pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 2, pp. 140~147 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.2.140

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

# QuEChERS법 및 LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살균제 Quinoxyfen의 잔류시험법 개발 및 검증

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

# Development and Validation of an Analytical Method for Quinoxyfen 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, 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 March 5, 2019/Revised March 19, 2019/Accepted March 26, 2019)

**ABSTRACT -** An analytical method was developed for the determination of quinoxyfen in agricultural products using the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted with 1% acetic acid in acetonitrile and water was removed by liquid-liquid partitioning with $MgSO_4$ (anhydrous magnesium sulfate) and sodium acetate. Dispersive solid-phase extraction (d-SPE) cleanup was carried out using $MgSO_4$, PSA (primary secondary amine), $C_{18}$ (octadecyl) and GCB (graphitized carbon black). The analytes were quantified and confirmed by using LC-MS/MS in positive mode with MRM (multiple reaction monitoring). The matrix-matched calibration curves were constructed using six levels (0.001-0.25 μg/mL) and the coefficient of determination ($R^2$) was above 0.99. Recovery results at three concentrations (LOQ, 10 LOQ, and 50 LOQ, $n$=5) were in the range of 73.5-86.7% with RSDs (relative standard deviations) of less than 8.9%. For inter-laboratory validation, the average recovery was 77.2-95.4% and the CV (coefficient of variation) was below 14.5%. All results were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL 40-1993, 2003) and Food Safety Evaluation Department guidelines (2016). The proposed analytical method was accurate, effective and sensitive for quinoxyfen determination in agricultural commodities. This study could be useful for the safe management of quinoxyfen residues in agricultural products.

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

퀴녹시펜(Quinoxyfen, 5,7-dichloro-4-quinolyl 4 fluorophenyl ether)은 다우 아그로사이언스(Dow AgroScience)에서 개발한 퀴놀린(quinoline) 계열의 표면이동성 살균제로써, 흰가루병균(powdery mildew)의 감염 전 생육단계인 발아 및 부착기 형성을 방해하며 단자엽 및 쌍자엽 식물의 흰가루병에 우수한 활성을 나타낸다[1]. 살포하였을 때 잎의 큐티클층과 같은 지용성 표면에 결합하여 잎 안으로 침투하고 밀, 보리, 포도 및 체리와 같은 핵과류 등 다양한 작물에서 흰가루병균들 방제에 매우 효과적이다[1]. 수확기 뿌리, 잎, 과실, 곡물에서 잔류물은 모화합물이고, 퀴녹시펜의 분자 일부가 식물 자연성분들과 결합하여 식물체 내에서 대사된다[2]. 퀴녹시펜의 물리·화학적 특징을 살펴보면 화학식은 $C_{15}H_8Cl_2FNO$, 분자량은 308.1이고 $n$-octanol/water 분배계수(Log $P_{ow}$)가 4.7로 비극성 화합물의 특성을 나타낸다[3]. 퀴녹시펜의 잔류물의 정의는 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex), 유럽(European Commission, EC), 미국(The Electronic Code of Federal Regulations, ECFR), 일본(The Japan Food Chemical Research Foundation,

*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

JFCRF)에서 모화합물로 정하여 관리하고 있다[4-7]. 따라서 국내 농산물 중 퀴녹시펜의 잔류물의 정의는 모화합물로 규정하여 관리할 예정이다.

퀴녹시펜의 독성은 JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues)에서 랫드의 2년 반복투여 독성시험, 개 1년 반복투여 독성시험, 그리고 랫드 생식독성시험을 독성종말점(Toxicological end point)으로 평가하여 NOAEL (The no-observed-adverse-effect level) 20 mg/kg bw/day로 설정하였고, NOAEL에 안전계수 100을 고려하여 ADI (Acceptable Daily Intake)를 0-0.2 mg/kg bw/day로 설정하였다[8]. 2019년 3월 현재, 코덱스[4]에서 잔류허용기준(Maximum Residue Limits, MRL)은 농산물과 축산물을 포함하여 보리 등 20품목에 대하여 0.01-20 mg/kg로 설정하고 있으며, 유럽[5]은 농산물과 축산물을 포함하여 오렌지 등 372품목에 대하여 0.02-2 mg/kg으로, 일본[7]은 축산물과 농산물을 포함하여 체리 등 42품목에 대하여 0.01-20 mg/kg, 미국[6]은 농산물에만 적용하여 양상추 등 12품목에 대하여 0.08-19 mg/kg으로 설정하였다. 국내의 경우 수입식품 체리에 대한 잔류허용기준 신설이 요청된 상태로 독성평가 및 잔류허용기준(안) 평가가 진행되었고, 이에 따라 본 연구에서는 퀴녹시펜의 잔류허용기준 신설에 따른 공정시험법을 개발하고자 하였다.

퀴녹시펜 시험법에 관한 연구로는 Attallah 등[9]이 사과와 감자 중 QuEChERS를 이용하여 추출, 정제 후 LC-MS/MS를 이용하여 93종의 농약을 동시 분석한 연구가 보고되고 있으며, 그 외 말린 홉(hop)에서 48종 농약의 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 동시분석한 연구가 있다[10]. 또한 와인 가공 중 azoxystrobin, dinocap, fenarimol, penconazole, 그리고 quinoxyfen을 확인하기 위하여 헥산-에틸아세테이트로 추출하여 정제과정 없이 GC-ECD로 분석한 보고가 있다[11]. 하지만 이들의 연구는 모두 동시분석에 관한 연구이며 아직 국내에 식품 중 퀴녹시펜 시험법에 관한 연구가 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에 기준 신설 예정인 퀴녹시펜의 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 재료

퀴녹시펜(99.9%) 표준품은 Sigma Aldrich (St.Louise, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴(Acetonitrile)은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany), 무수황산마그네슘($MgSO_4$)은 Junsei (Tokyo, Japan), 아세트산나트륨(sodium acetate)은 Wako (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 아세트산(acetic acid)과 포름산(Formic acid)은 Sigma Aldrich(St.Louise, MO, USA), PSA (Primary secondary amine)는 Agilent Technologies (California, 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

퀴녹시펜 표준품 10.01 mg을 10 mL의 아세톤에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였으며, 이를 아세토니트릴로 희석하여 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 균질화한 후 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 방치하지 않음) 1% 아세트산을 함유한 아세토니트릴 20 mL를 가하여 강하게 흔들고, 추출물에 무수황산마그네슘 6 g과 아세트산나트륨 1.5 g을 추가하여 10분간 진탕한 후 4,500 × *g*에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 추출로부터 얻은 상징액 8 mL를 무수황산마그네슘 750 mg, PSA 250 mg, $C_{18}$ 250 mg, GCB 45 mg이 담긴 15 mL 원심분리관에 넣어 30초간 진탕 후 이를 4,000 × *g*에서 10분간 원심분리 하였다. 정제된 상징액을 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

### LC-MS/MS 분석조건

퀴녹시펜 분석을 위해 Shimadzu (Kyoto, Japan)사의 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Spectrometer, LC-MS/MS-8060)를 이용하여 분석하였다. 분석용 칼럼은 역상 칼럼인 XBridge $C_{18}$(2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3.5 μm)을 사용하였고, 0.1% 포름산이 함유된 아세토니트릴과 0.1% 포름산이 함유된 수용액을 사용하여 최적화된 기울기 용리방식으로 대상성분을 분리하였다. 정량분석을 위하여 LC-MS/MS의 ESI (electrospray

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

| Parameter | Condition | | |
|---|---|---|---|
| Instrument | LC: Nexera X2 UHPLC (Shimazu, Kyoto, Japan)<br>MS/MS: LCMS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan) | | |
| Column | XBridge $C_{18}$ (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3.5 μm) | | |
| Flow rate | 0.3 mL/min | | |
| Injection volume | 1 μL | | |
| Oven temp. | 40°C | | |
| Mobile phase | A: 0.1% formic acid in acetonitrile<br>B: 0.1% formic acid in water | | |
| Gradient | Time(min) | A(%) | B% |
| | 0.0 | 30 | 70 |
| | 2.0 | 30 | 70 |
| | 2.1 | 95 | 5 |
| | 6.0 | 95 | 5 |
| | 6.1 | 30 | 70 |
| | 8.0 | 30 | 70 |
| 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 | | |

ionization)법의 positive mode로 최적의 정량이온과 정성이온을 선택한 후 collision energy(CE) 값을 선정하였고, LC-MS/MS의 분석조건은 Table 1과 같다.

### 시험법 검증

본 연구는 'Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)'[12]과 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[13]을 적용하여 시험법의 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 퀴녹시펜을 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준 용액 0.001-0.25 μg/mL의 농도범위에 대한 각각의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수($R^2$, Coefficients of determination)를 구하여 평가하였다. 또한 기기상의 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(Signal-to-noise ratio, S/N)를 각각 3, 10 이상으로 나타내는 농도로 하였다. 시험법의 정확성과 반복성을 확인하기 위하여 무처리 시료에 퀴녹시펜의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 확인하였다. 회수율 실험의 처리 농도는 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도를 첨가하여 5반복으로 회수율의 평균과 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)를 구하고, 시험법의 재현성은 한국식품과학연구원과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

## Results and Discussion

### 기기분석조건 확립

퀴녹시펜은 분자 내에 F, Cl 원소를 가지고 있어 할로겐 원소에 대하여 선택성이 우수한 GC-ECD로 분석하는 것이 가능하나, 증기압이 $2.0 \times 10^{-5}$ Pa (25°C)로 휘발성이 낮고 열분해 가능성이 있어 HPLC 분석이 용이할 것으로 판단하였다. 퀴녹시펜의 구조상 방향족 탄화수소인 벤젠고리를 포함하고 있어 HPLC-UVD 분석이 가능할 것으로 판단되었지만, 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석감도를 확보하며 PLS (Positive List System) 도입에 따른 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보 할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass

**Table 2.** Selected-ion of LC-MS/MS for quinoxyfen

| Compound | Retention time (min) | Molecular weight | Exact mass | Precursor ion (*m/z*) | Product ion (*m/z*) | CE[1)] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Quinoxyfen | 3.9 | 308.1 | 307.00 | 308 | 197[2)] | 34 |
| | | | | | 214 | 34 |
| | | | | | 162 | 34 |

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

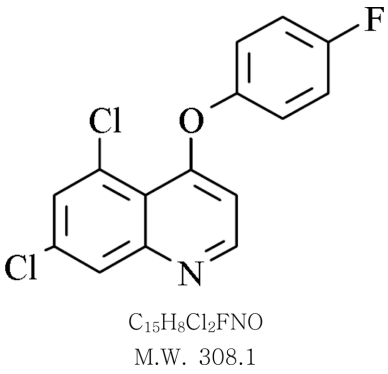


**Fig. 1.** Molecular structure of quinoxyfen.

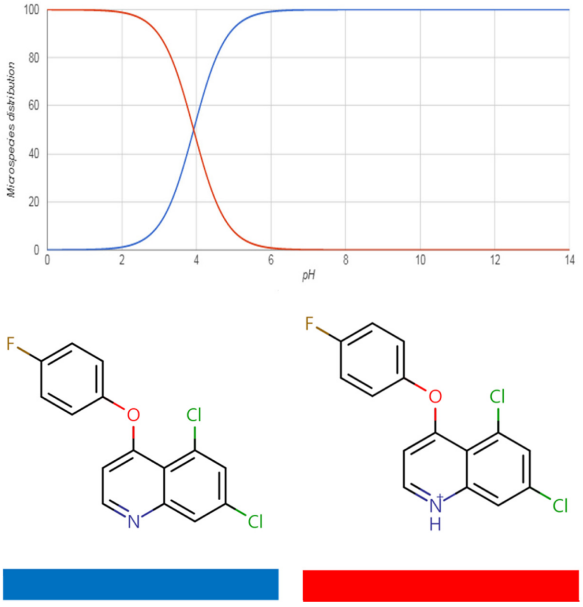


**Fig. 2.** Structures and pKa graph of quinoxyfen.

Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다 (Fig. 1). 분석용 칼럼은 퀴녹시펜의 비극성(Log $P_{ow}$=4.7) 특성을 고려하여 비극성 물질과 극성물질 모두 분리가 가능한 $C_{18}$ 역상칼럼을 선택하였다. 이동상은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이용한 기울기 용리 방식을 선택하였고, 포름산은 퀴녹시펜 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이한 protonation enhancer로 작용하였다[14]. 퀴녹시펜의 평균질량은 308.1 g/mol, 관측질량은 307.00 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 308 *m/z*를 precursor ion으로 확인하였다. 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였고, collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다. 가장 좋은 감도를 보이는 product ion 197 *m/z*를 정량이온(quantification ion), 다음으로 크게 검출되는 두 개의 product ion 214, 162 *m/z*를 정성이온(qualification ion)으로 설정하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 2에 나타내었다.

### 추출 및 정제조건 확립

퀴녹시펜은 Log $P_{ow}$ 값이 4.7로 비극성을 띄며, pKa 그래프에서 pH 4 이상으로 높아질수록 이온억압(ion-suppression) 조건이 되어, 비이온화 및 지용성 화합물 형태로써 비극성 유기용매로 추출이 가능한 상태가 된다. 비극성 유기용매를 이용하여 추출과 분배를 할 수 있으나, 시료 입자 표면이나 내부에 퀴녹시펜이 존재할 수 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매로 추출 시 시료 내부 침투성이 낮아 추출 효율이 낮을 것으로 사료되었다. 따라서 대표 농산물 5종에 대한 추출 용매는 수용성 유기용매를 이용하여 내부 침투성을 용이하게 하고 추출 효율을 높일 수 있는 추출조건을 확립하였다. 퀴녹시펜은 아세톤에서 높은 용해도를 보이나 수용성 유기용매인 아세토니트릴과 비교했을 때, 아세톤은 비극성 간섭물질의 추출률이 높은 특성을 가지고 있으며, chlorophyll과 같은 색소 추출 효율이 높아 추출용매로 적합하지 않은 것으로 판단되었다[15]. 하지만 감귤을 대상으로 아세토니트릴로 추출하였을 때 추출 효율이 50%로 낮은 회수율을 보였기 때문에, pH조절(1% 아세트산 첨가)을 통한 회수율을 검토하였다(회수율: 79.8 ± 1.1%). 또한 매트릭스 간섭을 최소화하기 위해, 추출 시 무수황산마그네슘과 아세트산나트륨의 첨가량을 조절하여 극성 불순물 및 수분을 무수황산마그네슘과 아세트산나트륨 층으로 분배시켰다.

그 결과 무수황산마그네슘 6 g과 아세트산나트륨 1.5 g을 첨가한 조건에서 높은 추출효율을 보였다(회수율: 89.2 ± 1.6%) (Table 3). 정제조건 확립을 위하여 추출액의 유기산, 당과 같은 극성 간섭물질과 유지 성분 등의 무극성 간섭물질 및 색소를 제거할 수 있는 d-SPE (dispersive solid phase extraction) 첨가에 따른 회수율을 검토하였다. 정제 과정에서 첨가되는 무수황산마그네슘은 시료에 있는 수분을 제거하여 극성도를 낮추고, 1차 및 2차 아미노 그룹이 포함된 PSA는 (+) 전하를 띠는 작용기가 있어 추출물 중 (-) 전하를 띠는 유기산 등을 제거한다. 또한 $C_{18}$은 비극성 방해물질을 제거하며, GCB는 식품에 함유된 클로로필, 카로티노이드 같은 색소를 효과적으로 제거한다[16]. 감귤시료를 이용하여 확립된 추출조건을 거친 뒤 정제과정을 확인한 결과, $C_{18}$만 사용하였을 때 회수율이 다소 감소하였고(회수율: 84.8 ± 6.5%), GCB만 단독으로 사용하였을 때 낮은 정제 효율을 보였다(회수율: 32.8 ± 11.7%). 하지만 감귤, 감자, 고추와 달리 대두 및 현미 시료의 경우 지질과 같은 비극성 간섭물질을 가지고 있기 때문에 $C_{18}$을 추가하는 것이 적합할 것으로 사료되었다. 또한 GCB는 단독으로 사용하지 않고 나머지 세가지 성분을 추가하여 함께 사용하는 것이 적합할 것으로 판단되었다. 무수황산마그네슘, PSA, $C_{18}$, GCB를 함께 첨가한 것(회수율: 92.8 ± 0.9%)과 $MgSO_4$(회수율: 91.1 ± 1.9%), PSA(회수율: 90.8 ± 1.4%) 단독으로 첨가했을 때 높은 회수율을 보였으나, 4가지 성분을 함께 추가한 것이 크로마토그램 상에서

**Table 3.** Comparisons of recovery results for quinoxyfen extraction and purification efficiency in mandarin

| Extraction | Recovery ± RSD[1)](%) |
|---|---|
| - | 79.8 ± 1.1 |
| 1g $MgSO_4$ | 80.0 ± 1.5 |
| 3g $MgSO_4$ | 85.6 ± 0.7 |
| 6g $MgSO_4$ | 88.6 ± 1.2 |
| 1 g Sodium acetate | 85.9 ± 0.6 |
| 2 g Sodium acetate | 90.0 ± 1.6 |
| 5 g Sodium acetate | 82.9 ± 3.9 |
| 6g $MgSO_4$ + 1.5 g Sodium acetate | 89.2 ± 1.6 |
| **Purification** | **Recovery ± RSD[a](%)** |
| 750 mg, $MgSO_4$, 250 mg PSA, 250 mg $C_{18}$, 45 mg GCB | 92.8 ± 0.9 |
| 750 mg $MgSO_4$ | 91.1 ± 1.9 |
| 250 mg PSA | 90.8 ± 1.4 |
| 250 mg $C_{18}$ | 84.8 ± 6.5 |
| 45 mg GCB | 32.8 ± 11.7 |

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

**Table 4.** Inter-laboratory validation results of analytical method for quinoxyfen 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 | 0.005 | 84.7 ± 3.9 | 106.1 ± 2.2 | 95.4 | 12.6 | 0.005 |
| | 0.05 | 84.5 ± 1.8 | 100.3 ± 1.0 | 92.4 | 9.5 | |
| | 0.25 | 83.4 ± 2.5 | 95.5 ± 5.4 | 89.5 | 8.5 | |
| Potato | 0.005 | 73.5 ± 1.6 | 88.0 ± 3.9 | 80.8 | 10.4 | |
| | 0.05 | 80.0 ± 1.1 | 89.3 ± 7.3 | 84.7 | 8.2 | |
| | 0.25 | 77.6 ± 8.9 | 85.1 ± 1.2 | 81.4 | 8.6 | |
| Soybean | 0.005 | 82.4 ± 1.0 | 107.5 ± 1.5 | 95.0 | 14.5 | |
| | 0.05 | 83.0 ± 0.7 | 98.9 ± 3.6 | 91.0 | 9.9 | |
| | 0.25 | 86.2 ± 1.1 | 96.5 ± 0.9 | 91.4 | 6.3 | |
| Mandarin | 0.005 | 74.8 ± 1.9 | 79.6 ± 2.6 | 77.2 | 4.3 | |
| | 0.05 | 73.9 ± 4.8 | 86.4 ± 3.3 | 80.2 | 9.7 | |
| | 0.25 | 75.2 ± 8.1 | 90.8 ± 5.4 | 83.0 | 12.7 | |
| Green pepper | 0.005 | 84.2 ± 5.5 | 75.1 ± 2.9 | 79.7 | 8.0 | |
| | 0.05 | 83.4 ± 6.3 | 75.0 ± 5.6 | 79.2 | 8.9 | |
| | 0.25 | 86.7 ± 1.9 | 95.7 ± 1.4 | 91.2 | 5.6 | |

[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: Korea Advanced Food Research Institute
[4)]Ave.: Recovery average of inter-laboratory
[5)]CV: Coefficient of variation of inter-laboratory

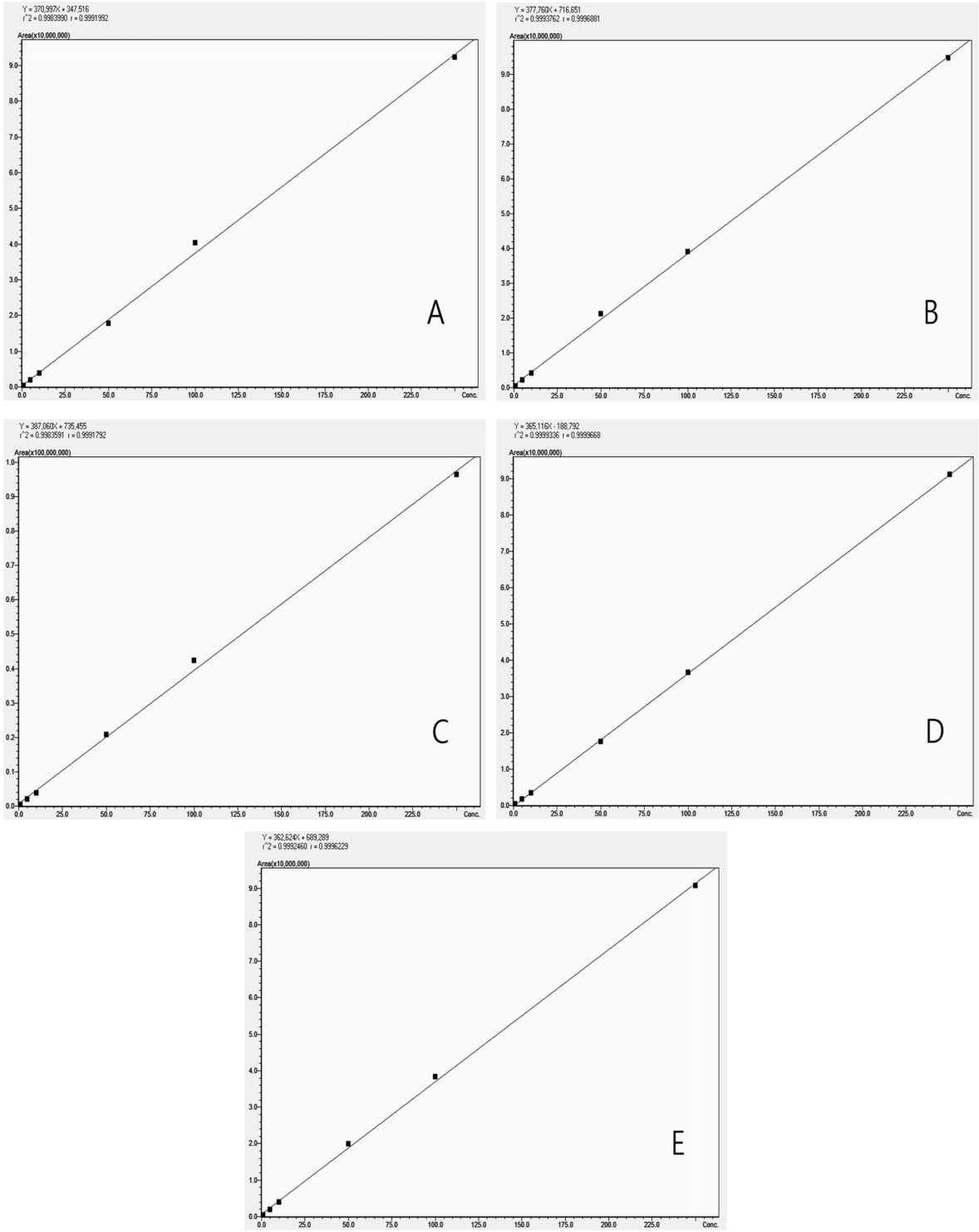


**Fig. 3.** Matrix-matched calibration curves of quinoxyfen in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

확인하였을 때 피크가 가장 깨끗하고 좋은 결과를 보였다 (Table 3). 감귤 이외의 시료(감자, 고추, 현미, 대두)에 $MgSO_4$, PSA, $C_{18}$, GCB를 함께 첨가하여 적용한 결과 80% 이상의 회수율을 나타내었다.

### 시험법 검증

퀴녹시펜은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교한 결과 퀴녹시펜의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 간섭물

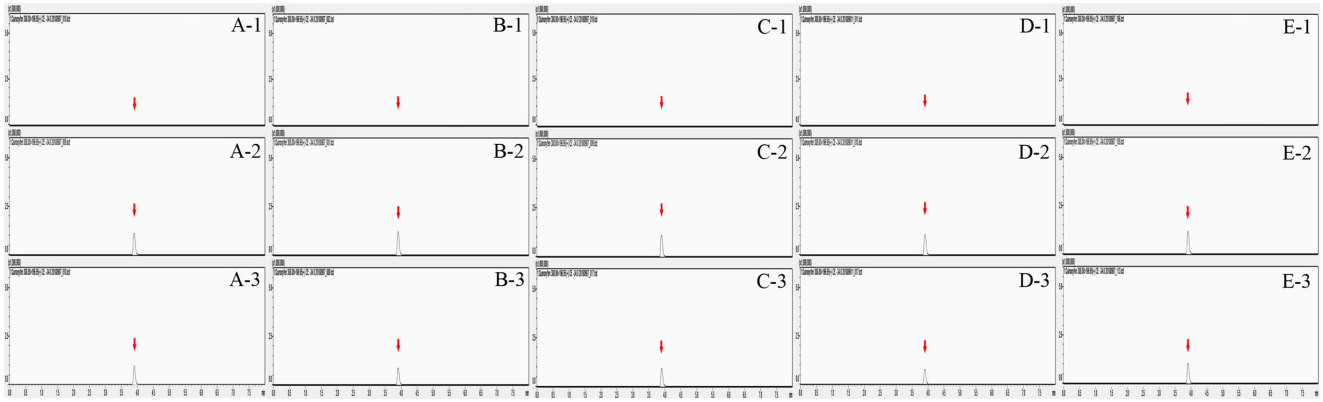


**Fig. 4.** Representative MRM(quantification ion) recovery chromatograms of quinoxyfen (308>197) on (1) matrix-matched control, (2) standard solution at 0.0125 mg/kg and (3) recovery test (fortification concentration: 0.05 mg/kg) in (A) hulled rice (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin, (E) green pepper.

질은 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. 3). 퀴녹시펜의 기기상 검출한계는 최소기기검출농도 0.00025 μg/mL이었고, 이에 따라 0.001 mg/kg이었으며, 시험법의 정량한계는 최소검출농도가 0.00125 μg/mL로 0.005 mg/kg으로 산출되었다[시험법 정량한계 (mg/kg) = 최소검출농도 (μg/mL) × 희석배수 = 0.00125 μg/mL × 20mL/5 g = 0.005 mg/kg]. 우리나라는 2019년 1월 1일부터 허용물질 목록관리제도(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. 따라서 퀴녹시펜의 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 50배 농도(0.005, 0.05 및 0.25 mg/kg)로 5반복 회수율 실험을 통하여 시험법의 정확도 및 정밀도를 평가하였다. 그 결과 퀴녹시펜의 각 농도별 평균 회수율은 73.5-86.7%이었고, 상대표준편차는 8.9% 이하로 확인되었다(Table 4). 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 퀴녹시펜의 회수율 크로마토그램을 Fig. 4에 제시하였다.

### 실험실간 시험법 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대해 유효성을 검증하기 위하여 한국식품과학연구원과 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 외부 식품위생 검사기관인 한국식품과학연구원에 동일하게 제공하여 분석한 회수율 및 상대표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 퀴녹시펜의 회수율은 75.0-107.5%, 상대표준편차는 7.3% 이하로 확인되었다. 두 실험실간의 회수율 결과에 따른 평균값은 77.2-95.4%이고, 변이계수(CV)는 14.5% 이하로 나타났다. 따라서 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)에서 제시한 실험실간 검증 기준 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)에서 제시한 기준에 만족하여 모든 처리농도에서 두 가이드라인에 부합한 것을 확인하였다(Table 4). 따라서 본 연구에서 확립한 시험법은 식품공전에 수록하여 잔류허용기준을 통한 안전 관리 및 적부판정을 위한 시험법으로 적합할 것으로 확인된다.

## 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

본 연구는 농산물 중 잔류허용기준 신설 예정 농약 퀴녹시펜의 공정시험법을 개발하기 위하여 수행되었다. 퀴녹시펜은 퀴놀린(quinoline) 계열의 표면이동성 살균제로써 흰가루병균(powdery mildew) 방제 효과가 있다. 퀴녹시펜의 잔류물의 정의는 코덱스, 유럽, 일본의 경우 농산물과 축산물 대상으로 모화합물로, 미국의 경우 농산물 대상으

로 모화합물로 설정되어 있다. 현재, 국내에서는 농산물 중 퀴녹시펜의 잔류물의 정의 및 잔류허용기준이 설정되어있지 않고, 수입식품 중 체리에 대한 잔류허용기준 신설이 최초 요청되었으며 국내 유통 농산물 중 잔류량에 대한 안전관리 확보를 위해 잔류물의 정의를 모화합물로 규정하고 적부판정을 위한 공정시험법을 개발하고자 하였다. 퀴녹시펜의 물리·화학적 특성을 고려하여 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)법을 이용한 추출 및 정제법을 최적화하여 LC-MS/MS에 의한 분석법을 확립하였다. 퀴녹시펜의 결정계수($R^2$)는 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었고, 퀴녹시펜의 시험법 정량한계(LOQ)는 0.005 mg/kg이며, 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 1 LOQ (0.005 mg/kg), 10 LOQ (0.05 mg/kg), 50 LOQ (0.25 mg/kg) 수준으로 회수율 실험한 결과 평균 회수율($n=5$)은 73.5-86.7%이었으며 상대표준편차는 8.9%이하로 확인되었다. 또한 실험실간 검증 결과 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 77.2-95.4%이며 변이계수(CV) 또한 14.5% 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 퀴녹시펜의 안전관리를 위한 공정시험법으로 활용 가능할 것이다.

## Reference


1. Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Cabitza, F., Pala, M., and Farris, G.A.: Fate of quinoxyfen residues in grapes, wine, and their processing products. *J. Agric. Food Chem.,* **48**, 6128-6131 (2000b).
2. Haq, R. and Brown, G.: The Metabolism of XDE-795 in Winter Wheat-A Probe Study (1995).
3. Chemicalize, Quinoxyfen. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (2019).
4. CODEX Alimentarius International Food Standards. Available at http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codextexts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=259 (2015).
5. European Commission, EU Pesticides database. Available at http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN (2016).
6. 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 (2017).
7. The Japan Food Chemical Rresearch Foundation. Available at http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=36950 (2015).
8. JMPR(Joint FAO/WHO Meeting on pesticide Residues), Pesticide residues in food (2006).
9. Attallah, E.R., Amer, M.E., Gomaa, A.M. and El Gohary, A.A.: QuEChERS analytical method for determination of 93 pesticide residues in apples and potatoes using LC–MS/MS. *J. Appl. Sci. Res,* **8(12)**, 5690-5697 (2012).
10. Matt J. Hengel and Msrion Miller.: Analysis of pesticides in dried hops by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem,* **56(16)**, 6851-6856 (2008).
11. G. Di Bella., M. Saitta., F. Salvo., M. Nicotina and G. Dugo.: Gas chromatographic determination of azoxystrobin, dinocap, fenarimol, penconazole and quinoxyfen during wine making. *Ital. J. Food Sci.,* **3(15)** (2003).
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, Ziling Lu and Jeff R. Mazzeo.: 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. Ionara R. Pizzutti, André de Kok, Maurice Hiemstra, Cristine Wickert, Osmar D. Prestes.: Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.,* **1216**, 4539-4552 (2009).
16. Wilkowska, A., Biziuk, M.: Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.*, 125, 803-812 (2011).