pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 2, pp. 115~123 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.2.115

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

QuEChERS법과 LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Fenpropimorph 시험법 개발 및 검증

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

Development and Validation of an Analytical Method for Fenpropimorph in Agricultural Products Using QuEChERS and LC-MS/MS

Han Sol Lee, Jung-Ah Do*, Ji-Su 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 January 30, 2019/Revised February 12, 2019/Accepted February 21, 2019)

ABSTRACT - An analytical method was developed for the determination of fenpropimorph, a morpholine fungicide, in hulled rice, potato, soybean, mandarin and green pepper using QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) sample preparation and LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry). The QuEChERS extraction was performed with acetonitrile followed by addition of anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride. After centrifugation, d-SPE (dispersive solid phase extraction) cleanup was conducted using anhydrous magnesium sulfate, primary secondary amine sorbents and graphitized carbon black. The matrix-matched calibration curves were constructed using seven concentration levels, from 0.0025 to 0.25 mg/kg, and their correlation coefficient (R^2) of five agricultural products were higher than 0.9899. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.001 and 0.0025 mg/kg, respectively, and the limits of quantification for the analytical method were 0.01 mg/kg. Average recoveries spiked at three levels (LOQ, LOQ×10, LOQ×50, n=5) and were in the range of 90.9~110.5% with associated relative standard deviation values less than 5.7%. As a result of the inter-laboratory validation, the average recoveries between the two laboratories were 88.6~101.4% and the coefficient of variation was also below 15%. All optimized results were satisfied the criteria ranges requested in the Codex guidelines and Food Safety Evaluation Department guidelines. This study could serve as a reference for safety management relative to fenpropimorph residues in imported and domestic agricultural products.

Key words : Pesticide, Fenpropimorph, Morpholine fungicide, Agricultural product, Analytical method

모르폴린계 살균제는 침투성 살균제로 식물의 뿌리나 잎을 통해 흡수되어 세포벽 주변인 아포플라스트까지 전이된다[1]. 식물 전체에 이행된 모르폴린계 농약의 유효성분은 스테롤 생합성을 저해하여 곡류와 채소류에 발병하는 녹병과 흰가루병 및 바나나에 발병하는 시가토카(Sigatoka)병을 방제하는 데 우수한 효과를 지닌 것으로 알려져 있다. 모르폴린의 살균성은 1965년에 처음 보고 되었으며 그 이후로 식물 병원균 방제를 위하여 fenpropimorph, dodemorph, tridemorph 등이 시판되었다. Fenpropimorph ((±)-cis-4-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylpropyl]-2,6-dimethylmorpholine)는 균류 원형질막의 주성분인 에르고스테롤의 생합성을 저해하며 휘발성이 있어 강한 훈증작용을 나타내고, R, S 거울상 이성질체가 존재하여 라세미 혼합물(Racemic mixture)로 사용되고 있다[2,3]. 물리·화학적 특성으로는 n-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 pH 1에

*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

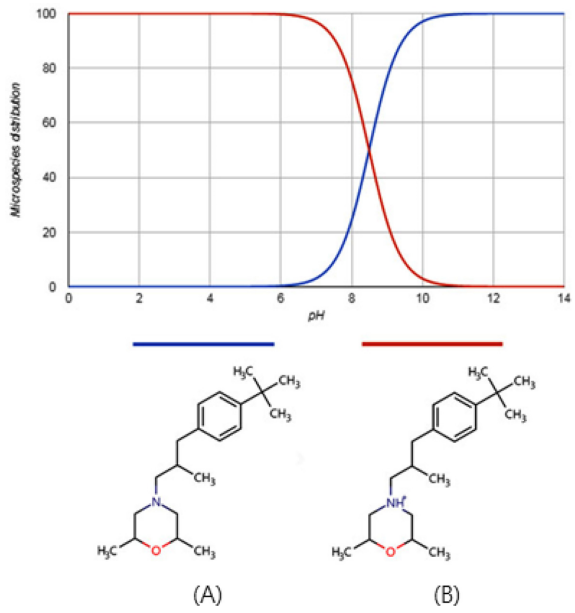


Fig. 1. pKa graph of fenpropimorph; (A) uncharged and (B) positive charged.

서는 2.10, pH 9에서는 5.18로 pH가 높아질수록 비극성을 띠고[4], Fig. 1의 pKa 그래프에서 볼 수 있듯이 약 pH 10 이상에서는 전하를 띠지 않아 비해리 상태로 존재하는 안정한 화합물이다[5].

현재 국내에는 농산물 중 fenpropimorph의 잔류물의 정의 및 잔류허용기준(Maximum Residue Limits; MRL)이 설정되어 있지 않고, 수입식품 바나나에 대한 잔류허용기준 신설이 요청된 상태이다. Fenpropimorph에 대한 국외 잔류허용기준은 유럽, 미국, 일본 등에서 각각 0.01~3.0(쌀 등 378품목), 2.0(바나나) 및 0.01~2.0(쌀 등 160품목) mg/kg으로 설정되어 있으며, 잔류물의 정의는 유럽의 경우 이성질체의 합으로 정의하고 있고 미국과 일본의 경우 모화합물을 잔류물로 정하여 관리하고 있다[6-8]. 우리나라는 2019년 1월 1일부터 허용물질목록관리제도(Positive List System; PLS)가 모든 농산물을 대상으로 확대 시행되었다. 이에 따라 국내 재배 농산물 또는 수입 농산물 유통 시 다양한 농산물의 기준 적부 판정과 부적합률을 낮추기 위한 잔류허용기준 마련이 시급하고, 우선 잔류농약 분석 및 검사를 위한 공정시험법이 개발되어야 한다. 시험법은 PLS 제도 시행에 따라 0.01 mg/kg 이하의 정량한계 수준을 만족하여야 하며 실험자에게 안전하고 신속, 간편한 분석법이어야 한다.

QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)법은 실험 단계가 간편하면서도 실험 과정에서 유기용매의 사용량이 적어 실험자에게 노출되는 부분에서 안전하고 환경적, 경제적인 측면에서 앞서 언급한 요구사항에 적합한 방법임을 알 수 있다. QuEChERS법은 2003년 과일류 및 채소류의 잔류 농약 다성분 분석을 위해 개발되었으며, 시료에 acetonitrile과 magnesium sulfate anhydrous 및 sodium chloride같은 염을 첨가하여 농약을 추출하고 d-SPE (dispersive-Solid Phase Extraction) 과정을 통해 정제하는 방법이다[9]. QuEChERS법은 처음 개발된 이후 다양한 방법으로 변형되었고 pH에 민감한 농약 성분을 위하여 acetate 혹은 citrate 버퍼를 이용하여 pH를 조절하거나 시료의 특성에 따라 acetonitrile과 methanol 또는 물을 혼합하여 추출 용매를 조절하는 방법이 고안되었다[10-13].

Fenpropimorph 시험법에 관한 국외 연구로는 Lehotay 등[14]이 오렌지와 상추 중 농약 229종을 QuEChERS법과 LC-MS/MS 및 GC-MS/MS를 이용하여 분석한 연구 보고가 있으며, 그 중 fenpropimorph는 LC-MS/MS로 분석하여 90~110%의 회수율(표준편차 10% 이하)을 보였다. 또한 Walorczyk 등[15]은 밀과 배합사료 중 fenpropimorph를 포함한 농약 140종을 QuEChERS법에 citrate 버퍼를 적용하여 GC-MS/MS로 분석한 연구가 있다. Carneiro 등[16]은 바나나 중 128종 농약을 QuEChERS법을 변형하여 분석하였으며 d-SPE 정제 과정을 생략하고 acetic acid가 첨가된 acetonitrile과 magnesium sulfate anhydrous, sodium acetate를 이용한 1회 추출 후, 시료 중 남은 수분을 제거하기 위하여 원심분리한 상층액에 magnesium sulfate anhydrous를 첨가하였다. 하지만 이들의 연구는 오렌지, 밀 등의 한정된 시료만 분석 가능한 시험법이므로 두류, 서류 등에는 적용 가능하지 않은 시험법이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에 기준 신설 예정인 fenpropimorph의 수입 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 검체

Fenpropimorph 표준품은 원제회사인 BASF (Ludwigshafen, Germany)에서 제공받아 사용하였고, methanol 및 acetonitrile은 Merck (Darmstadt, Germany)사로부터 HPLC 등급을 구입하여 사용하였다. QuEChERS 전처리 중 추출 단계에 필요한 시약인 $MgSO_4$ (Anhydrous magnesium sulfate)와 NaCl (Sodium chloride)은 각각 Junsei (Tokyo, Japan)와 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, d-SPE 정제 단계에 필요한 시약인 PSA (Primary Secondary Amine)와 GCB (Graphitized Carbon Black)는 각각 Agilent Technologies (California, USA)와 Waters(Leinster, Ireland)에서 구입하였다. 기기분석 시 이동상에 첨가하는 formic acid는 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였고, 실린지 필터(Nylon, 0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma (Barcelona, Spain)로부터 구

입하였다. 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 하였다.

농약표준원액 및 표준용액 조제

Fenpropimorph (99.6%) 표준품 20.08 mg을 20 mL의 methanol에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하고 이를 methanol로 희석하여 100 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 검량선을 위한 표준용액은 100 μg/mL을 희석하여 10 μg/mL의 중간표준용액을 조제한 뒤 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.25 및 2.5 μg/mL으로 단계적으로 희석하였다. 정량을 위한 matrix-matched 검량선은 methanol에 용해된 7 point 각각의 표준용액 100 μL에 농산물 검체 무처리 추출액 900 μL를 첨가하여 90% 이상의 matrix가 첨가되게 하였다. 표준용액은 실험시 즉시 만들어 사용하였으며, 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

QuEChERS 전처리

균질화된 각각의 검체 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류 및 두류의 경우 증류수 5 mL를 넣어 습윤화하고 방치하지 않음) acetonitrile 20 mL를 가한 후 진탕기(Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Eyela MMV-1000W, Bunkyo, Japan)를 이용하여 10분간 추출하였다. 여기에 $MgSO_4$ 6 g과 NaCl 1.5 g을 첨가하여 1분간 손으로 강하게 흔든 뒤 원심분리기(Thermo Fisher Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Dreieich, Germany)를 사용하여 4,000 × *G*에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상징액 1 mL를 $MgSO_4$ 150 mg과 PSA 25 mg, GCB 25 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 넣어 30초간 vortexing하고 이를 4,000 × *G*에서 10분간 원심분리 하였다. 정제된 상징액을 nylon 실린지 필터로 여과하고 최적화된 LC-MS/MS 기기조건에 따라 분석하였다.

기기분석 조건

Fenpropimorph는 Waters (Milford, MA, USA)의 Acquity UPLC-Xevo TQ-S LC-MS/MS와 Unison UK-C_{18} (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 μm) 칼럼을 선택하여 분석하였다. 이동상은 0.1% formic acid가 포함된 acetonitrile과 물을 사용하여 최적화된 기울기 용리 방식으로 대상성분을 분리하였고, 정량 분석을 위해 LC-MS/MS의 ESI (electrospray ionization) positive mode로 최적의 정량이온과 정성이온을 선택한 후 cone voltage 및 collision energy 값을 선정하였다.

시험법 유효성 검증

확립된 시험법의 선택성, 직선성, 기기상 검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한계(Limit of quantitation, LOQ), 시험법 정량한계, 정확성 및 반복성, 재현성을 검증하였다. 선택성은 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하고, 직선성은 matrix-matched 표준용액을 분석하여 각 피크 면적으로 검량선을 작성하고 결정계수(Correlation coefficient, 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 시료량 및 추출용매량을 이용하여 산출하였다. 시험법의 정확성 및 반복성은 5종의 농산물에 시험법 정량한계 수준과 정량한계 10배 및 50배의 수준에 해당하는 표준용액(0.25, 2.5, 12.5 μg/mL) 200 μL를 첨가한 후 분석하여 5반복 실험의 회수율(Recovery) 평균과 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)를 구하여 평가하였고, 재현성은 외부기관과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 실시하여 확인하였다.

Results and Discussion

추출 및 정제 과정 최적화

QuEChERS법을 이용한 추출 및 정제 과정을 확립하기 위하여 Anastassiades 등[9]이 개발한 original법과 acetate 및 citrate 버퍼를 이용한 QuEChERS법을 비교 실험하였다. QuEChERS법에서 사용하는 용매인 acetonitrile은 검체 내부로의 침투성을 용이하게 하는 수용성 유기용매이면서 유지에 대한 용해도가 낮아 농약 분석에 일반적으로 사용되고 있다[17]. 추출 및 정제 과정을 확립하기 위한 실험법에 대한 흐름도는 Fig. 2와 같으며, 감귤 시료를 이용하여 각 실험법에 해당하는 추출 과정을 거친 뒤 d-SPE 정제 조건을 확립하였다. 정제 조건은 original법의 d-SPE 조건인 $MgSO_4$ 150 mg과 PSA 25 mg을 기본으로 사용하면서 다른 종류의 흡착제인 C_{18} (Octadecysilane) 및 GCB를 각각 25 mg 씩 첨가하여 0.01 mg/kg 수준에서 3반복으로 회수율 시험을 실시하여 정제 효율을 비교하였다. 이 때, d-SPE 과정에서 $MgSO_4$는 추출 후 시료에 남아있는 물을 제거하여 추출물의 극성도를 낮아지게 하며 1차 및 2차 아미노 그룹이 포함된 PSA는 (+) 전하를 띠는 작용기가 있어 추출물 중 (-) 전하를 띠는 유기산 등을 제거한다[9]. 또한 C_{18}은 지질과 같은 비극성 간섭 물질을 제거하며 GCB는 식품에 함유된 스테롤 뿐만 아니라 클로로필, 카로티노이드 같은 색소를 효과적으로 제거한다[18].

실험 결과 original법이 평균 96.8%로 추출 효율이 가장 높았으며, citrate 버퍼를 이용한 방법이 평균 85.9%로 가

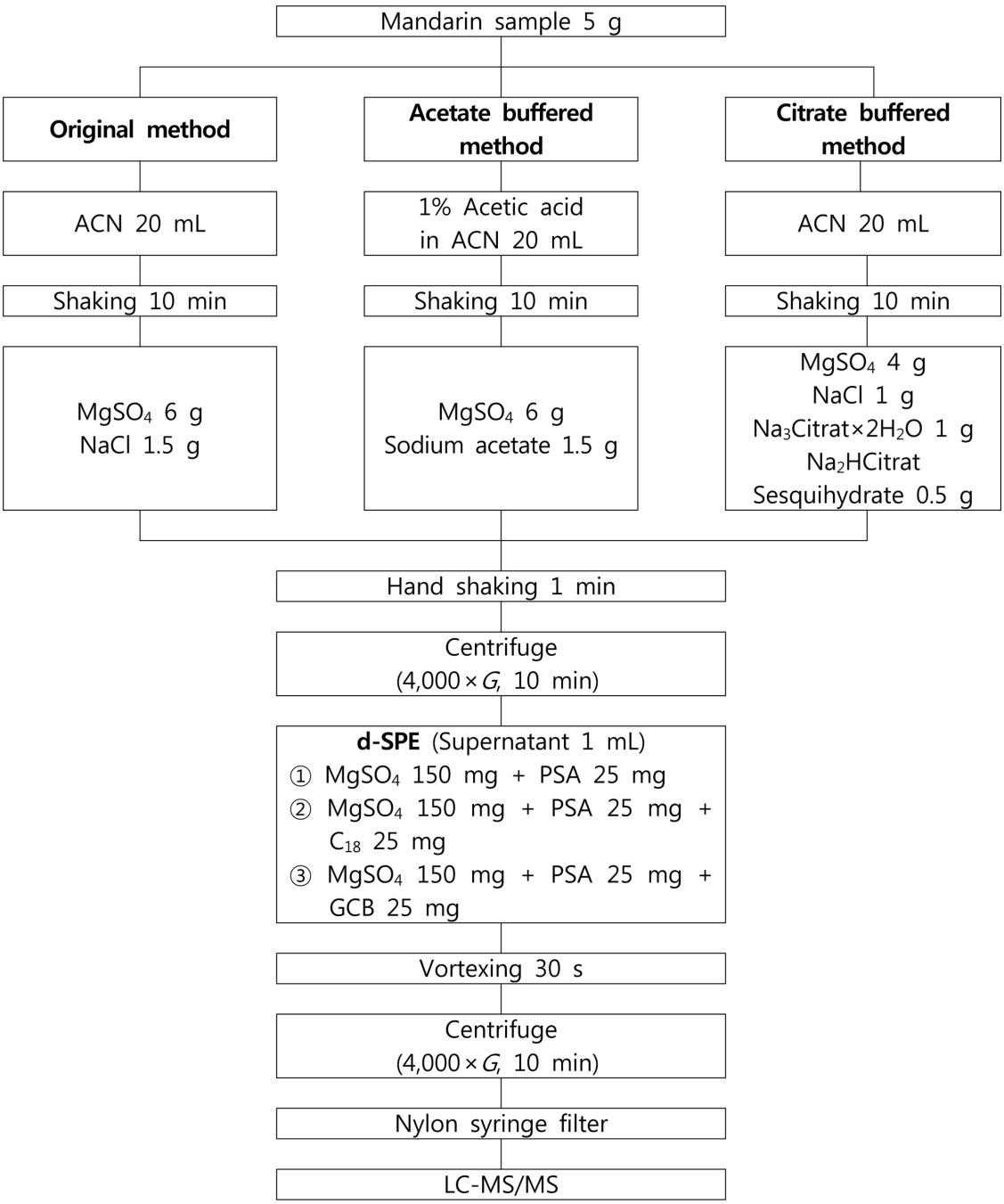


Fig. 2. Flow chart of three QuEChERS methods for analysis of fenpropimorph.

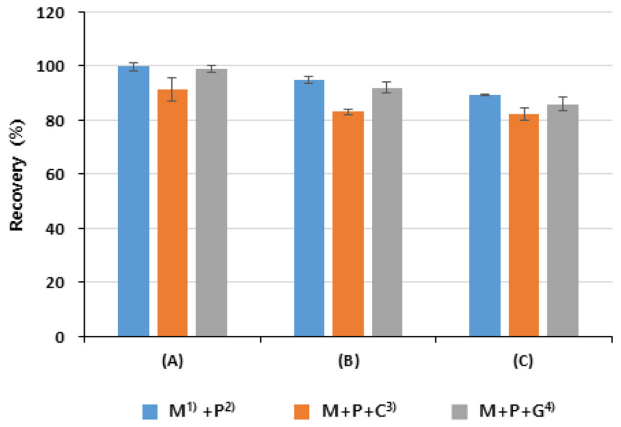
장 낮았다. 정제 효율은 세 가지 방법 모두 $MgSO_4$와 PSA만을 첨가하였을 때와 GCB를 추가적으로 첨가하였을 때의 회수율 차이가 크게 나타나지 않았고, C_{18}을 사용하였을 때 회수율이 다소 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3). 따라서 본 시험법에서는 QuEChERS original법과 $MgSO_4$ 및 PSA, GCB를 이용한 d-SPE를 통해 다양한 매트릭스 간섭물질로부터 fenpropimorph를 효과적으로 추출 및 정제할 수 있었다.

기기분석조건 확립

Fenpropimorph는 pH가 높아질수록 비극성을 띄며, 구조상 방향족 탄화수소인 벤젠고리를 포함하고 있어 LC로 분석이 가능할 것으로 판단되었다. 따라서 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 PLS 도입에 따른 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보 할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 분석용

칼럼은 C_{18} 역상칼럼을 선택하였고, 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 fenpropimorph 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 최적 기기분석 확립 조건은 Table 1과 같다.

Fenpropimorph 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량분석기에 직접 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 90~600의 질량 대 전하비(*m/z*) 범위로 MS scan을 수행하였고, 관측질량이 303.26인 fenpropimorph에 대하여 질량이 $[M+H]^+$형태인 304.28 *m/z* 값을 확인하였다. 이 때 10~80 V의 cone voltage 변화에 따른 최적화 과정을 통해 16 V에서 최대의 피크 강도가 나타남을 확인하였다. 두번째로 대상 성분의 생성이온을 확인하기 위해 최적화된 cone voltage 조건인 16 V에서 90~600 *m/z*의 범위로 daughter scan을 수행하였다. 이 때 가장 좋은 감도를 보이는 선구 이온 147.29 *m/z*을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 선구 이온 116.25, 130.28 *m/z*을 정성이온(qualification ion)으로 설정하였고 collision cell에서의 5~50 eV의 collision energy 변화에 따른 정량이온의 세기는 36 eV에서 최대를 나타내었다. 질량분석기 최적의 분석조건은 Table 2에 나타내었다.



1)M: $MgSO_4$(Anhydrous magnesium sulfate)
2)P: PSA(Primary Secondary Amine)
3)C: C_{18}(Octadecysilane)
4)G: GCB(Graphitized Carbon Black)

Fig. 3. Recovery comparison among the QuEChERS (A) original method, (B) acetate buffered method and (C) citrate buffered method for the determination of fenpropimorph.

Table 1. LC-MS/MS analytical conditions for fenpropimorph

Condition	Content		
Instrument	LC: Acquity UPLC MS/MS: Xevo TQ-S		
Chromatographic separation			
Column	Unison UK-C_{18} (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	2 μL		
Column temp.	30°C		
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in water B: 0.1% Formic acid in acetonitrile		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	95	5
	2.0	95	5
	3.0	5	95
	5.0	5	95
	5.1	95	5
	7.0	95	5
MS/MS parameters			
Capillary	3 kV		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	500°C		
Desolvation gas flow	1,000 L/hr		
Cone gas flow	150 L/hr		

Table 2. Exact mass, precursor and product ions, cone voltage, collision energy and retention time of fenpropimorph for analysis in ESI positive mode

Compounds	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CV[1] (V)	CE[2] (eV)	RT[3] (min)
Fenpropimorph	303.26	304.28	116.25 130.28 147.29[4]	16	32 34 36	3.8

1)CV: Cone voltage
2)CE: Collision energy
3)RT: Retention time
4)Quantitation ion

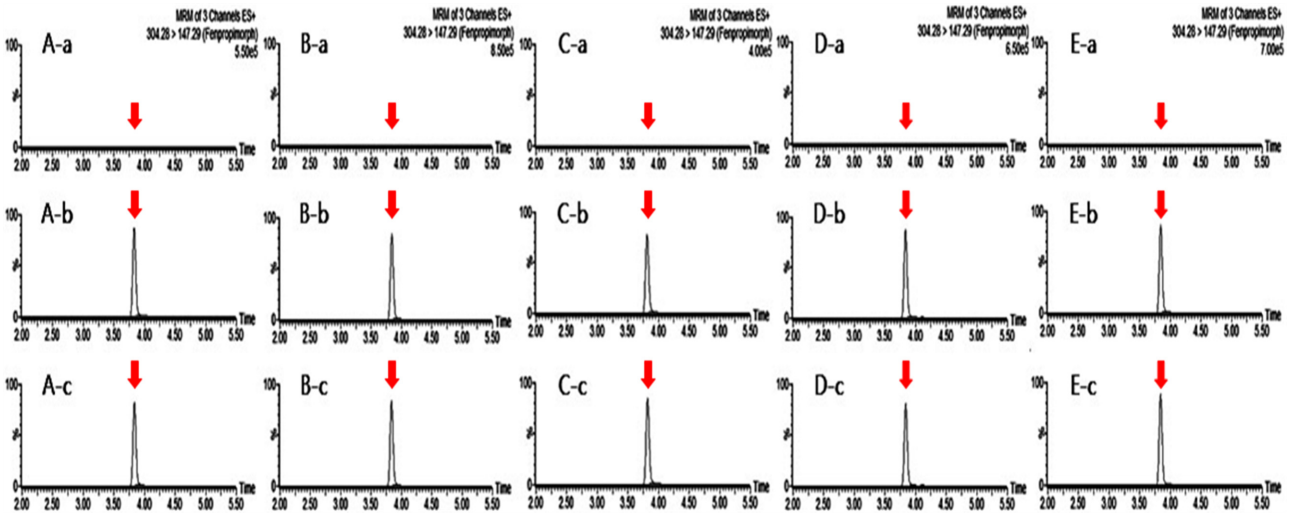


Fig. 4. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatogram (fortification concentration: 0.5 μg/mL) of fenpropimorph in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper at (a) control, (b) matrix-matched standard and (c) recovery.

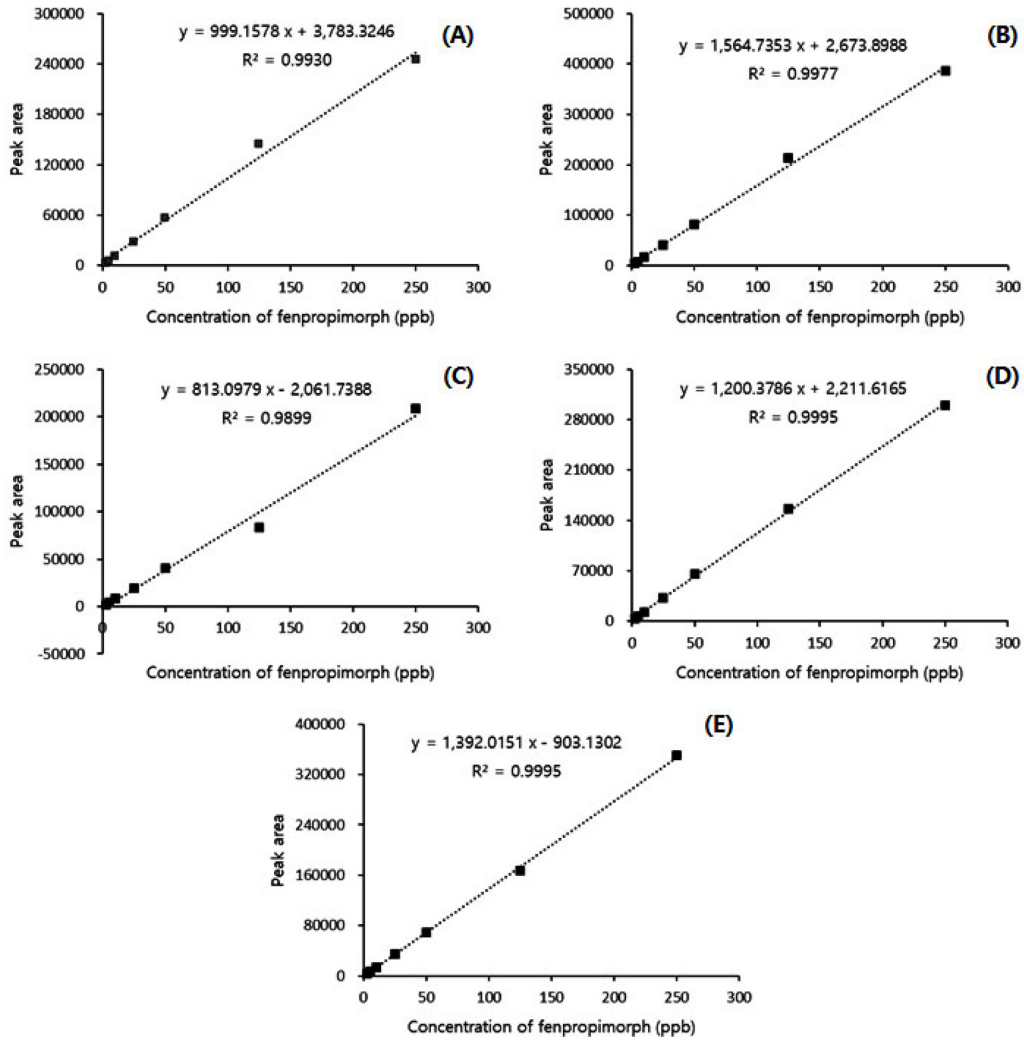


Fig. 5. Matrix-matched calibration curves of fenpropimorph in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

시험법 유효성 검증

시험법의 선택성을 평가한 결과 무처리 시료 중 fenpropimorph의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않아 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 대상 성분은 LC-MS/MS 분석 시 검체의 추출성분에 의한 이온화 억압 또는 증강 현상인 "Matrix effect"에 대비하여 matrix-matched 검량선으로 정량하였으며, 5종의 농산물 무처리 추출액으로 희석한 표준용액 0.0025~0.25 mg/kg의 농도로 결정계수를 확인한 결과 0.9899 이상으로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 5). 기기상 검출한계와 정량한계는 각각 0.001 mg/kg과 0.0025 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)

= 최소검출농도 (μg/mL) × 희석배수[1)]

= 0.0025 μg/mL × (20 mL/5 g) = 0.01 mg/kg

[1)]희석배수 = 추출용매량 (mL)/시료량 (g)

시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 5종의 농산물에 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수율 실험을 한 결과 평균 회수율은 90.9~110.5%이었고, 상대표준편차는 5.7% 이하로 조사되었다(Table 3). 따라서 본 시험법은 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(CAC/GL 40-1993, 2003)[19] 및 식품의약품안전평가원의 식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)[20]에 따라 적합함을 확인할 수 있었다.

실험실간 시험법 검증

시험법의 유효성 검증을 위해 실험실간 검증을 수행하고자 개발한 시험법을 외부 식품위생검사기관인 한국식품과학연구원에 제공한 후 동일한 방법으로 분석을 수행하여 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 fenpropimorph의 평균 회수율은 81.3~104.1%이었고, 상대표준편차는 6.6% 이하로 조사되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 88.6~101.4%이며 변이계수(CV) 또한 14.6% 이하로 모든 처리군에서 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)[19] 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)[20]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).

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

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1)] (%)		Ave.[4)] (%)	CV[5)] (%)
		Lab.1[2)]	Lab.2[3)]		
Hulled rice	0.01	101.8 ± 5.6	98.9 ± 2.3	100.4	4.1
	0.1	94.7 ± 5.7	95.1 ± 0.8	94.9	3.8
	0.5	105.9 ± 0.7	84.0 ± 0.8	95.0	12.7
Potato	0.01	93.3 ± 2.6	104.1 ± 2.7	98.7	6.5
	0.1	94.9 ± 3.6	92.7 ± 3.4	93.8	3.6
	0.5	101.3 ± 3.0	81.7 ± 4.8	91.5	12.4
Soybean	0.01	100.7 ± 4.2	96.4 ± 2.4	98.6	3.9
	0.1	110.5 ± 3.4	90.8 ± 2.0	100.7	11.0
	0.5	107.9 ± 2.1	83.7 ± 0.5	95.8	13.9
Mandarin	0.01	93.3 ± 4.2	90.9 ± 2.0	92.1	3.5
	0.1	90.9 ± 2.7	86.3 ± 0.2	88.6	3.4
	0.5	95.5 ± 5.6	82.4 ± 1.6	89.0	9.1
Green pepper	0.01	105.2 ± 2.4	97.6 ± 6.6	101.4	6.0
	0.1	105.4 ± 2.8	86.9 ± 2.2	96.2	10.8
	0.5	106.2 ± 1.4	81.3 ± 0.9	93.8	14.6

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

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 농산물 중 잔류허용기준 신설 예정 농약인 펜프로피모르프의 안전 관리를 위한 공정 시험법을 개발하기 위하여 수행되었다. 펜프로피모르프는 모르폴린계 살균제로 스테롤 생합성을 저해하여 곡류와 채소류에 발병하는 녹병과 흰가루병 및 바나나에 발병하는 시가토카병을 방제 하는 데 사용되고 있다. 현재 국내에는 농산물 중 펜프로피모르프의 잔류물의 정의 및 잔류허용기준이 설정되어 있지 않고, 수입식품 바나나에 대한 잔류허용기준을 신설할 예정이다. 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 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)법을 이용한 추출 및 정제법을 최적화하여 LC-MS/MS에 의한 분석법을 확립하였다. 펜프로피모르프의 시험법 정량한계는 0.01 mg/kg이며 5종의 농산물에 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 회수율 실험을 한 결과 평균 회수율은 90.9~110.5%이었고, 상대표준편차는 5.7% 이하로 조사되었다. 또한 실험실간 검증 결과 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 88.6~101.4%이며 변이계수(CV) 또한 14.6% 이하로 조사되어 국제식품규격위원회 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 적합한 수준임을 검증하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 국내 및 수입 농산물 중 펜프로피모르프의 안전 관리를 위한 공정시험법으로 활용될 수 있으며 잔류물의 정의 및 잔류허용기준을 설정하는 데 기초자료로써 활용 가능할 것이다.

References

1. Morton, V., Staub, T.: A short history of fungicides. Online, APSnet Features, doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308 (2008).
2. Thirup, L., Johnsen, K., Torsvik, V., Spliid, N.H., Jacobsen, C.S.: Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barely roots. *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 1517-1524 (2001).
3. Mercer, E.I.: Morpholine antifungals and their mode of action. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 788-793 (1991).
4. The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR), Pesticide residues in food 2017. Available at http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/ documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation2017/FENPROPIMORPH__188_.pdf (2018).
5. Chemicalize, Fenpropimorph. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (2018).
6. European Commission, EU Pesticides database. Available at http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN (2018).
7. United States Environmental Protection Agency (US EPA), Regulation of Pesticide Residues on Food. Available at https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=6ce2762eefa71664737e889a9f285c2f&mc=true&node=se40.26.180_1616&rgn=div8 (2018).
8. 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=59500 (2018).
9. Anastassiades, M., Lehotay, S.J.: 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**, 412-431 (2003).
10. Lehotay, S.J., Mastovska, K., Lightfield, A.R.: Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.*, **88**, 615-629 (2005).
11. Lehotay, S.J., Son K.A., Kwon H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N.: Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 2548-2560 (2010).
12. Lopes, R.P., Freitas, E.E., Filho, J.F.A., Vargas, E.A., Augusti, D.V., Augusti, R.: Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control*, **28**, 192-198 (2012).
13. Lopes, R.P., Reyes, R.C., Gonzalez, R.R., Frenich, A.G., Vidal, J.L.: Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, **89**, 201-208 (2012).
14. Lehotay, S.J.: Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **88**, 595-614 (2005).
15. Walorczyk, S.: Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. *J. Chromatogr. A*, **1208**, 202-214 (2008).
16. Carneiro, R.P., Oliveira, F.A.S., Madureira, F.D., Silva, G.,

Souza, W.R.de, Lopes, R.P.: Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*, **33**, 413-423 (2013).
17. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Pesticide analytical residues manual in food code (2013).
18. Wilkowska, A., Biziuk, M.: Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.*, **125**, 803-812 (2011).
19. CODEX Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. CAC/GL 40-1993 (2003).
20. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines on standard procedures for preparing analysis method (2016).