pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 3, pp. 234~240 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.3.234

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

HPLC-UVD를 이용한 농산물 중 Fluxapyroxad 잔류분석법 개발

권지은 · 김희정 · 도정아[1] · 박혜진 · 윤지영 · 이지영 · 장문익* · 이규식
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 잔류물질과, [1]첨단분석팀

Development of an Analytical Method for Fluxapyroxad Determination in Agricultural Commodities by HPLC-UVD

Ji-Eun Kwon, HeeJung Kim, Jung-Ah Do[1], Hyejin Park, Ji-Young Yoon, Ji-Young Lee, Moon-Ik Chang*, and Gyu-Seek Rhee
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Cheongwon, Chungbuk 363-700, Korea
[1]Advanced Analysis Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Cheongwon, Chungbuk 363-700, Korea
(Received April 8, 2014/Revised May 21, 2014/Accepted August 12, 2014)

ABSTRACT - Fluxapyroxad is classified as carboxamide fungicide that inhibits succinate dehydrogenase in complex II of mitochondrial respiratory chain, which results in inhibition of mycelial growth within the fungus target species. This study was carried out to assure the safety of fluxapyroxad residues in agricultural products by developing an official analytical method. A new, reliable analytical method was developed and validated using High Performance liquid Chromatograph- UV/visible detector (HPLC-UVD) for the determination of fluxapyroxad residues. The fluxapyroxad residues in samples were extracted with acetonitrile, partitioned with dichloromethane, and then purified with silica solid phase extraction (SPE) cartridge. Correlation coefficient(R^2) of fluxapyroxad standard solution was 0.9999. The method was validated using apple, pear, peanut, pepper, hulled rice, potato, and soybean spiked with fluxapyroxad at 0.05 and 0.5 mg/kg. Average recoveries were 80.6~114.0% with relative standard deviation less than 10%, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.01 and 0.05 mg/kg, respectively. All validation parameters were followed with Codex guideline (CAC/GL 40). LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer) was also applied to confirm the analytical method. Base on these results, this method was found to be appropriate fluxapyroxad residue determination and can be used as the official method of analysis.

Key words : fluxapyroxad, HPLC-UVD, LC-MS, official method of analysis

플룩사피록사드(Fluxapyroxad)는 carboxamide 계열의 살균제로 다양한 종류의 작물에 광범위하게 사용하도록 2012년 독일 BASF사에 의해 개발되었으며, 특히 곡류, 콩류, 인과류, 핵과류, 야채, 목화 등에 유효하게 사용된다. 플룩사피록사드는 사립체 호흡사슬체(mitochondrial respiratory chain)의 complex II 내 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase)를 억제하여, 식물체 내의 포자발아를 억제하고 발아관 및 균사의 성장을 막는 기전을 보인다[1].

플룩사피록사드는 토양과 수중 환경에서 서서히 분해되며 가수분해 및 광분해에 안정한 특성을 보인다. 토양에서의 반감기는 213~1,827일이며 수중 환경에서의 반감기는 420~731일로, 그 기간이 다소 길어 한 번 환경에 노출되면 농약이 잔류될 가능성이 높다고 할 수 있다. 또한, 수중 환경을 통한 이동성이 있어 표층 및 지하수 등을 통해 퍼지기 쉬운 특성이 있다[2]. 플룩사피록사드가 살충 효과를 통해 농작물의 생산성 및 품질을 향상시키는 데에 도움을 주는 농약이지만, 잔류성이 있고 화학적으로 안정한 특성상 농약이 오남용 될 경우 농산물에 잔류하여 인체에 해를 끼칠 우려가 있어 엄격한 관리가 필요한 농약이라고 할 수 있다[3,4].

최초로 플룩사피록사드가 개발된 이래, 2012년 미국에서는 사과, 쌀 등의 작물에 대해 0.01~30 mg/kg의 기준을 정하여 관리하고 있고, 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius

*Correspondence to: Moon-Ik Chang, Osong Health Administration Complex, 187 Osongsaengmyeong2-ro, Osong-eup, Cheongwon-gun, Chungchengbuk-do 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4204, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: 1004@korea.kr

Commission, Codex)와 일본에서는 아직 그 기준을 설정하지 않았다. 국내에서는 사과와 배에 대해 각각 0.8 mg/kg, 0.5 mg/kg의 잔류허용기준을 고시하였고[식약처 고시 제 2013-233호('13.11.12)], 고추, 대두 등에 대해 잔류허용기준이 설정될 예정이다.

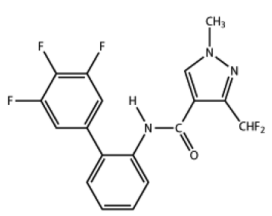
플룩사피록사드의 잔류여부를 판단하기 위해 그간 외국에서는 플룩사피록사드를 HPLC-MS/MS법으로 분석하였으며[5], BASF사에서는 HPLC-MS/MS와 UPLC-MS/MS법으로 분석한 사례가 있다[6]. 하지만, MS/MS기기는 고가의 장비로 국내의 모든 농약 분석기관에서 일반적으로 보유하기 어렵고 특히, 국내 유통되는 농산물은 제 외국과 다르기 때문에 기존의 분석법을 다양한 작물에 적용하는데 한계가 있으며, 국내 대표 농산물 특성에 맞게 간섭물질 제거가 이루어지는 전처리과정이 필요하여 본 연구에서는 플룩사피록사드의 안전관리를 위해 국내 실정을 고려하여 신속, 정확한 분석법을 확립하고자 하였다.

플룩사피록사드의 분자식은 $C_{18}H_{12}F_5N_3O$, 분자구조는 Fig. 1과 같으며, 분자량은 381.31, 증기압은 8.1×10^{-9} Pa(25°C)이고, n-octanol/water 분배계수(Log $P_{ow,}$ 25°C)는 3.13의 물리화학적 특성을 보인다. 플룩사피록사드의 분석법은 이러한 물리화학적 특성을 고려하여 개발되었으므로, 빠르고 정확한 분석법을 제공하여 국내 생산 및 향후 수입되는 농산물 중 잔류할 수 있는 플룩사피록사드에 대한 안전을 확보하는 데에 기여할 것이다.

재료 및 방법

시약 및 재료

플룩사피록사드(Fig. 1) 표준품(99.7%)은 BASF (Limburgerhof, Germany)에서 제공받아 사용하였고, HPLC grade의 아세토니트릴, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 등 용매는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 염화나트륨과 무수황산나트륨은 Wako (Osaka, Japan)로부터, 포름산은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 실리카(6 mL, 1 g) SPE 카트리지는 Waters (Milford, MA, USA)로부터 구입하였다. 검체는 사



Property	Content
IUPAC Name	3-(difluoromethyl)-1-methyl-N-(3',4',5'-trifluorobiphenyl-2-yl)pyrazole-4-carboxamide
Classification	fungicide
Molecular formula	$C_{18}H_{12}F_5N_3O$
Molecular weight	381.31
Log P_{ow}	3.13 (25°C)
Vapor pressure	8.1 x 10^{-9} Pa (25°C, Pa)
Solubility	acetone >250 acetonitrile 167.6 dichloromethane 146.1 ethylacetate 123.3 methanol 53.4 (g/L at 20°C)

Fig. 1. Molecular structure and physicochemical properties of fluxapyroxad.

과, 배, 고추, 현미, 대두, 감자 모두 시중에 판매하는 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 –50°C에 보관하여 사용하였다. 표준원액은 플룩사피록사드 표준품 10.03 mg을 아세토니트릴 20 mL에 용해하여 500 μg/mL(500 ppm)의 표준원액을 조제하고, 이를 아세토니트릴로 희석하여 0.1 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μg/mL의 표준용액을 제조하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

검체 20 g(곡류 및 콩류, 견과종실류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 검체 20 g, 과일류·채소류·서류는 약 1 kg을 분쇄한 검체 20 g, *회수율 측정 시에는 추출용매를 가하기 전에 대표농산물에 플룩사피록사드의 최종농도가 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg가 되도록 처리하였다)에 아세토니트릴 100 mL를 가하여 추출한 후 (곡류 및 콩류의 경우 물 30 mL를 넣어 2시간 방치) 진탕기에서 5분간 진탕하였다. 이를 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기로 흡인여과하고, 아세토니트릴 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내어 앞의 여액과 합한 후 40°C 이하의 수욕상에서 감압농축을 실시하였다. 농축액을 증류수 100 mL로 씻어서 500 mL 분액깔대기에 옮기고 포화식염수 10 mL 및 디클로로메탄 100 mL를 차례로 가한 후 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 후 디클로로메탄층을 무수황산나트륨에 통과시켜 감압농축플라스크에 받은 후 다시 디클로로메탄 50 mL를 가하여 위의 과정을 반복하였다. 이를 40°C 이하 수욕상에서 감압농축한 후 잔류물을 디클로로메탄 3 mL로 재용해하였다. 콩류, 견과종실류

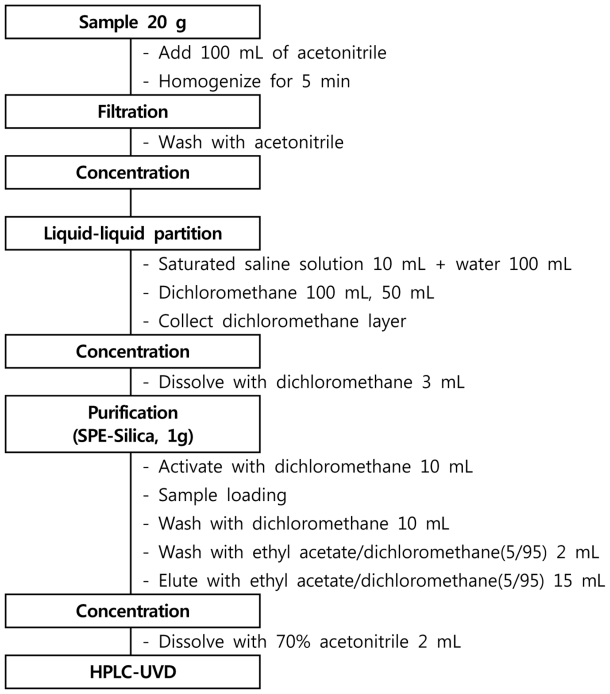


Fig. 2. Flow chart for fluxapyroxad analysis.

등 지방성 검체의 경우 상기 건고물을 아세토니트릴 포화 헥산 50 mL로 녹이고 500 mL 분액깔때기로 옮겨 헥산 포화 아세토니트릴 50 mL로 2회 분배 추출하여 아세토니트릴층을 40°C 이하 수욕상에서 감압 농축하는 과정을 추가하였다[7-9].

액-액 분배에 이어 카트리지 정제를 실시하였다. 실리카 카트리지에 디클로로메탄 10 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버렸다. 농축하여 디클로로메탄에 재용해한 액을 카트리지에 넣어 흡착시킨 후 고정상 상단이 노출되기 전에 디클로로메탄 10 mL 및 에틸아세테이트/디클로로메탄(5/95, v/v) 2 mL로 씻어 버리고 에틸아세테이트/디클로로메탄(5/95, v/v) 15 mL를 받은 시험액을 감압농축플라스크에 취하였다. 이를 40°C이하 수욕상에서 감압농축하고 70% 아세토니트릴 2 mL에 녹여 멤브레인 필터(PTFE 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다(Fig. 2).

기기분석

플룩사피록사드 분석을 위해 HPLC-PDA (High performance liquid chromatograph -photo diode array)기기를 사용하여 210 nm에서 400 nm까지 스캔한 결과, 플룩사피록사드에 대한 최대흡광파장이 230 nm로 확인되어 이를 분석 파장으로 선택하였다. Table 1에 기기분석 조건을 나타내었으며, 본 연구에서 개발한 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC-MS (Liquid chromatograph-mass spectrometer)를 이용하여 재확인 과정을 수행하였다(Table 2).

Table 1. Analytical conditions for the determination of fluxapyroxad residues

Instrument	HPLC-UVD (Waters 2695, Waters, USA)		
Column	Capcell Pack UG 120 C_{18} (5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm, Shiseido, Japan)		
Column temperature	25°C		
Mobile phase	min	acetonitrile (%)	Water (%)
	0	20	80
	10.5	70	30
	30	70	30
Flow	1.0 mL/min		
Detection	Absorption (230 nm)		
Injection volume	20 μL		

Table 2. Confirmative conditions for identifying fluxapyroxad

Instrument	LC-MS (Quattro Premier XE, Waters, USA)
Column	UG 120 C_{18} (3 μm, 2.0 mm I.D. × 150 mm, Shiseido, Japan)
Flow rate	0.3 mL/min
Mobile phase	0.2% formic acid in water/0.2% formic acid in methanol (10/90, v/v)
Column temperature	30°C
Ionization mode	ESI positive-ion mode
Cone voltage	25 V
Injection volume	5 μL

결과 및 고찰

HPLC-UVD 분석조건 확인

플룩사피록사드의 화학식은 $C_{18}H_{12}F_5N_3O$이고, 분자량은 381.31, 증기압은 8.1×10^{-9} Pa(25°C)로 물리화학적 특성상 증기압이 낮아 GC (Gas Chromatograph)로 분석이 어렵고, 아마이드기가 UV 영역에 흡광성을 나타내기 때문에 분석을 위한 기기로 HPLC-UVD를 선택하였다. 플룩사피록사드에 대한 최적 분석 파장을 선택하기 위해서 210 nm에서 400 nm까지 HPLC-PDA로 스캔한 결과, 230 nm가 최대흡수파장(λ_{max})으로 확인되어 이를 분석파장으로 선택하였다(Fig. 3). 분석을 위한 이동상은 증류수와 아세토니트릴 혼합용매의 비율을 다양하게 조절하여 비교한 결과, 플룩사피록사드에 대한 특이성, 선택성을 나타내는 용매조성은 증류수/아세토니트릴(30/70, v/v)이었으며, 50/50(v/v), 40/60(v/v) 비율에서도 플룩사피록사드에 대한 선택성은 있었으나 증류수의 비율이 높아질수록 피크의 모양이 넓어졌기 때문에 최적의 이동상 용매로 증류수/아세토니트릴(30/70, v/v)을 선택하였다. 그러나 이 비율의 이동상 용매로 분석하였을 때, 머무름 시간이 검체의 간섭물질과 겹치는 시간대에 나타났기 때문에 이를 개선하기 위해 10.5분 이후에 아세토니트릴의 비율을 높여, 13분대에서 간섭물질에 대한 영향을 받지 않는 머무름 시간을 확인하였다.

추출, 분배 및 정제과정의 확립

추출용매는 농약의 물리화학적 특성 중 대상성분의 극성도, 추출용매에 대한 용해도 등을 고려하여 결정한다. 대상성분에 대해 충분한 용해도를 보이는 용매를 선택해야 하지만, 정제과정의 간소화를 위해 간섭물질의 추출은

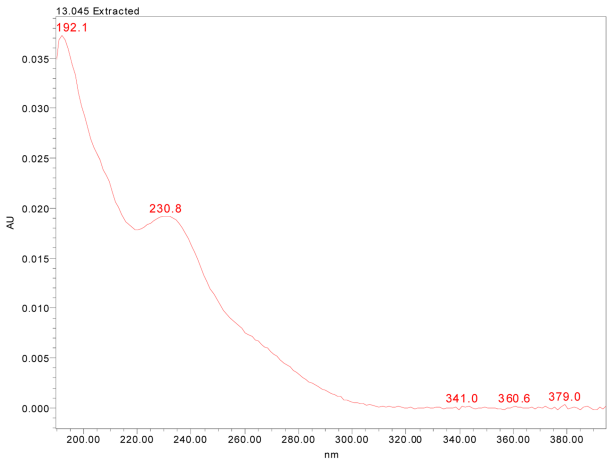


Fig. 3. HPLC-UVD spectrum of fluxapyroxad.

최대한 줄일 수 있는 용매를 선택하여야 한다[10]. 또한, 수분이 포함된 검체의 경우는 내부 침투성이 좋은 아세톤, 아세토니트릴, 메탄올 등의 수용성 유기용매를 사용하는 것이 유리하다[11]. 대상성분의 용해도에 대한 정보가 부족할 경우 옥탄올/물 분배계수($logP_{ow}$, 25°C)로 극성의 정도를 파악하여 용해도를 예측할 수 있다.

플룩사피록사드의 최적 추출 용매 선정을 위해 일반적으로 잔류농약 분석에 사용되는 추출용매인 아세톤, 아세토니트릴, 메탄올로 추출 효율을 비교하였다. 각 용매의 추출효율은 94%, 96%, 97%이었으나 용매의 장단점을 고려하여 추출 용매를 선정하였다. 메탄올의 경우 농축 시간이 길고 농축 시에 용매가 튀어 회수율이 낮아지는 단점이 있고, 아세톤의 경우 농축 시간은 짧다는 장점이 있지만 많은 간섭물질이 추출되어 정제과정이 복잡해지는 단점이 있기 때문에 본 연구에서는 지방 등의 공추출물이 적고 플룩사피록사드에 대해 추출 효율도 좋은 아세토니트릴을 선택하였다.

정제과정은 총 두 단계로 나눌 수 있다. 정제 1단계는 액-액 분배로 농약과 함께 추출된 검체에 존재하는 간섭물질을 광범위하게 제거하며, 정제 2단계는 카트리지 정제과정으로 1단계에서 제거되지 않은 간섭물질을 제거한다. 본 연구에서의 액-액 분배과정은 플룩사피록사드의 옥탄올/물 분배계수($logP_{ow}$, 25°C)가 3.13으로 비극성에 가까운 특성을 가지는 것을 고려해[11] 디클로로메탄으로 분배하였으며, 이때 다량의 물 (증류수 100 mL)을 첨가한 이유는 추출단계에서 얻은 아세토니트릴의 일부가 디클로로메탄과 섞이는 것을 막아 층이 확실히 분리되도록 하기 위해서이다. 또한 포화식염수를 소량 첨가하여 이온 강도를 증가시켜(salting-out, 염석현상) 농약이 디클로로메탄층으로 이동하도록 하였다.

잔류농약 분석에 많이 이용되는 플로리실(florisil), 실리카(silica), 아미노프로필(NH_2) 카트리지로 에틸아세테이트/디클로로메탄(10/90, v/v)과 에틸아세테이트/디클로로메탄(30/70, v/v)의 정제 효율을 비교해 본 결과, 실리카 카트리지가 가장 높은 회수율을 보였다(Table 3: Experiment 1). 보다 효과적인 정제 효율을 알아보기 위해 용매 조성을 에틸아세테이트 100%, 디클로로메탄 100%, 에틸아세테이트/디클로로메탄(5/95, v/v), 에틸아세테이트/디클로로메탄(15/85, v/v), 에틸아세테이트/디클로로메탄(20/80, v/v)으로 세분화하여 각 용매 조성에 대해 5 mL씩 4단계를 받아 정제 테스트를 진행한 결과 Table 3: Experiment 2와 같은 회수율을 보였다. 로딩한 3 mL에서 농약이 검출되지 않은 것으로 보아 디클로로메탄에 재용해한 용액 내의 농약이 모두 카트리지에 흡착한 것을 예측할 수 있다. 정제 효율 결과표를 비교해 볼 때 최종적으로 간섭물질을 최대한 제거하면서 약제의 회수율을 높이기 위해 디클로로메탄 10 mL로 카트리지를 세척한 후 에틸아세테이트/디클로로메탄(5/95, v/v) 2 mL로 씻어내고 에틸아세테이트/디클로로메탄(5/95, v/v) 15 mL로 용출하는 정제법을 선택하였

Table 3. Comparisons of SPE cartridge and elution solvents for fluxapyroxad analysis

<Experiment 1>

		Fraction	Florisil (%)	Silica (%)	NH_2 (%)
EA / DCM	10:90	1 (loading 3 mL)	-	-	-
		2 (5 mL)	98.8	29.8	93.6
		3 (5 mL)	-	74.2	9.8
		4 (5 mL)	-	3.3	-
		5 (5 mL)	-	-	-
Total			98.8	107.3	103.4
EA / DCM	30:70	1 (loading 3 mL)	-	-	-
		2 (5 mL)	97.1	93.3	95.4
		3 (5 mL)	-	14.3	5.7
		4 (5 mL)	-	-	-
		5 (5 mL)	-	-	-
Total			97.1	107.6	101.1

<Experiment 2>

		Fraction	Silica (%)
EA	100	1 (loading 3 mL)	-
		2 (5 mL)	57.3
		3 (5 mL)	-
		4 (5 mL)	-
		5 (5 mL)	-
Total			57.3
DCM	100	1 (loading 3 mL)	-
		2 (5 mL)	-
		3 (5 mL)	-
		4 (5 mL)	-
		5 (5 mL)	-
Total			0
EA / DCM	5:95	1 (loading 3 mL)	-
		2 (5 mL)	-
		3 (5 mL)	82.4
		4 (5 mL)	18.2
		5 (5 mL)	-
Total			100.6
EA / DCM	15:85	1 (loading 3 mL)	-
		2 (5 mL)	70.7
		3 (5 mL)	29.4
		4 (5 mL)	-
		5 (5 mL)	-
Total			100.3
EA / DCM	20:80	1 (loading 3 mL)	-
		2 (5 mL)	83.1
		3 (5 mL)	17.9
		4 (5 mL)	-
		5 (5 mL)	-
Total			101.0

으며 이 방법으로 실험한 결과 간섭물질로부터 플룩사피록사드를 효과적으로 정제할 수 있었다.

표준곡선의 직선성 및 상관계수

플룩사피록사드의 직선성(Linearity)을 구하기 위해 아세토니트릴로 희석하여 제조한 0.1 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μg/mL의 플룩사피록사드 표준용액을 위에서 제시한 HPLC 분석조건으로 측정한 결과(Fig. 4), 표준곡선의 상관계수(R^2)는 0.9999로 양호한 직선성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5).

검출한계와 정량한계

본 연구에서 확립한 분석조건에서의 플룩사피록사드에 대한 분석기기의 검출한계(LOD, Limit of Detection)와 정량한계(LOQ, Limit of Quantitation)를 구하였다. 검출한계는 최소 검출량이 2.0 ng(S, signal/N, Noise = 3)이었고 아래의 계산식에 따라 0.01 mg/kg으로 나타났으며, 정량한계는 최소 검출량이 10 ng(S/N = 10)으로 아래의 계산식에 따라 0.05 mg/kg으로 나타났다. 국내 정량한계 범위는 국제기준을 수용하고 있으며, 유럽연합에서 규정하고 있는 분석법의 정량한계 기준에 따르면 본 시험법의 정량한계인 0.05 mg/kg가 국제 기준에 적합함을 확인할 수 있었다[11].

LOD 및 LOQ(mg/kg) = [최소검출량(ng)/주입량(μL)] × [최종희석부피(mL)/시료량(g)]

$$LOD = [2.0(ng)/20(\mu L) \times 2(mL)/20(g) = 0.01$$

$$LOQ = [10(ng)/20(\mu L) \times 2(mL)/20(g) = 0.05$$

분석법 확립을 위한 회수율 확인

분석법의 정확성과 선택성을 확인하기 위해 국내 잔류허용기준이 각각 0.8 mg/kg, 0.6 mg/kg으로 신설 고시된 사과, 배를 포함하여 현미, 감자, 대두, 땅콩에 대해 본 연구에서 개발한 분석법에 의한 회수율 실험을 수행하였다. 처리농도 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg에서 5회 반복하였으며, 각 농도에서의 평균 회수율 및 상대표준편차는 각각 80.64~113.96%, 10% 미만으로 나타나(Table 4) 코덱스 가이드라인(CAC/GL 40)인 회수율 70~120%, 상대표준편차 10% 미만에 부합하는 것을 확인할 수 있었다[12]. 또한, 농산물에는 많은 간섭물질이 있으나 본 연구에서 확립한 추출, 분배, 정제조건을 적용하여 실험한 결과, 무처리군과 처리군의 크로마토그램을 비교하였을 때(Fig. 6) 플룩사피록사드의 머무름 시간에 간섭물이 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

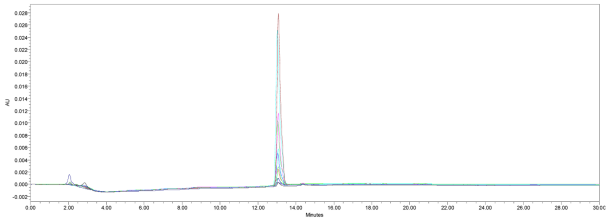


Fig. 4. HPLC-UVD chromatograms of fluxapyroxad standard solution.

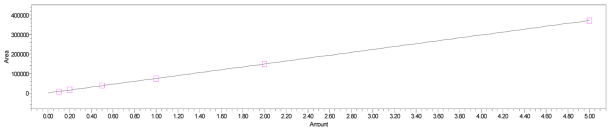


Fig. 5. Calibration curve of fluxapyroxad standard solution.

LC-MS를 이용한 분석법의 재확인

플룩사피록사드 분석법에 대한 신뢰성과 선택성을 검증하기 위해 LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer)를 이용하여 재확인하였으며, 분석을 위한 조건은 Table 2에 나타내었다. LC-MS를 통해 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 토막이온(fragment ion)을 확인하므로 보다 정확한 정성분석이 가능하다[13,14]. 사용된 LC-MS는 전자분무 이온화법(electrospray ionization)을 사용하였고 이는 용매와 분석물이 함께 섞인 액체 용액에 고전압을 가하여 이온화시키는 방법으로 위의 분석조건에서 얻은 총이온 크로마토그램(total ion chromatogram, TIC)과 질량 스펙트럼(Fig. 7)으로 선택이온 모니터링(selected-ion monitoring, SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 플룩사피록사드 표준용액(1.0 μg/mL)을 10 μL/min 속도로 질량검출기에 직접 주입한 결과, 382인 $(M+H)^+$의 형태로 나타났다. 382 m/z가 최적화되도록 콘전압(cone voltage, 10~70 V)를 조절해 조건의 최적화 작업을 하여 기기 조건을 설정하였다. 플룩사피록사드의 질량스펙트럼을 분석한 결과 25 V의 콘전압에서 382 m/z이 최적화됨을 알 수 있었고 이때 머무름 시간은 4.3분이었다(Table 5).

Table 4. Validation results of analytical method for the determination of fluxapyroxad residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD* (%)	LOQ (mg/kg)
Apple	0.05	110.6 ± 3.3	0.05
	0.5	114.0 ± 8.2	
Pear	0.05	106.5 ± 7.6	
	0.5	97.8 ± 9.8	
Pepper	0.05	80.6 ± 4.3	
	0.5	102.7 ± 0.1	
Hulled rice	0.05	102.2 ± 4.4	
	0.5	105.7 ± 5.3	
Soybean	0.05	105.4 ± 8.5	
	0.5	92.6 ± 8.0	
Potato	0.05	83.0 ± 8.0	
	0.5	105.4 ± 1.7	

*Mean values of 5 times repetitions with standard deviation.

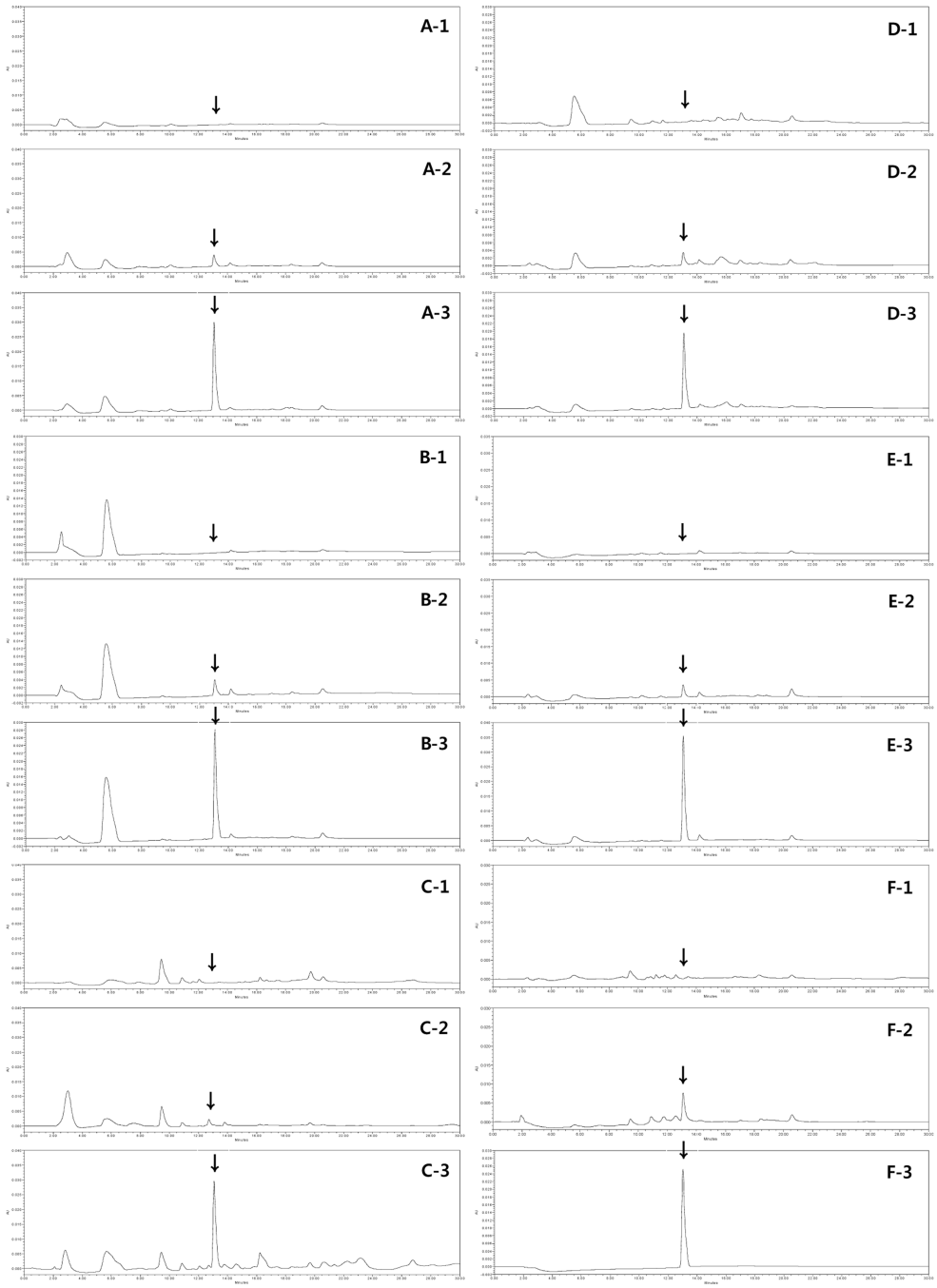


Fig. 6. HPLC-UVD chromatograms correponding to apple (A): pear (B): pepper (C): hulled rice (D): soybean (E): potato (F): control (1): spiked at 0.05 mg/kg (2): spiked at 0.5 mg/kg (3).

Table 5. Selected-ion of LC-MS for fluxapyroxad

Retention time (min)	Molecular weight	Exact mass	Fragment monitored (m/z)
4.3	381.3	381	382

요 약

플룩사피록사드는 카복사마이드계 살균제로 효소 작용을 억제하여 식물체 내 존재하는 균사의 성장을 막는 역할을 한다. 2012년 미국에서 최초로 사용 등록 되었으며 국내에서는 국외의 기준 요청 및 수입식품의 안전관리를 위해 사과, 배에 잔류허용기준이 고시되었다. 플룩사피록사드는 증기압이 낮아 GC로의 분석이 어렵고, 아마이드기를 가지고 있는 구조적 특징을 이용해 UV 영역 특정파장에서 흡광도를 나타낼 것으로 판단되어 분석을 위한 기기로 HPLC-UVD를 선택하였다. 추출용매로는 추출효율을

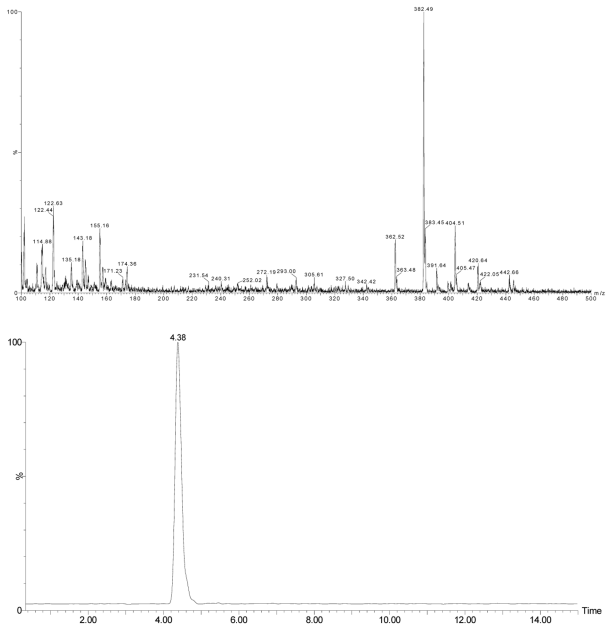


Fig. 7. Full scan mass spectrum of fluxapyroxad and chromatogram of fluxapyroxad standard solution at 1.0 μg/mL.

비교하고, 각 용매의 장단점을 비교하여 아세토니트릴로 하였고, 2단계의 정제 과정을 통해 간섭물질을 효과적으로 제거하였다. 정제 1단계는 액-액 분배로 증류수, 디클로로메탄, 포화식염수를 이용한 층분리를 통해 극성의 간섭물질을 제거하였고, 정제 2단계는 실리카 카트리지를 이용하여 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액의 정제효율을 비교하여 디클로로메탄 10 mL와 에틸아세테이트/디클로로메탄(5/95, v/v) 2 mL로 씻어내고 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액(5/95, v/v) 15 mL로 용출하는 것을 선택하였다. 이 때 본 분석법에 의한 플룩사피록사드의 정량한계는 0.05 mg/kg, 검출한계는 0.01 mg/kg으로 나타났다. 개발한 분석법의 선택성과 정확성을 검증하기 위해 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg의 처리농도로 회수율 실험을 한 결과, 평균 회수율이 80.64~113.96%, 분석오차는 10% 미만으로 나타나 코덱스 가이드라인(CAC/GL 40)에 적합하였다. 또한 본 연구에서 개발한 분석법이 공정분석법으로의 신뢰성을 갖기 위해 LC-MS를 이용하여 재확인 시험을 수행하였으며, 그 결과 382 m/z가 최적화됨을 확인하였다. 따라서 플룩사피록사드의 안전관리를 위해 선택적이고 신뢰성 있는 분석법으로 적극 활용될 것이다.

감사의 말

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발과제의 연구개발비 지원(13161식품안001)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Pesticide fact sheet: Fluxapyroxad, Environmental Protection Agency (EPA), pp. 2 (2012).
2. Pesticide fact sheet: Fluxapyroxad, Environmental Protection Agency (EPA), pp. 5~6 (2012).
3. 황래홍, 김애경, 정보경, 이재규, 신재민, 박영혜, 김민정, 박경애, 윤은선, 김무상: 쌀의 세척 및 취반에 따른 잔류농약의 제거, 한국식품위생안전성학회지, **28**, 31-35 (2013).
4. 도정아, 권지은, 이은미, 김미라, 국주희, 조윤제, 강일현, 김형수, 권기성, 오재호: HPLC-PDA를 이용한 국내 유통 농산물 중 amectoctradin 잔류량 분석법 개발 및 검증, 한국식품과학회지, **45**, 285-292 (2013).
5. Setting of new MRLs for fluxapyroxad (BAS 700 F) in various commodities of plant and animal origin, European Food Safety Authority (EFSA), Parma. Italy, **9**, pp. 11 (2011).
6. Lehmann A., Mackenroth C.: Validation of BASF metho No. L0137/01 in plant matrices, BASF SE, Limburgerhof, Germany (2009).
7. AOAC: Pesticide and industrial chemical residues, In official method of analysis, 17th Ed, 1-88, AOAC International Arlington, VA, USA (2000).
8. US FDA: Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multi residue Methods, 3rd Ed. US Food and Drug Administration, USA (1999).
9. MFDS: Korea Food Code, Korea Ministry of Food and Drug Safety, Seoul, Korea (2011).
10. Kwon C.H., Lee Y. D., Im M. H.: Simultaneous determination of orysastrobin and its isomers in rice using HPLC-UV and LC-MS/MS, J. Agr. Food Chem, **59**, 10826-10830 (2011).
11. 이영득: 식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서, 식품의약품안전처, pp. 22, 79 (2012).
12. Codex Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rome, Italy (2003).
13. 이수진, 김영학, 송이슬, 황영선, 임정대, 손은화, 임무혁, 도정아, 오재호, 권기성, 이중근, 이영득, 정명근: HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 fenoxycarb pyriproxyfen 및 methoprene의 분석법 확립, 한국농약과학회지, **15**, 254-268 (2011).
14. 권찬혁, 장문익, 임무혁, 최훈, 정다이, 이수찬, 유진영, 이영득, 이종옥, 홍무기: 고성능액체크로마토그래피를 이용한 농산물 중 Mandipropamid의 잔류분석법 확립, 한국분석과학회지, **21**, 518-525 (2008).