pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 4, pp. 290~297 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.4.290

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

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살균제 tridemorph의 시험법 개발 및 검증

박원민 · 도정아* · 임승희 · 박신민 · 윤지혜 · 이동석[1] · 장문익[2]*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[1]한국식품과학연구원, [2]식품의약품안전처 감사담당관

Development and Validation of an Analytical Method for Determination of Fungicide Tridemorph in Agricultural Commodities Using LC-MS/MS

Won-Min Pak, Jung-Ah Do*, Seung-Hee Lim, Shin-Min Park, Ji-Hye Yoon, Dong-seouk Lee[1], and Moon-Ik Chang[2]*
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
[2]Audit and Inspection Office, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
(Received April 19, 2017/Revised May 18, 2017/Accepted June 13, 2017)

ABSTRACT - The purpose of this study was developed for the determination of tridemorph in agricultural commodities samples. Tridemorph residues in samples were extracted with acetonitrile, partitioned with saline water, and then purified using and aminopropyl (NH_2) SPE catridge. The purified samples were quantified and confirmed via 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 (0.005~2.5 ng) into a blank extract with $r^2 > 0.999$. The limits of detection and quantification were 0.001 and 0.005 mg/kg, respectively. The average recovery ranged between 75.9% and 103.7% at different concentration levels (LOQ, 10 LOQ, 50 LOQ, n = 5) with relative standard deviations (RSDs) less than 9.0%. An interlaboratory study was conducted to validate the method by Korea Advanced Food Research Institute. The average recovery ranged between 87.0% and 109.2% at different concentration levels (LOQ, 10 × LOQ, 50 × LOQ, n = 5) with relative standard deviations (RSDs) less than 8.0%. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL40, 2003) and Food Safety Evaluation Department guidelines (2016). The results prove that the developed analytical methods is accurate, effective and sensitive for tridemorph determination.

Key words : Tridemorph, LC-MS/MS, Analytical method, Fungicide

1955년 세계무역기구(World Trade Organization, WTO)의 출범 이후 자유무역협정(Free Trade Agreement, FTA) 체결 확대로 인한 국가 간 교역의 증가로 식품의 수입은 지속적으로 증가해 왔다. 2015년도에는 2011년도 대비 수입 건수는 26.4%, 중량은 7.9%, 금액은 9.9% 증가하였고, 2011년 이후 연평균 수입 건수 6.32%, 중량 2.90%, 금액 8.62%씩 증가하였다[1)]. 이와 같이 수입식품의 소비가 지속적으로 증가하는 반면, Lee[2)]의 소비자의 수입식품 이용실태 및 안전관리제도 인식도에 관한 연구 결과, 조사대상자의 42.4%가 수입 농·축·수산물이 안전하지 못하다고 응답하였으며, 그 중 17.2%가 수입식품 중 안전성에 우려되는 위해요인을 잔류농약으로 답하여 소비자의 잔류농약에 대한 안전성 우려 정도를 예측할 수 있다. 2015년 식품 수입신고 현황을 살펴보면, 171개국의 농·임산물 588품목 중 옥수수, 밀, 대두, 쌀, 고추, 바나나가 상위를 차지하였다. 따라서 이들에 대하여 국내에 등록되지 않았거나 잔류허용기준이 설정되지 않은 농약을 사용하였을 경

*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 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4211, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: jado@korea.kr
*Correspondence to: Moon-Ik Chang, Audit and Inspection Office, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-1157, Fax: 82-43-719-1150
E-mail: 1004@korea.kr

우를 대비한 시험법 확립이 필요한 실정이다[3-4].

Tridemorph (2,6-dimethyl-4-tridecylmorpholine)는 morpholine 계열의 화합물로 곡물, 바나나, 차 등을 재배할 때 자낭·담자균 등으로부터 작물을 보호하거나 살균 효과를 위해 개발된 살균제[5]로, EPA (Environmental Protection Agency)에서 tridemorph에 대한 독성 평가 결과, 급성경구독성은 보통독성(Category III)으로 평가되었다[6]. 또한, 사람이 매일 평생 동안 섭취하여도 위해가 없는 안전기준치인 만성독성참고량(Chronic Reference Dose, cRfD)은 0.01 mg/kg bw/day로 이는 비글견의 아만성 독성시험에서 식이섭취 결과, 영향을 나타내지 않은 최대무독성용량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) 31.3 mg/kg bw/day에 불확실성계수(Uncertainty Factor, UF) 3,000을 적용하여 설정되었다. 또한 급성독성참고량(Acure Reference Dose, ARfD)은 0.02 mg/kg bw/day로 설정되었고, 발달독성 및 발암성이 없는 것으로 평가되었다[7]. Tridemorph는 국내에서 사용하지 않는 농약이나 필리핀에서 바나나의 black sigatoka (검정시가토가)를 방제하기 위하여 사용되는 농약으로 필리핀에서 국내로 수입되는 바나나의 경우 2016년 1월 대비 중량은 5.3%, 금액은 13.9%가 증가하였다. 현재 우리나라에서 2016년 12월 식품의약품안전처 고시 제 2016-154호 제1. 4. 1에서 허용물질 목록 관리제도(Positive list system, PLS) 도입 고시가 발표됨에 따라 이전에는 바나나에 국내기준이 설정되지 않았을 경우 Codex(국제 식품규격위원회)의 기준을 적용하였으나, 고시 적용 이후 0.01 mg/kg의 일률기준이 적용되어 기준이 강화된다. 따라서 필리핀에서는 우리나라에 바나나를 수출하기 위해 자국에서 사용하고 있는 농약 tridemorph의 잔류허용기준신설을 신청하였다. Tridemorph에 대한 국외 잔류허용기준은 유럽, 일본, 미국 등에서 각각 PLS 및 zero tolerance를 적용하여 0.01~0.05(바나나 등 378종), 0.05~20(쌀 등 160품목) 및 1.0(바나나) mg/kg으로 설정되어 사용되고 있으며, 잔류물의 정의는 국내·외 모두 모화합물로 규정하여 관리하고 있다. Tridemorph 시험법에 관한 연구로는 Bienvenida 등[8]이 이유식 중의 tridemorph의 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 연구가 보고되었으며, Zamora 등[9]이 오렌지와 바나나 중의 tridemorph 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 연구 보고가 있다. 국내 연구의 경우 Do 등[10]이 차 중의 tridemorph 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 연구 보고가 있다. 하지만 이들의 연구는 바나나, 차 등의 한정된 시료만 분석 가능한 시험법이므로 곡류, 두류, 서류, 채소류 등에는 적용 가능하지 않은 시험법이다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에 2016년 신규 기준신청 된 tridemorph의 수입 농산물 중 잔류가능성에 대한 안전관리를 위해, 이에 대한 기준적합유무를 판단하기 위한 공정 시험법을 개발하고자 하였다. 이를 위해 식품공전에서 분류하고 있는 농산물 중 대표 농산물 5종을 선정하여 시료 전처리, 추출, 정제 및 기기분석 등의 효율을 고려한 시험법을 개발하였다.

Materials and Methods

시약 및 시료

Tridemorph 표준품은 Sigma-Aldrich (St. Lous, USA)에서 구입하여 분석물질로 사용하였고, acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), dichloromethane (DCM) 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 또한, sodium chloride (NaCl)는 Wako (Osaka, Japan)로부터, anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4)는 Merck (Darmastadt, Germany)로부터 구입하였다. NH_2 카트리지 (1 g, 6 cc)는 Waters (Milford, USA) 제품을 이용하였고 formic acid는 sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 추출에는 교반진탕장비(MMV-1000W, Eyela, Japan)를 사용하였고, 추출액 pH조절에는 pH미터기(Docu-pH plus meter, Sartorius, Germany)를 사용하였다. 시료는 식품의약품안전처에서 잔류농약 시험법 개발 시 고려하는 대표농산물 5종 감귤(과일류), 감자(서류), 고추(과채류), 대두(두류), 현미(곡류)를 선정한 후 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 −50°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

Tridemorph 표준품 10.03 mg을 10 mL ACN에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 농산물 시료의 무처리 추출물 900 μL에 10 μg/mL 표준용액 100 μL를 넣어 1.0 μg/mL 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

시료를 분쇄하여 균질화한 후 20 g(곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 그 20 g, 과일류, 채소류, 서류는 약 1 kg을 분쇄한 후 그 20 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고(곡류 및 두류의 경우 증류수 40 mL를 넣어 30분간 방치) ACN 100 mL를 가하여 진탕기에서 5분간 진탕한 후 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기를 이용해 흡인여과 하였다. 여과액을 염화나트륨 10~15 g이 들어있는 500 mL 용량의 분액여두에 옮기고 마개를 막은 뒤 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치시켰다. ACN 층을 무수황산나트륨에 통과시켜 100 mL 메스플라스크에 받은 후 ACN을 이용하여 최종부피가 100 mL가 되게 한 후, 농축 플라스크에 담아 40°C 이하의

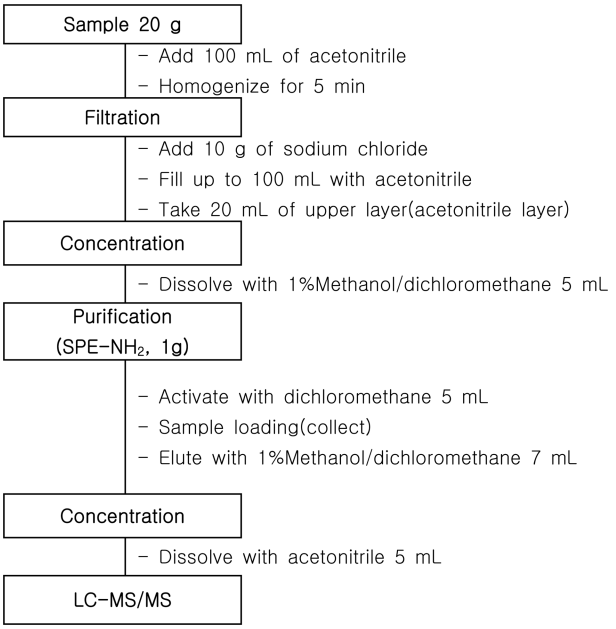

Fig. 1. Flow chart for tridemorph analysis.

수욕 상에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 후, 그 잔류물에 MeOH/DCM(1/99, v/v) 5 mL를 가하여 용해하였다. NH_2 카트리지에 DCM 5 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버린 후 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정으로부터 얻은 추출액 중 5 mL를 카트리지 상단에 넣은 후 용출시켜 받았으며, 고정상 상단이 노출되기 전에 MeOH/DCM (1/99, v/v) 7 mL를 용출시켜 받은 시험액을 감압농축플라스크에 받았다. 이를 40°C 이하 수욕상에서 감압농축 후 잔류물에 ACN을 가하여 최종부피 5 mL가 되게 한 뒤 멤브레인 필터(nylon, 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1)[10].

LC-MS/MS 분석 조건

Tridemorph의 잔류분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS, Acquity UPLC-US/Quattro premier XE, Waters, Milford, USA)를 사용하였고, 분석용 역상 칼럼인 XBridge® C_{18} (2.1 mm I.d × 100 mm, 3.5 μm, Waters, Milford, USA) 칼럼을 선택하였으며, 이동상으로 0.1% 포름산 함유 ACN과 0.1%포름산 함유 물을 사용하여 최적화된 기울기 용리 방식을 적용하였다. 각 대상성분의 이온화는 ESI (electrospray ionization)법의 positive-ion mode를 사용하였다. LC-MS/MS 분석조건은 Table 1과 같다.

시험법의 유효성 검토

확립된 tridemorph 시험법의 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery)에 대해 유효성을 검증하였다. 직선성의 확인을 위하여 tridemorph 표준용액을 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 μg/mL 농도가 되도록 무처리 시료 시험 용액으로 희석하였다. 각 농도 범위에 대한 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 각 무처리 시료에 tridemorph의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 처리농도는 대표농산물 5종에 대하여 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배에 해당하는 농도로 수행하였으며 각각의 농도 및 시료에 대하여 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 시험법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한, 국내 식품위생검사기관인 한국식품과학연구원과 실험실간 검증을

Table 1. Analytical conditions for the determination of tridemorph

Condition	Content				
Instrument	LC/MS/MS				
Chromatographic separation					
Column	XBridge C_{18} (2.1 × 100 mm, 3.5 μm)				
Flow rate	0.2 mL/min				
Injection volume	5 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	30	70		
	3.0	30	70		
	4.0	70	30		
	6.0	70	30		
	10.0	30	70		
MS/MS condition					
Capillary	1.0 kV				
Source temp.	100°C				
Desolvation temp.	300°C				
Desolvation gas flow	800 L/hr				
Cone gas flow	150 L/hr				
Selected-ion	Retention time (min)	Molecular weight	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1]
	5.5	297.5	298	130[2]	26
				98	29

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

실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

Results and Discussion

최적기기분석조건 확립

액체크로마토그래프-질량분석기는 액체크로마토그래피를 통해 분리된 물질을 이온화 시켜 질량 대 전하의 비(*m/z*)를 측정하는 방법으로 많은 화합물에서 특정 이온의 쪼개짐 형태를 분석할 수 있다. 또한, 빠른 속도로 분석이 가능하며 시료의 간섭물질에 영향을 받지 않아 선택성이 높으며 pg/mL 농도까지 정량이 가능하여 우수한 감도를 가지는 것이 장점이다[11-14]. 따라서 낮은 정량한계 확보와 시료 간섭물질에 대한 영향을 배제하기 위해 LC-MS/MS를 분석기기로 사용하였다. 분자량 297.5, 관측질량(Exact mass)이 297.3인 tridemorph 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과, $[M+H]^+$ 이온인 298.2 mass 값을 확인하였다. 이후, Cone voltage의 변화(10~70 V)에 따른 최적화 과정을 통해 47 V에서 최대 peak가 나타남을 확인하였으며, 최적화된 cone voltage상태에서 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였다. Collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정한 결과, 가장 좋은 감도를 보이는 130 *m/z*를 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion인 98 *m/z*를 정성이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다(Table 1). 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 시료 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 시료별로 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

추출 및 정제조건의 확립

Tridemorph는 Log P_{ow} 값이 4.2인 비극성인 화합물[15]로, 수용성 유기용매인 ACN을 추출용매로 사용하였다. 일반적으로 추출 시 시료 내부로의 침투성을 용이하게 하고자 수용성 유기용매를 우선적으로 사용하며 대표적으로 acetone[16-17], ACN[18-19], MeOH[20-21]이 있지만, MeOH 및 acetone의 경우 ACN에 비해 비극성 간섭물질에 대한 추출률이 높아 ACN을 추출용매로 사용하였다[22]. 또한 tridemorph는 pKa값이 8.36인 화합물로 해리성이 크지 않고, pH 10~14 사이에서 비이온 상태로 존재하는 화합물로, pH가 추출효율에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 1 N NaOH를 이용하여 pH 11(염기성)로 조절한 감귤 및 고추와 ACN으로 추출한 후 pH를 조절하지 않은 감귤 및 고추의 회수율을 측정한 결과(Table 2), pH를 조절하지 않은 감귤 및 고추의 회수율이 각각 80.5% 및 74.0%으로 pH를 염기성으로 조절한 감귤 및 고추의 회수율 74.0% 및 60.8%보다 회수율이 높은 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 pH를 조정하지 않은 상태에서 ACN으로 추출하는 것을 최적 조건으로 설정하였다. Tridemorph는 염기성조건에서 비해리 상태로 존재하며 비극성을 띈다. 따라서 흡착 원리에 의한 불순물 정제를 위해 n-propylamine 작용기를 가지는 NH_2 카트리지를 이용하여 비교적 용해도가 높은 비극성 용매인 MeOH/DCM 용매조합과 tridemorph에 관한 일본후생성의 시험법[23]에서 사용된 ACN/toluene 용매를 이용하여 정제 효율을 비교하였다. 각 용매에 대한 회수율 실험 결과(Table 3), MeOH/DCM 용매 조합의 경우 모두 90% 이상의 회수율을 보였다. 특히, MeOH/DCM(1/99, v/v) 에서 96.5%로 가장 높은 회수율을 얻을 수 있었으며, ACN/toluene(3/1, v/v) 의 경우 66.9%로 가장 낮은 회수율을 나타냈다. 따라서 최종 정제법으로 NH_2 카트리지에 MeOH/DCM(1/99, v/v)으로 재용해한 추출액을 카트리지에 용출시키면서 받은 후 MeOH/DCM(1/99, v/v) 7 mL를 용출시켜 받는 것으로 확립하였으며 이는 Do[10]의 선행연구결과와 동일하였다.

Table 2. Effects of pH for tridemorph partition efficiency in samples

Sample	pH	Recovery(%)
Mandarin	11	74.0
	4	80.5
Green pepper	11	60.8
	6	74.0

Table 3. Comparisons of elution solvents for tridemorph analysis

Solvent	Ratio(v/v)	NH_2
		Recovery(%)
MeOH/DCM	1/99	96.5
	5/95	94.2
	10/90	90.7
ACN/toluene	3/1	66.9

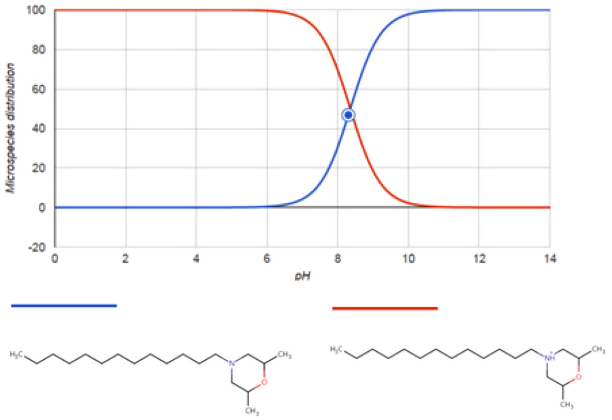

Fig. 2. pKa graph of tridemorph[26].

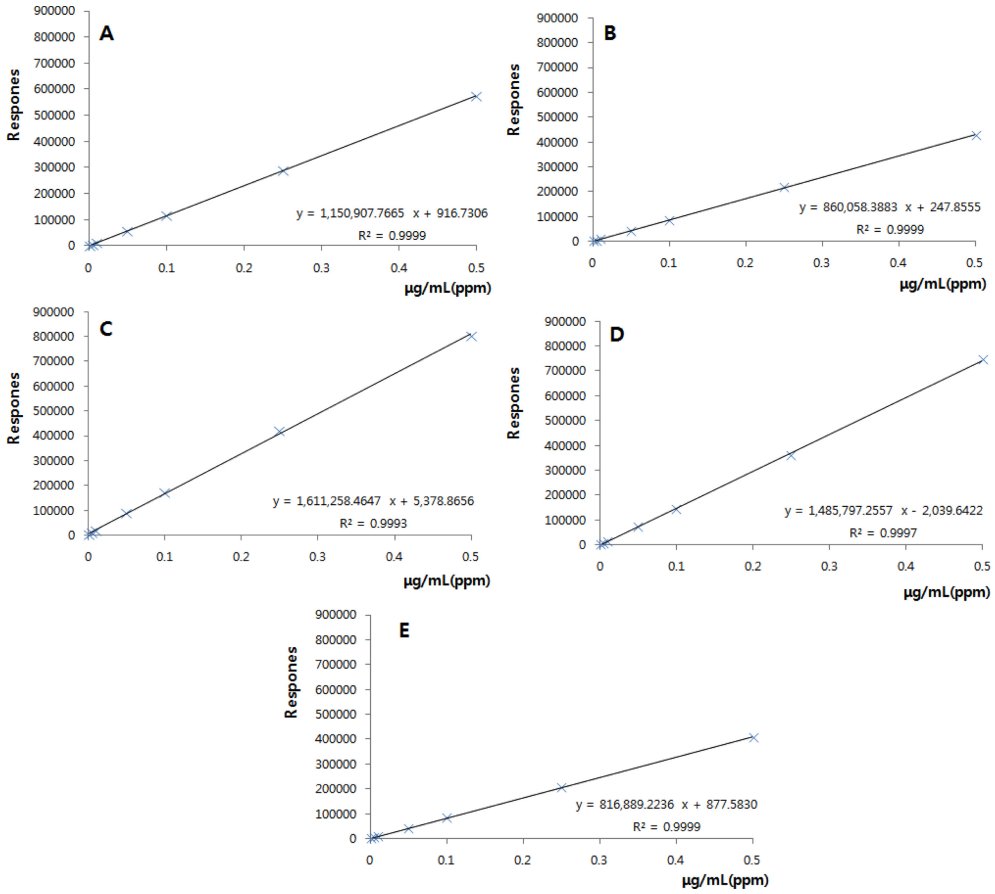

Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of corresponding to tridemorph in (A) mandarin, (B) potato, (C) green pepper, (D) hulled rice and (E) soybean.

시험법의 유효성 검토

Tridemorph의 선택성(selectivity)을 측정한 결과, 무처리 시료 중 tridemorph의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 간섭물질도 검출되지 않아 시료 중 tridemorph 분석을 위한 높은 분리능과 선택성을 확인할 수 있었다. 또한, tridemorph의 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 표준용액을 무처리 추출물로 희석하여 0.001~0.5 µg/mL의 농도로 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과, 결정계수(r^2)가 0.999 이상으로 높은 직선성을 확인하였다(Fig. 3). Tridemorph의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.001 및 0.005 mg/kg으로 산출식은 아래와 같다.

$$\text{검출한계(mg/kg)} = \text{최소검출량(ng)} \times \frac{1}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{최종희석부피 (mL)}}{\text{시료 주입량 (µL)}} \times \text{희석배수}^{*}$$

$$= 0.005(\text{ng}) \times \frac{1}{20(\text{g})} \times \frac{5(\text{mL})}{5(\mu\text{L})} \times 4 = 0.001$$

*희석배수 = 희석부피(mL)/분취량(mL)

$$\text{정량한계(mg/kg)} = \text{최소검출량(ng)} \times \frac{1}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{최종희석부피 (mL)}}{\text{시료 주입량 (µL)}} \times \text{희석배수}$$

$$= 0.025(\text{ng}) \times \frac{1}{20(\text{g})} \times \frac{5(\text{mL})}{5(\mu\text{L})} \times 4 = 0.005$$

이러한 결과는 국내의 경우 PLS 도입에 따라 잔류허용기준이 없는 경우 불검출기준인 0.01 mg/kg을 검출할 수 있는 충분한 감도이다. 시험법의 정확성과 재현성 및 효율성을 평가하기 위하여 LOQ (Limit of quantification, 정량한계), LOQ 10배, LOQ 50배 수준인 0.005, 0.05와 0.25 mg/kg의 처리농도로 5반복 실험하였으며, 회수율을 이용하여 시험법의 정확성을 평가하였으며, 상대표준편차를 이용하여 정밀성을 평가하였다. 그 결과, 각 농도 별 tridemorph의 평균 회수율은 75.9~103.7%이었고, 이때 상대표준편차는 모두 8.5% 이하로 시험법의 정확성 및 정밀성을 확인하였다(Table 4). 따라서 본 연구 결과는 잔류물 분석에 관한 Codex 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40)[24] 및 식품의약품안전평가원 가이드라인[25]의 기준에 부합하므로 농산물 중 잔류하는

Table 4. Inter-laboratory validation results of analytical method for tridemorph in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD (%)		Ave.[3] (%)	CV[4] (%)	Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD (%)		Ave.[3] (%)	CV[4] (%)
		LAB1[1]	LAB2[2]					LAB1[1]	LAB2[2]		
Mandarin	0.005	75.9 ± 8.2	105.8 ± 1.4	90.9	5.3	Soybean	0.005	83.1 ± 4.4	102.8 ± 5.0	93.0	5.1
	0.05	84.9 ± 7.7	101.4 ± 1.0	93.2	4.7		0.05	81.8 ± 2.7	97.9 ± 3.2	89.9	3.3
	0.25	79.2 ± 8.5	108.7 ± 0.6	94.0	4.8		0.25	88.3 ± 5.5	87.0 ± 2.4	87.7	4.5
Potato	0.005	98.5 ± 1.5	109.2 ± 7.8	103.9	4.5	Hulled rice	0.005	84.9 ± 4.6	91.2 ± 5.6	88.1	5.8
	0.05	103.7 ± 2.5	109.1 ± 2.8	106.4	2.5		0.05	100.7 ± 5.9	100.1 ± 1.8	100.4	3.8
	0.25	102.2 ± 0.8	99.1 ± 2.7	100.7	1.7		0.25	81.4± ± 3.9	90.2 ± 3.1	85.8	4.1
Green pepper	0.005	94.5 ± 5.9	101.5 ± 4.1	98.0	5.1						
	0.05	88.8 ± 1.6	101.1 ± 1.4	95.0	1.6						
	0.25	88.8 ± 3.4	107.1 ± 1.0	98.0	2.2						

[1]Ministry of Food and Drug Safety
[2]Korea Advanced Food Research Institute
[3]Recovery average of inter-laboratory
[4]Coefficient of variation of inter-laboratory

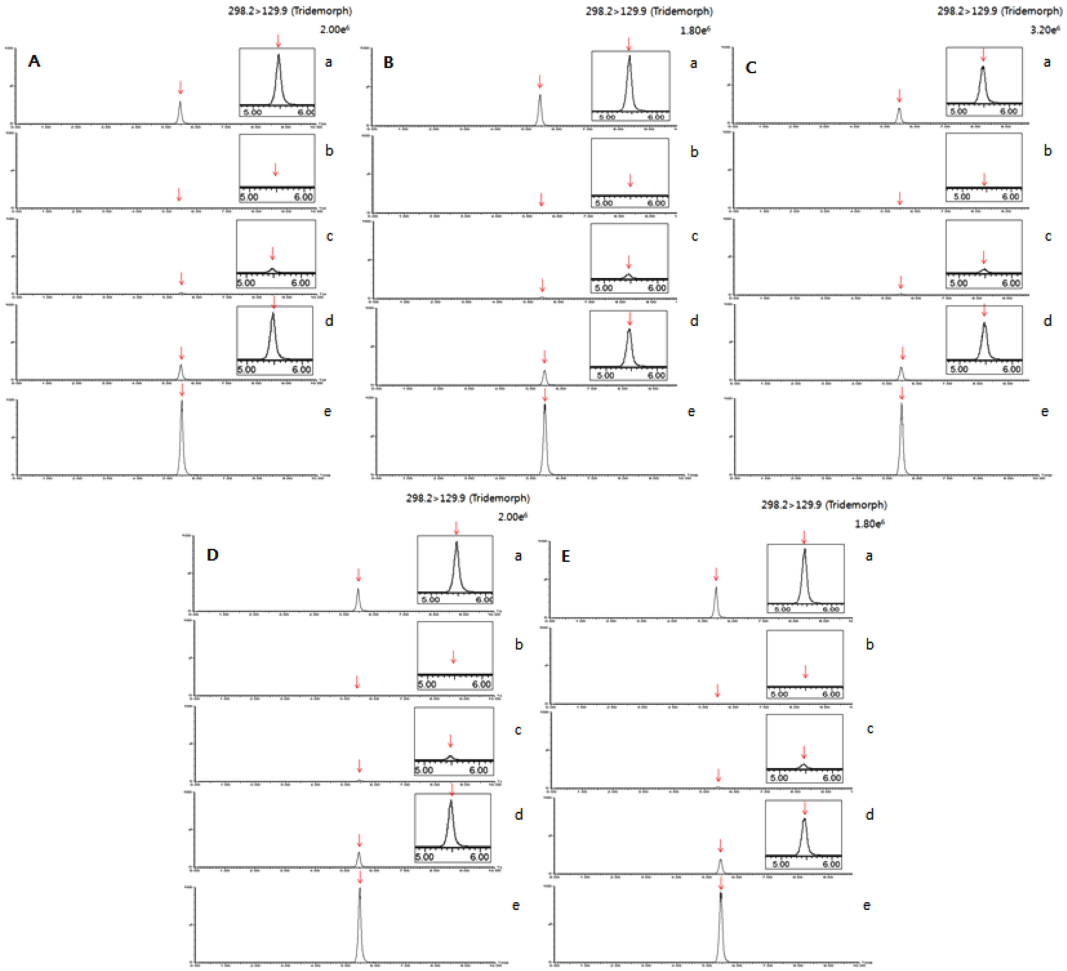

Fig. 4. Representative MRM(quantification ion) chromatograms of tridemorph corresponding to: (A) mandarin, (B) potato, (C) green pepper, (D), soybean (E) hulled rice, (a) standard solution at 0.05 mg/kg, (b) control, (c) spiked at 0.005 mg/kg, (d) spiked at 0.05 mg/kg and (e) spiked at 0.25 mg/kg.

tridemorph를 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다.

실험실간 시험법 검증

시험법의 유효성 입증을 위해 외부기관인 한국식품과학연구원과 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 한국식품과학연구원에 제공하고 동일한 방법으로 분석을 수행한 후 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 tridemorph의 회수율은 87.0~109.2%이었으며, 이때 상대표준편차는 모두 7.8% 이하로 조사되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 85.8~106.4%이며 변이계수(CV) 또한 6% 미만으로 모든 처리구에서 Codex 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40) 및 식품의약품안전평가원 가이드라인에서 제시한 기준 처리농도 > 1 mg/kg, ≤ 0.01 mg/kg의 45%, > 0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 32%보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Table 4).

Acknowledgement

본 연구는 2016년도 식품의약품안전평가원 “2016년 농약 잔류허용기준 신규 설정 및 개정을 위한 안전관리 근거 마련 연구(16161위생안009)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 2017년 수입식품 중 신규 기준설정 예정 농약인 tridemorph의 안전성 관리를 위한 공정시험법을 확립하기 위하여 수행하였다. Tridemorph의 잔류물의 정의는 모화합물로 규정하며, 확립된 시험법은 실험실내 및 실험실간 검증을 통해 공정시험법으로의 유효성을 확인하였다. 대표 농산물 5종(감귤, 감자, 고추, 대두, 현미)에 대하여 잔류분석이 가능하도록 선택성과 감도가 우수한 LC-MS/MS를 사용하여 수용성 유기용매인 ACN로 추출 후 NH_2 카트리지에 가장 회수율이 우수한 용매인 MeOH/DCM (1/99, v/v)를 정제조건으로 확립하여 시험법을 개발하였다. 개발된 tridemorph의 직선성은 결정계수(r^2)가 0.99 이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.001 및 0.005 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 개발된 시험법의 평균 회수율은 75.9~103.7%였으며, 분석오차는 8.5% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한, 외부기관 검증 결과 평균 회수율은 87.0~109.2%이었으며, 상대표준편차는 모두 7.8% 이하로 조사되어 국제적 잔류농약 분석 가이드라인 및 식품의약품안전평가원 가이드라인에 적합한 수준임을 확인하였다. 따라서 본 시험법은 농산물 중 tridemorph의 잔류검사를 위한 공정시험법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. Ministry of Food and Drug Safety: Year book of imported food inspection (2016).
2. Lee, A.R.: A survey on the consumption pattern of consumers and awareness of safety management systems for imported food. MS thesis, ChungAng University, Korea (2015).
3. Park, J.H., Kim, T.K., Oh, C.H., Kim, J.H., Lee, Y.D., Kim, J.E.: Analysis of multiple pesticide residues in apples and pears using gas-liquid chromatography. *Korea J. Environ. Agri.*, **23**, 148-157 (2004).
4. Jeon, Y.H., Kim, H.Y., Hwang, J.I., Kim, J.H., Do, J.A., Im, M.H., Oh, J.H., Kwon, K.S., Lee, J.K., Lee, Y.D., Kim, J.E.: Application of multiresidue analysis method of unregistered pesticides in Korea for imported food. *Korea J. Environ. Agric.*, **30**, 339-345 (2011).
5. Abul, K.A., Banerjee, A.K.: Action of the fungicide tridemorph on the glucose, lactate and succinate dehydrogenase activities of some tridemorph sensitive and resistant bacteria. *Pestic Manage Sci.*, **43**, 41-45 (1995).
6. EPA code of Federal Regulations: Title 40 (Protection of environment) 156.62 Toxicity category (2011).
7. Environmental Protection Agency: Tridemorph HED Risk Assessment for Tolerance Reassessment Eligibility Decision (TRED) Document PC code No. 121401; DP Barcode Nos. D322126 & D322128 (2005).
8. Bienvenida, G.I., Juan, F., Garcia, R., Antonio, M.D.: Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Food chemistry.*, **135**, 780-786 (2012).
9. Zamora, T., Pozo, O.J., Lopes, F.J., Hernandez, F.: Determination of tridemorph and other fungicide residues in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1045**, 137-143 (2004).
10. DO, J.A., Park, H.J., Kwon, J.E., Cho, Y.J., Chang, M.I., Oh, J.H., Hwang, I.G.: Development and validation of and analytical method for tridemorph determination in tea samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Saf.*, **29**, 292-298 (2014).
11. Bester, K., Bordin, G., Rodriguez, A., Schimmel, H., Pauwels, J., Van, V.G.: How to overcome matrix effects in the determination of pesticides in fruit by HPLC-ESI-MS-MS. *Fresenius Anal. Chem.*, **371**, 550-555 (2001).
12. Blasco, C., Fernandez, M., Pico, Y., Font, G., Manes, J.: Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Chim. acta.*, **461**, 109-116 (2002).
13. Taylor, M.J., Hunter, K., Hunter, K.B., Lindsay, D., LeBouhellec, S.: Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, **982**, 225-236 (2002).
14. Kim, H.H.: A study on highly sensitive detection method of

limaprost by LC-MS/MS. MS thesis, ChungAng University, Korea (2011).
15. Żwir-Ferenc, M.B.: Solid phase extraction trends, opportunities and applications. *Polish J. of Environ. Stud*., **15**, 677-690 (2006).
16. Luke, M.A., Froberg, J.E., Masumoto, H.T.: Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*., **56**, 1020-1026 (1975).
17. Wong, J.W., Zhang, K., Tech, K., Hayward, D.G., Krynitsky, A.J., Cassias, I., Schenck, F.J., Banerjee, K., Dasgupta, S., Brown, D.: Multiresidue pesticide analysis of ginseng powders using acetonitrile or acetone based extraction, solid phase extraction cleanup, and gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) or tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). *J Agric Food Chem*., **58**, 5884-96 (2010).
18. AOAC: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *J AOAC Int.,* 485-493 (2007).
19. Mills, P.A., Onley, J.H., Guither, R.A.: Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *J Assoc Off Anal Chem*., **46**, 186-191 (1963).
20. Cotterill, E.G.: The efficiency of methanol for the extraction of some herbicide residues from soil. *Pestic Sci.*, **11**, 23-28 (1980).
21. Tsipi, D., Triantafylloub, M., Hiskia, A.: Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material. *Analyst*., **124**, 473-475 (1999).
22. Joe, T.: Multi-residue pesticide screens, California Department of Food and Agriculture, Division of Inspection Services, Chemistry Laboratory Services Branch, Pesticide Residue Program (1988).
23. Department of food safety ministry of healthy, Labour and Welfare: Analytic methods for residual compositional substances of agricultural chemicals, feed additives, and veterinary drugs in food, Japan (2005).
24. CODEX Alimentarius Commission: Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. CAC/GL 40-1993 (2003).
25. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation: Guidelines on standard procedures for preparing analysis method. Korea (2016).
26. http://chemicalize.com/#/calculation.