 특성이온을 선정하고 SIM (selected-ion monitoring)으로 분석하였다. 옥시테트라사이클린의 평균질량은 460.4 g/mol, 관측질량은 460.14 g/mol으로 표준용액(1 μg/mL)을 컬럼을 통과시키지 않고 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과, ESI법의 positive mode에서 포름산에 의해 $[M+H]^+$형태인 461 *m/z*를 precursor ion으로 확인하였다. 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였고, CE값을 조절하여 최적의 precursor/product ion을 선정하였다. 가장 좋은 감도를 보이는 product ion 426 *m/z*를 정량이온(quantification ion), 다음으로 크게 검출되는 두 개의 product ion 443, 201 *m/z*를 정성이온(qualification ion)으로 설정하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성이온과 머무름 시간은 Table 2에 나타내었다.

추출 및 정제조건 확립

옥시테트라사이클린은 분자 내 -OH를 함유하여 극성이 매우 높고(Log Pow=-4.42), pKa그래프를 보면 넓은 범위의 pH에서 이온화 되어있어 pH에 따라 유기용매의 용해도가 달라지는 화합물이다. 그러므로 옥시테트라사이클린의 유기용매를 이용한 추출을 위하여 pH를 조절이 필요하다. 추출 및 정제 과정에서 시료의 유기산과 색소를 제거할 수 있는 d-SPE (dispersive solid phase extraction) 방법을 적용하는 것이 좋다고 판단되어 수용성 유기용매와 고상흡착제를 첨가하여 간섭물질을 제거하고 분석대상물질의 손실을 최소화할 수 있는 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)법을 이용하였다. 수분을 가지고 있는 시료의 경우(감귤, 고추, 감자) 옥시테트라사이클린이 시료 입자의 표면이나 내부에 존재할 수 있는데, 시료가 수분으로 수화되어 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 사용할 경우 시료의 내부로 비극성 용매의 침투성이 낮아 충분한 추출 효율을 얻을 수 없다. 곡류 등 건조 시료의 경우(현미, 대두) 건조된 상태에서 수용성 유기용매에 의한 추출효율이 낮기 때문에 일정량의 수분을 첨가(습윤화)하여 추출효율을 증가시키도록 하였다. 감귤 시료에 유기용매 침투성을 증가시키기 위해 수용성 유기용매인 아세토니트릴을 추출 용매로 선택하였으나 추출효율이 60~70%로 낮음을 확인할 수 있었고, 메탄올의 비율이 증가할수록 추출효율이 좋아지는 것을 확인하여 메탄올을 추출용매로 선택하였다. 염화나트륨은 검체 중 수분과 극성 불순물을 물층으로 분배시키고 유기용매 층과 분리시켜 매트릭스 간섭을 최소화하기 때문에 염화나트륨의 첨가량을 다르게하여 추출효율을 비교한 결과, 염화나트륨 1 g을 넣었을 때 100.3 ± 3.4%로 추출효율이 가장 좋은 것을 확인하였다(Table 3). 최적화된 추출조건을 다른 농산물에 적용한 결과, 감자의 회수율이 104.2 ± 1.6%, 고

Table 2. Selected-ion of LC-MS/MS for oxytetracycline

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1]
Oxytetracycline	5.5	460.4	460.14	461	426[2]	21
					443	15
					201	35

[1] Collision energy (eV)
[2] Quantification ion

Table 3. Comparisons of acetonitrile and methanol for extract efficiency of oxytetracycline in mandarin.

Sodium chloride(g)	Recovery ± RSD[1](%)				
	MeOH/ACN (100/0, v/v)	MeOH/ACN (80/20, v/v)	MeOH/ACN (50/50, v/v)	MeOH/ACN (20/80, v/v)	MeOH/ACN (0/100, v/v)
1	100.3 ± 3.4	99.5 ± 1.2	93.5 ± 0.3	89.8 ± 0.2	70.8 ± 0.5
2	97.8 ± 3.6	91.9 ± 3.5	88.4 ± 2.5	85.2 ± 1.7	66.9 ± 2.6
5	96.8 ± 1.1	88.5 ± 2.4	88.0 ± 0.8	83.4 ± 1.9	66.1 ± 1.6

[1] Recovery ± RSD: Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

Table 4. Comparison of recovery result for oxytetracycline by pH in five samples

pH	Recovery ± RSD[1)](%)				
	Mandarin	Potato	Green pepper	Hulled rice	Soybean
3	94.6 ± 5.0	83.9 ± 3.9	94.4 ± 2.3	101.1 ± 6.5	88.1 ± 0.4
4	95.9 ± 2.8	94.0 ± 0.2	104.2 ± 2.6	105.3 ± 5.5	106.2 ± 2.9
5	82.4 ± 0.4	108.4 ± 0.3	94.3 ± 12.6	71.5 ± 3.8	80.3 ± 24.1

[1)] Recovery ± RSD: Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

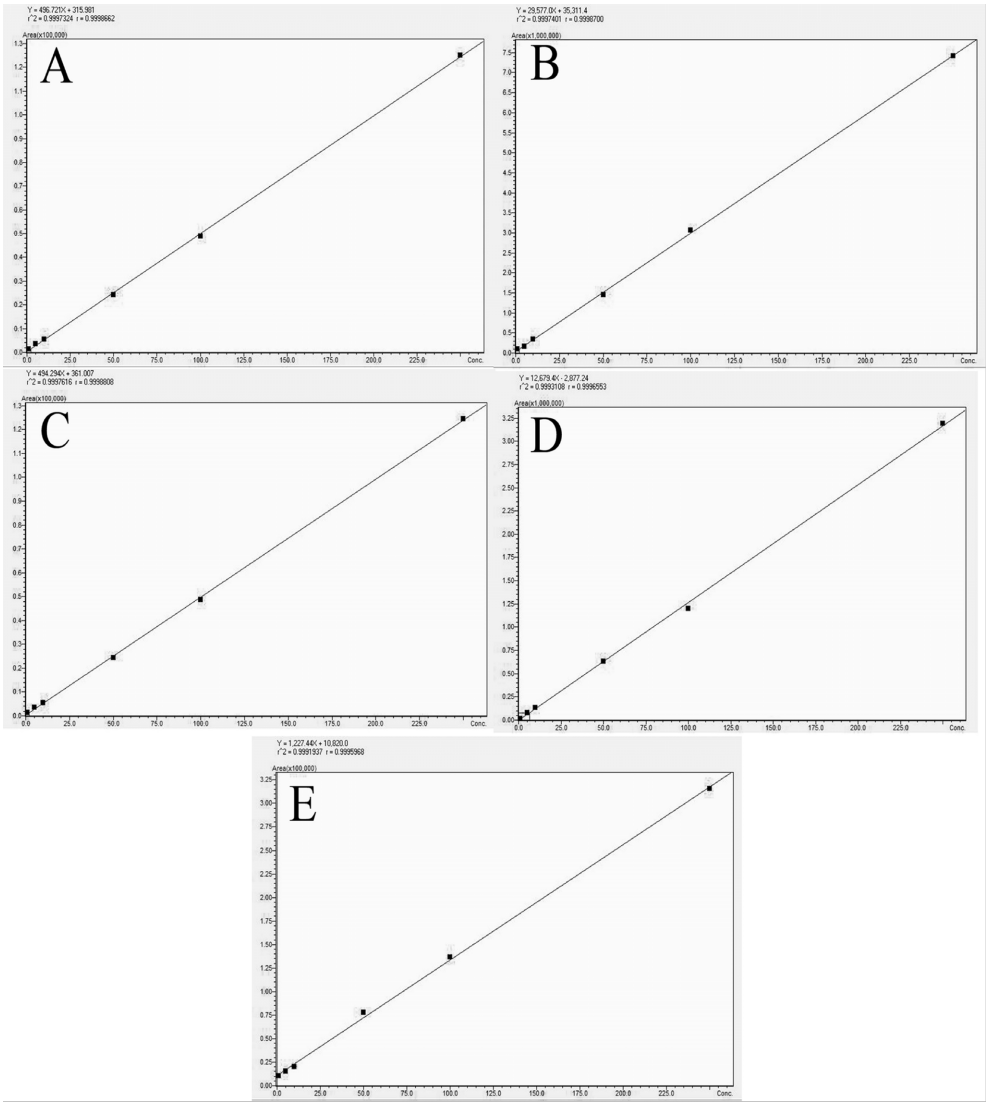


Fig. 2. Matrix-matched calibration curves of oxytetracycline in (A) hulled rice (r^2=0.9997), (B) potato (r^2=0.9997), (C) soybean (r^2=0.9998), (D) mandarin (r^2=0.9993) and (E) green pepper (r^2=0.9992).

추는 88.9 ± 2.3%로 추출효율이 좋았지만, 현미의 경우 추출되지 않았고(0%), 대두의 경우 16.8 ± 3.4%로 낮은 회수율을 보였다. 현미, 대두의 경우 습윤화 유무에 따른 회수율을 확인하기 위하여 10분간 습윤화(물 5 mL)를 하고 회수율을 비교하였을 때 습윤화 과정이 없었을 때 보다 회수율이 증가하여 현미는 45.2 ± 0.5%, 대두는 61.4 ± 2.3%의 결과를 보였지만 낮은 회수율을 나타내었다. 대표 농산물에 메탄올만 넣었을 때 pH는 감귤 pH 5.5, 감자 pH 7.4, 고추 pH 7.0, 현미 pH 6.7, 대두 pH 7.9로 농산물에 따라 pH가 각각 다르기 때문에, 추출 시 포름산을

이용해 pH 3, 4, 5로 조절하여 추출효율을 비교해 본 결과 추출액을 pH 4로 조절한 조건에서 94.0~105.3%의 우수한 추출효율을 보였다(Table 4). 정제조건 확립을 위하여 추출액의 유기산, 당과 같은 극성 간섭물질, 유지 성분 등의 무극성 간섭물질, 색소를 제거할 수 있는 d-SPE의 첨가를 검토하였다. 정제 과정에서 첨가되는 $MgSO_4$는 시료의 수분을 제거하여 극성도를 낮추고, 1차, 2차 아미노 그룹이 포함된 PSA는 (+) 전하를 띠는 작용기가 있어 추출물 안에 (-) 전하를 띠는 유기산 등을 제거한다. 또한 C_{18}은 비극성 방해물질을 제거하고, GCB는 식품에 함유된 클로로필, 카로티노이드 같은 색소를 효과적으로 제거할 수 있다[15]. 정제조건 확립을 위하여 시료를 적용하지 않고, 표준용액을 이용하여 옥시테트라사이클린에 PSA 단독으로 첨가하였을 때 회수율이 85.0 ± 1.4%로 약간 감소하였고, $MgSO_4$, GCB 단독으로 적용하였을 때 회수율은 각각 103.2 ± 1.9%와 97.7 ± 11.7%로 우수한 정제효율을 보였다(Table 5). $MgSO_4$를 시료에 적용하여 정제효율을 보았을 때, 감귤은 회수율이 65.5 ± 4.7%, 감자는 37.6 ± 1.7%, 고추는 60.0 ± 1.4%, 현미는 28.3 ± 5.5%, 대두는 42.8 ± 1.3%로 확인되었다(Table 5). 시료를 적용하지 않았을 때 간섭물질이 존재하지 않아 회수율에 크게 영향을 미치지 않았지만 시료를 첨가하니 다양한 간섭물질이 존재하기 때문에 결과가 다르게 나타난 것으로 판단된다. 표준용액에 $MgSO_4$, PSA, C_{18}, GCB를 함께 첨가하였을 때 회수율은 110.1 ± 0.9%이었지만, 시료를 첨가하여 4가지 성분을 적용한 결과 감귤의 회수율은 89.1 ± 3.3%, 감자는 94.7 ± 3.2%, 고추는 92.8 ± 0.8%, 현미는 95.4± 1.4%, 대두는 88.1 ± 0.4%로 우수한 정제효율을 나타내었다(Table 5). 대두는 지질과 같은 비극성 간섭물질을 가지고 있기 때문에 C_{18}을 추가하는 것이 적합할 것으로 판단되었고, 또한 크로마토그램 상에서 한 가지 성분만 첨가한 것과 비교하였을 때 4가지 성분을 모두 넣은 것이 시료의 간섭물질이 더욱 더 정제되어 S/N비가 가장 큰 것으로 확인되었다.

시험법 검증

옥시테트라사이클린은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교한 결과 옥시테트라사이클린의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 간섭물질은 검출되지 않아 본 시험법은 높은 분리능과 선택성을 확보하였다. 농산물 시료의 간섭효과를 고려하여 matrix-matched calibration curve로 정량한 결과, 표준원액을 무처리 추출물로 희석한 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.25 μg/mL 농도에서 결정계수(r^2) 0.99 이상으로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 2). 옥시테트라사이클린의 기기상 검출한계는 최소기기검출농도 0.001 μg/mL이었고 이에 따라 0.003 mg/kg이었으며, 시험법의 정량한계는 최소검출농도가 0.0033 μg/mL로 0.01 mg/kg으로 산출되었다. 우리나라는 2019년 1월 1일부터 허용물질목록관리제도(PLS)가 모든 농산물을 대상으로 확대되어 시행되었고 이에 따라 국내 재배 농산물 또는 수입 농산물 유통 시 검출된 농약에 대해서 잔류허용기준이 설정된 경우 그 기준을 적용하여 관리하지만, 잔류허용기준이 설정되지 않은 농약의 경우 안전성 검증강화를 위해 최저기준을 적용하여 0.01 mg/kg 이하의 정량한계 수준을 만족해야 한다

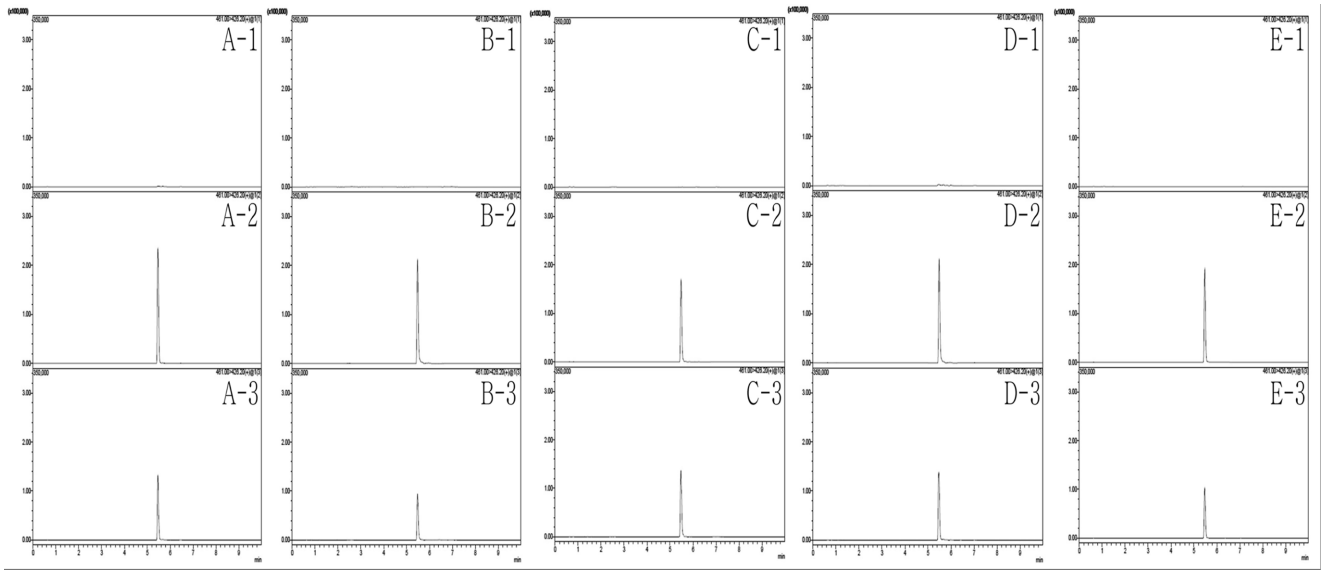


Fig. 3. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms of oxytetracycline (461>426) corresponding to: (1) matrix-matched control, (2) standard solution at 0.05 mg/kg and (3) recovery test (fortified level: 0.1 mg/kg) in (A) hulled rice (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin, (E) green pepper

Table 5. Comparisons of purification efficiency for oxytetracycline

	Purification	Recovery ± RSD[1](%)
Standard solution	1,200 mg of $MgSO_4$, 400 mg of PSA, 400 mg of C_{18}, 45 mg of GCB	110.1 ± 0.9
	1,200 mg of $MgSO_4$	103.2 ± 1.9
	400 mg of PSA	85.0 ± 1.4
	400 mg of C_{18}	109.1 ± 6.5
	45 mg of GCB	97.7 ± 11.7
Sample	Purification (1,200 mg of $MgSO_4$)	Recovery ± RSD(%)
	Mandarin	65.5 ± 4.7
	Potato	37.6 ± 1.7
	Green pepper	60.0 ± 1.4
	Hulled rice	28.3 ± 5.5
	Soybean	42.8 ± 1.3
	Purification (1,200 mg of $MgSO_4$, 400 mg of PSA, 400 mg of C_{18}, 45 mg of GCB)	Recovery ± RSD(%)
	Mandarin	89.1 ± 3.3
	Potato	94.7 ± 3.2
	Green pepper	92.8 ± 0.8
	Hulled rice	95.4 ± 1.4
	Soybean	88.1 ± 0.4

[1] Recovery ± RSD: Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

. 따라서 옥시테트라사이클린의 정량한계는 PLS 도입으로 잔류허용기준이 정해지지 않은 농산물의 경우 0.01 mg/kg 수준에 만족할 수 있는 충분한 감도로 확인되었다.

확립된 시험법을 이용하여 5종의 농산물 시료에 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배농도(0.01, 0.1, 0.5 mg/kg)로 5반복 회수율 실험을 통하여 시험법의 정확성 및 정밀성을 평가하였다. 그 결과 옥시테트라사이클린의 각 농도별 평균 회수율은 80.0~108.2%이었고, 상대표준편차는 11.4% 이하로 확인되었다(Table 6). 따라서 본 시험법은 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 부합하는 것으로 확인되었다. LC-MS/MS를 이용한 5종의 농산물 시료 중 옥시테트라사이클린의 회수율 크로마토그램을 Fig. 3에 제시하였다.

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대해 유효성을 검증하기 위하여 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 타 실험실에 동일하게 제공하여 분석한 회수율 및 상대표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 옥시테트라사이클린의 회수율은 81.2~104.3%, 상대표준편차는 9.8% 이하로 확인되었다. 두 실험실간의 회수율 결과에 따른 평균값은 83.5~103.2%이고, 변이계수(CV)는 14.1% 이하로 나타났다. 따라서 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)에

Table 6. Inter-laboratory validation results of analytical method for oxytetracycline residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1](%)		Ave[4] (%)	CV[5] (%)	LOQ (mg/kg)
		Lab. A[2]	Lab. B[3]			
Hulled rice	0.01	82.3 ± 5.0	104.3 ± 5.3	93.3	13.8	0.01
	0.1	80.0 ± 2.7	87.0 ± 5.5	83.5	6.5	
	0.5	84.7 ± 6.3	93.8 ± 5.6	89.3	8.2	
Potato	0.01	103.1 ± 9.6	99.5 ± 4.0	101.3	6.8	
	0.1	102.4 ± 9.1	81.2 ± 1.2	91.8	14.1	
	0.5	88.0 ± 7.9	88.8 ± 3.9	88.4	6.3	
Soybean	0.01	92.8 ± 9.7	92.1 ± 5.1	92.5	7.5	
	0.1	107.3 ± 3.0	86.5 ± 2.0	96.9	12.0	
	0.5	108.2 ± 4.4	91.0± 3.3	99.6	10.1	
Mandarin	0.01	107.4 ± 5.4	99.0 ± 6.8	103.2	6.9	
	0.1	81.4 ± 7.2	85.9 ± 1.9	83.7	6.4	
	0.5	91.8 ± 11.4	82.2 ± 3.1	87.0	10.5	
Green pepper	0.01	100.9 ± 7.6	91.3 ± 3.2	96.1	10.6	
	0.1	89.8 ± 7.1	103.2 ± 2.2	96.5	9.0	
	0.5	83.1 ± 5.8	98.9 ± 9.8	91.0	12.4	

[1] Recovery ± RSD: Mean values of 5 or 3 times repetitions with relative standard deviation
[2] Lab. A: Ministry of Food and Drug Safety
[3] Lab. B: Gwangju Regional Food and Drug Administration
[4] Ave.: Recovery average of inter-laboratory
[5] CV: Coefficient of variation of inter-laboratory

서 제시한 실험실간 검증 기준 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)에서 제시한 기준에 만족하여 모든 처리농도에서 두 가이드라인에 부합한 것을 확인하였다(Table 6). 따라서 본 연구에서 확립한 시험법은 식품공전에 수록하여 잔류허용기준을 통한 안전 관리 및 적부판정을 위한 시험법으로 적합할 것으로 확인된다.

Acknowledgement

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

옥시테트라사이클린은 침투이행성 살균제로 배추, 고추 등의 농산물에 무름병, 줄기속마름병에 효과가 있다. 본 연구는 농산물 중 기준신설 예정농약 옥시테트라사이클린이 농산물 대하여 등록되지 않아 이에 대한 공정시험법을 개발하기 위하여 수행되었다. 옥시테트라사이클린의 잔류물의 정의는 미국, 일본의 경우 농산물 대상으로 모화합물로 설정되어 있다. 현재, 국내에서는 농산물 중 옥시테트라사이클린의 잔류물의 정의 및 잔류허용기준이 설정되어있지 않고, 국내 농산물(고추 등)에 대한 잔류허용기준 신설이 최초 요청되었으며 국내 유통 농산물 중 잔류량에 대한 안전관리 확보를 위해 잔류물의 정의를 모화합물로 규정하고 적부판정을 위한 공정시험법을 개발하고자 하였다. 옥시테트라사이클린의 물리·화학적 특성을 고려하여 QuEChERS법을 이용한 추출 및 정제법을 최적화하여 LC-MS/MS에 의한 분석법을 확립하였다. 수용성 유기용매인 메탄올을 추출 용매로 사용하여 pH 조절 및 염화나트륨을 첨가하여 추출법을 최적화하고, d-SPE 흡착제를 이용하여 간섭물질을 효과적으로 제거하여 정제법을 확립하였다. 옥시테트라사이클린의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었고, 옥시테트라사이클린의 시험법 정량한계(LOQ)는 0.01 mg/kg이며, 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 LOQ (0.01 mg/kg), 10×LOQ (0.1 mg/kg), 50×LOQ (0.5 mg/kg) 수준으로 회수율 실험한 결과 평균 회수율($n=5$)은 80.0~108.2%이었으며 상대표준편차는 11.4%이하로 확인되었다. 또한 실험실간 검증 결과 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 83.5~103.2%이며 변이계수는 14.1% 이하로 조사되어, 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 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물 중 잔류할 수 있는 옥시테트라사이클린의 안전관리를 위한 공정시험법으로 활용 가능할 것이다.

References

1. MacBean, C.: A world compendium the pesticide manual, 16th edition (2012).
2. Chemicalize, Oxytetracycline. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (accessed March 2, 2019).
3. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), MRLs in Veterinary drugs (2019).
4. The Electronic Code of Federal Regulations. Available at https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=9ac8127ddce252beb81bbcf4a1eb720b&ty=HTML&h=L&mc=true&r=SECTION&n=se40.26.180_1665 (accessed March 2, 2019).
5. The Japan Food Chemical Rresearch Foundation. Available at http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=36950 (accessed March 2, 2019).
6. Environmental Protection Agency, Prevention, Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED) for Oxytetracycline (2006).
7. JMPR(Joint FAO/WHO Meeting on pesticide Residues) Review, Oxytetracycline (2002).
8. Saksit, S., Saranya, P., Chanat, C., Phanwimol, T., Jana, H., Mario, G., Kanista, S., Zhaowei, Z., Amnart, P.: Multiclass analysis of antimicrobial drugs in shrimp muscle by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Food Drug Anal,* **27**, 118-134 (2019).
9. Pena, A., Pelantova, N., Lino, C. M., Silveira, M.I.N., Solich, P.: Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection. A. *J. Agric. Food Chem.,* **53**, 3784-3788 (2005).
10. Kamal, M.K., Amgad, M.R., Lamia, R., Nermine, G.: Validation for simultaneous determination of tetracycline by using QuEChERS method and LC-MS/MS in liver of buffalo. *N Y Sci J.*, **10(6)**, (2017).
11. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code (2019).
12. CODEX Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis (2003).
13. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines on standard procedures for preparing analysis method (2016).
14. Claude, R. Mallet, Z.L. and Jeff, R.M.: A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **18**, 49-58 (2004).
15. Wilkowska, A., Biziuk, M.: Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.*, **125**, 803-812 (2011).