pISSN 1229-1153 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 3, pp. 272~280 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.3.272

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

LC-MS/MS를 이용한 축산물 중 Phorate 및 대사산물 5종 동시분석법 개발

고아영 · 김희정 · 장진 · 이은향 · 주윤지 · 노미정[1] · 김성철[2] · 박성원[3] · 장문익* · 이규식

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, [1]경인지방식품의약품안전청 유해물질분석과
[2]부산지방식품의약품안전청 유해물질분석과, [3]농림축산검역본부 동물약품평가과

Development of an Official Analytical Method for Determination of Phorate and its Metabolites in Livestock Using LC-MS/MS

Ah-Young Ko, Heejung Kim, Jin Jang, Eun Hyang Lee, Yunji Ju, Mijung Noh[1], Seongcheol Kim[2], Sung-Won Park[3], Moon-Ik Chang*, and Gyu-Seek Rhee

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 363-700, Korea
[1]Hazardous Substances Analysis Team, Center for Food and Drug Analysis, Gyeongin regional Korea Food and Drug Administration, Incheon 402-835, Korea
[2]Hazardous Substances Analysis Team, Center for Food and Drug Analysis, Busan Regional Korea Food and Drug Administration, Busan 608-080, Korea
[3]Analytical Toxicology Lab, Veterinary Drugs and Biologics Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea

(Received June 8, 2015/Revised July 9, 2015/Accepted August 20, 2015)

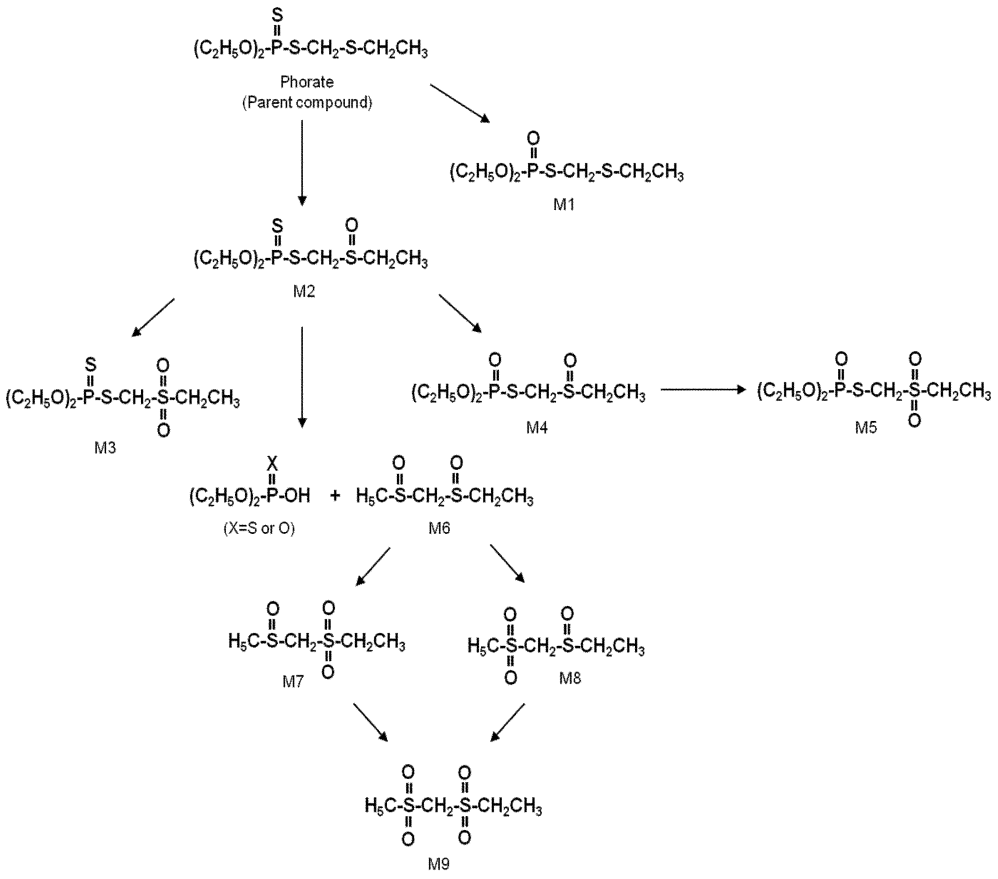
ABSTRACT - A simultaneous official method was developed for the determination of phorate and its metabolites (phorate sulfoxide, phorate sulfone, phorate oxon, phorate oxon sulfoxide, phorate oxon sulfone) in livestock samples. The analytes were quantified and confirmed via liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) in positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). Phorate and its metabolites were extracted from beef and milk samples with acidified acetonitrile (containing 1% acetic acid) and partitioned with anhydrous magnesium sulfate. Then, the extract was purified through primary secondary amine (PSA) and C18 dispersive sorbent. Matrix matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.005-0.5 mg/L) for all the analytes into blank extract with $r^2 > 0.996$. For validation purposes, recovery studies were carried out at three different concentration levels (beef 0.004, 0.04 and 0.2 mg/kg; milk 0.008, 0.04 and 0.2 mg/kg, $n = 5$). The recoveries were within 79.2-113.9% with relative standard deviations (RSDs) less than 19.2% for all analytes. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines. The limit of quantification was quite lower than the maximum residue limit (MRL) set by the Ministry of Food and Drug Safety (0.05 mg/kg). The proposed analytical method was accurate, effective and sensitive for phorate and its metabolites determination and it will be used to as an official analytical method in Korea.

Key words: Phorate, Metabolite, Maximum residue limit, Official analytical method

포레이트(Phorate, *O,O*-diethyl *S*-ethylthiomethyl phosphorodithioate)는 1954년 American Cyanamid사에서 개발한 침투성 및 접촉성 유기인제 살충제로 흡즙성, 저작성 해충, 진딧물, 나방류, 선충류, 멸구 등의 신경전달에 관여하는 효소인 acetylcholinesterase의 기능을 억제하여 방제효과를 내며 감자, 당근, 밀, 사탕수수, 옥수수, 토마토, 콩 등의 밭작물 및 뿌리식물을 보호하는 데에 사용되는 농약이다. 국내에서는 입제로 제조되어 시판되며 농산물의 파종 및 정식 전 토양 전면처리 또는 혼화처리 방법으로 살포한다[1,2,3].

하지만 포레이트는 방제 대상 해충 뿐 아니라 포유동물에게도 높은 독성을 나타내므로 안전성을 확보해야 한다. 실제로 2014년 벼멸구 방제를 목적으로 벼에 살포했던 포

*Correspondence to: Moon-Ik Chang, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety
Tel: 82-43-719-4204, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: 1004@korea.kr



Metabolite no.	Chemical name
M1	**Phorate oxon** *O,O*-diethyl *S*-[(ethylthio)methyl] phosphosphate
M2	**Phorate sulfoxide** *O,O*-diethyl *S*-[(ethylsulfinyl)methyl] phosphorodithioate
M3	**Phorate sulfone** *O,O*-diethyl *S*-[(ethylsulfonyl)methyl] phosphorodithioate
M4	**Phorate oxon sulfoxide** *O,O*-diethyl *S*-[(ethylsulfinyl)methyl] phosphorodithioate
M5	**Phorate oxon sulfone** *O,O*-diethyl *S*-[(ethylsulfonyl)methyl] phosphorodithioate
M6	Methane, (ethylsulfinyl) (methylsulfinyl)-
M7	Sulfoxide, (ethylsulfinyl)methyl
M8	Sulfoxide, ethyl (methylsulfonyl)methyl
M9	Methane, (ethylsulfonyl) (methylsulfonyl)-

Fig. 1. Metabolic pathway of phorate in rats.

레이트가 잔류한 볏짚을 먹은 한우가 집단 폐사하는 사고가 발생하여 농산물 뿐 아니라 축산물 중의 포레이트에 대해서도 관리할 필요성이 있었다. GHS 분류에 따르면 포레이트는 급성경구독성 및 급성경피독성을 일으키는 물질로 분류되어 있으며[4] 국제식품규격위원회에서는 포레이트의 일일섭취허용량(ADI, Acceptable Daily Intake)을 0-0.0007 mg/kg bw/day (JMPR, 2004)으로 정하였고, 우리나라는 0.0007 mg/kg bw/day (MFDS, 2012)으로 정하였다. 또한, 포레이트의 잔류허용기준은 국제식품규격위원회(CODEX, 2006), 유럽연합(EU, 2012)에서 축산물 시료에 0.01-0.05 mg/kg으로, 우리나라(MFDS, 2004)에서도 포유류 고기에 0.05 mg/kg으로 설정하였다. 특히 포레이트가 동물 체내에서 대사되며 생성되는 9종의 대사산물 중 독성이 강한 5종(포레이트 설폭사이드, 포레이트 설폰, 포레이트 옥손, 포레이트 옥손 설폭사이드, 포레이트 옥손 설폰)은 잔류물의 정의로 설정하여 잔류허용기준에 적용하여 관리하고 있다(Fig. 1, Table 1)[5].

포레이트와 대사산물의 분석방법으로는 모화합물과 대사산물 5종을 개별적으로 분석하는 방법과, 최종 산화형태인 포레이트 옥손 설폰으로 전환하여 총 잔류량을 분석하는 방법이 있다. 모화합물과 대사산물 5종을 개별적으로 분석한 연구로는 클로로포름/메탄올(9:1, v/v) 혼합용매를 이용하여 soxhlet 추출 후 실리카가 충진된 유리 칼럼으로 정제하여 GC-FPD로 분석 한 연구가 있었고[6], 모화

Table 1. Acute toxicity of phorate and its metabolites

Compound	Acute LD_{50} in rat (mg/kg)	
	Oral	Intraperitoneal
Phorate	1.9-10.0	3.0
Phorate sulfoxide	2.0-4.0	11.0
Phorate sulfone	1.8-2.0	27.0
Phorate oxon	0.6-0.8	-
Phorate oxon sulfoxide	1.4-1.6	1.0
Phorate oxon sulfone	0.6-0.8	1.8

(WHO, 1995)

합물과 대사산물을 단일성분으로 전환하여 분석한 연구로는 20% 메탄올이 포함된 에틸아세테이트로 추출 후 $KMnO_4$ 용액을 이용하여 포레이트 옥손 설폰으로 전환 시킨 후 GC-FPD로 분석한 연구가 있었다[7]. 전자의 경우 모화합물과 대사산물과의 극성 차이가 커서 분리방법이 상이하여 전처리 방법이 복잡하고 많은 시간이 요구되며, 대사산물 2종(포레이트 설폭사이드, 포레이트 옥손 설폭사이드)에 대한 감도가 낮았다. 후자의 방법은 모화합물과 대사산물 개별 성분에 대한 잔류량 측정이 어렵다는 단점이 있다.

현재 식품공전(4.3.1.4)에 등재된 축산물 중 포레이트 분석법은 전처리 과정이 복잡하고 대사산물이 아닌 모화합물만 분석대상으로 하며, 농산물에 대한 포레이트 분석법(4.1.3.11)은 축산물 시료에 적용 시 농산물과 시료 특성이 상이하여 대사산물에 대한 회수율이 떨어지는 결과를 확인하였다[8]. 따라서 기존 분석법들의 단점을 보완하는 축산물 중 포레이트 및 대사산물 5종에 대한 공정분석법 개발이 필요한 실정이다. 본 연구를 통해 축산물 시료에 적용이 가능하며 포레이트 및 대사산물 5종을 동시에 분석할 수 있는 분석법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

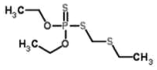
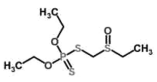
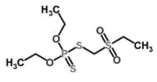
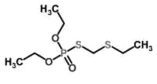
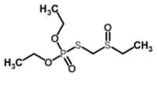
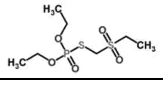
시약 및 재료

포레이트(99.6%) 및 대사산물 5종[포레이트 설폭사이드(99%), 포레이트 설폰(99%), 포레이트 옥손(96%), 포레이트 옥손 설폭사이드(92%), 포레이트 옥손 설폰(96%)]의 표준품은 Dr. Ehrenstofer GmbH (Augsburg, Germany)사에서 제공받아 분석물질로 사용하였고(Table 2). 전처리용 시약으로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol) 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 또한 아세트산(acetic acid), 무수 황산마그네슘(anhydrous magnesium sulfate), 아세트산나트륨(sodium acetate), 무수 아세트산암모늄(anhydrous ammonium acetate)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, PSA (primary secondary amine)와 C18 (octadecysilane)은 Agilent Technologies (CA, USA)에서 구입하였다. 검체는 시중에서 판매하고 있는 소고기를 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 –50ºC에 보관하고 실험에 사용하였고, 우유는 구입 후 실험에 바로 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

포레이트, 포레이트 설폭사이드, 포레이트 설폰 표준품은 20.02 mg, 포레이트 옥손, 포레이트 옥손 설폰 표준품은 20.83 mg 그리고 포레이트 옥손 설폭사이드 표준품은 21.74 mg을 20 mL의 5 mM 아세트산암모늄 포함 메탄올에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하고, 이를 무처리 추출물로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.5 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4ºC에 보관하여 실험에 사용하였다.

Table 2. Chemical structures and physicochemical properties of phorate and its metabolites

Pesticide and metabolites	Chemical structure	Molecular formula	Molecular weight	Log Pow	Solibility in water (mg/L)
Phorate		$C_7H_{17}O_2PS_3$	260.4	3.92	50.0
Phorate sulfoxide		$C_7H_{17}O_3PS_3$	276.4	1.23	507.5
Phorate sulfone		$C_7H_{17}O_4PS_3$	292.4	1.34	971.5
Phorate oxon		$C_7H_{17}O_3PS_2$	244.3	1.60	434.1
Phorate oxon sulfoxide		$C_7H_{17}O_4PS_2$	260.3	1.76	650.6
Phorate oxon sulfone		$C_7H_{17}O_5PS_2$	276.3	1.88	342.7

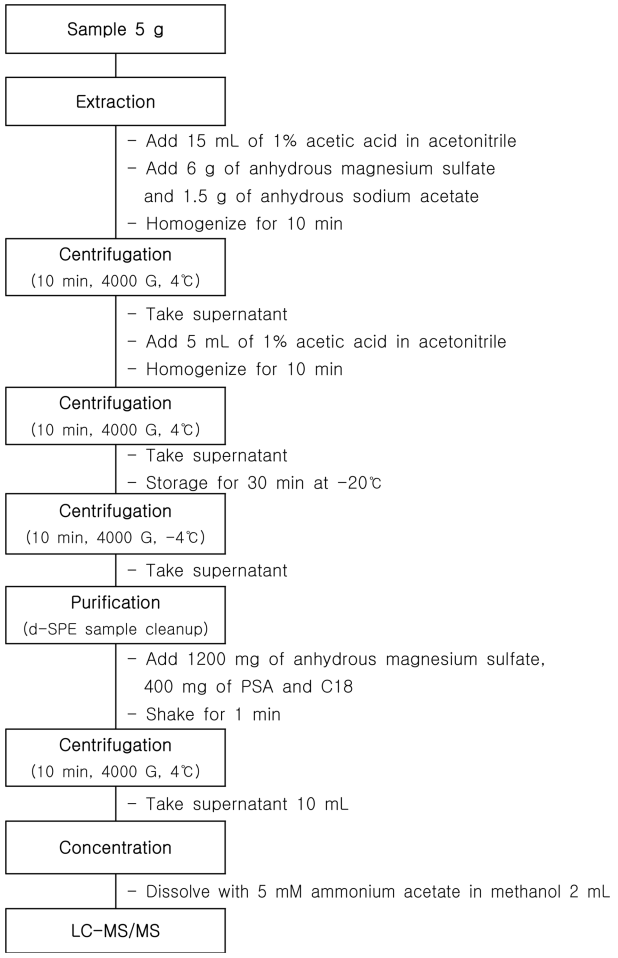


Fig. 2. Flow chart for phorate analysis.

추출 및 정제

균질화된 검체 5 g(우유: 5 mL)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 취하여 1% 아세트산 포함 아세토니트릴 15 mL를 가한 뒤 1분간 강하게 흔든 후, 무수 황산마그네슘 6 g과 무수 아세트산나트륨 1.5 g을 차례로 가하고 10분간 진탕하였다. 진탕 후 추출물을 4ºC, 4000 G에서 10 분간 원심분리 하고 상층액을 취해 새로운 원심분리관에 옮겼다. 남아있는 검체에 1% 아세트산 포함 아세토니트릴 5 mL를 추가로 가하여 10분간 진탕하고 4ºC, 4000 G에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 취해 앞의 추출물과 합쳤다. 합친 추출물은 –20ºC 초저온냉장고에 30분간 방치한 후 –4ºC, 4000 G에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 전액을 무수 황산마그네슘 1200 mg, C18 400 mg, PSA 400 mg이 담긴 50 mL 원심분리관에 옮긴 후 1분간 강하게 흔들고 이를 4ºC, 4000 G에서 10분간 원심분리 하였다. 정제된 상층액 중 상단의 절반을 취하여 40ºC이하의 수욕 중에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 다음 5 mM 아세트산암모늄 포함 메탄올을 가하여 최종부피 2 mL가 되게 하여 시험용액으로 하였다(Fig. 2).

Table 3. Analytical conditions for the determination of phorate and metabolites

Instrument	LC:Acquity UPLC (Waters, MA, USA) MS/MS: US/Quattro Primier XE (Waters, MA, USA)
UPLC conditions	
Column	Acquity UPLC BEH C_{18} (2.1 mm i.d. × 50 mm, 1.7 μm)
Column temperature	40ºC
Flow rate	0.25 mL/min
Injection volume	5 μL
Mobile phase	A: 5 mM ammonium acetate in distilled water B: 5 mM ammonium acetate in methanol
Gradient table	

Time (min)	Time (min)	
	A (%)	B (%)
0	95	5
4.5	95	5
6.0	0	100
8.0	0	100
8.1	95	5
10	95	5

MS/MS conditions	
Ion mode	ESI positive mode
Capillary voltage	3.5 kV
Source temperature	120ºC
Desolvation temperature	350ºC
Desolvation gas flow	650 L/h
Cone gas flow	50 L/h

LC-MS/MS 분석조건

포레이트 및 대사산물 5종의 동시분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)를 사용하였고, 분석용 역상 칼럼인 C_{18} 칼럼을 선택하였으며 용리 방식은 5 mM 아세트산암모늄 수용액과 5 mM 아세트산암모늄 포함 메탄올을 이동상으로 사용하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 각 대상성분의 이온화법으로는 electro-spray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였다. LC-MS/MS 분석조건은 Table 3와 같다.

분석법의 검증

확립된 포레이트 및 대사산물 5종 동시분석법의 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery), 재현성(reproducibility)에 대해 유효성을 검증하였다. 직선성의 확인을

위하여 포레이트 및 대사산물을 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준 용액 0.005-0.5 μg/mL의 농도 범위에 대한 각각의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 상관계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 각각 3, 10 이상으로 하였다. 분석법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 무처리 시료에 포레이트 및 대사산물 5종의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 처리농도는 소고기 시료의 경우 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도로, 우유 시료의 경우 정량한계, 정량한계 5배, 정량한계의 25배에 해당하는 농도로 수행하였으며 각각의 농도 및 시료에 대하여 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 분석법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다.

Results and Discussion

최적기기분석조건 확립

포레이트는 Log P_{ow}가 3.92인 비극성인 화합물로 분자내에 인을 포함하고 있어 GC-FPD로 분석이 가능하다. 그러나 대사산물의 경우 모화합물보다 극성이므로 추출, 정제법이 다르며 유도체화 등의 전처리 과정을 거쳐야 하기 때문에 모화합물과 대사산물 5종의 개별 성분을 동시에 분석하기 위해 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 칼럼은 분석대상 물질의 Log P_{ow}가 1.23-3.92로 분포되어 있는 점을 고려하여 극성물질에서 소수성물질까지 폭넓게 분리 가능한 C_{18}칼럼을 이용하였고 5 mM 아세트산암모늄 수용액과 5 mM 아세트산암모늄 포함 메탄올을 이동상으로 사용하는 기울기 용리 방식으로 분석하였다. 각 대상성분의 이온화법으로는 electrospray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였고 Table 3에 나타낸 분석조건을 바탕으로 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 포레이트 및 대사산물 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입하고 cone voltage의 변경(10~70 V)을 통해 20 V에서 포레이트 및 대사산물 5종 모두 각 분자의 $[M+H]^+$인 이온의 peak이 최대 강도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 분석의 선택성과 검출강도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였다. Collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 3에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Selected-ion of LC-MS/MS for phorate and metabolites

Compound	RT[a] (min)	Molecular weight	Exact mass *(m/z)* $[M+H]^+$	Fragment monitored *(m/z)*	CE[b]
Phorate	6.9	260.4	261	75*	10
				199	10
Phorate sulfoxide	6.6	276.4	277	97	20
				143*	17
				171	17
Phorate sulfone	6.6	292.4	293	97	20
				115	20
				171*	10
Phorate oxon	6.6	244.3	245	75*	10
				155	10
Phorate oxon sulfoxide	6.2	260.3	261	97	20
				111*	10
				153	20
Phorate oxon sulfone	6.1	276.3	277	97	17
				127	17
				155*	10

[a]Retention time
[b]Collision energy (eV)
*Quantification ion

Table 5. Recovery results of official analytical method for the determination of phorate and metabolites residues in sample

Compounds	Ave.± RSD (%)	
	Concentration 0.5 mg/kg	Concentration 1 mg/kg
Phorate	93.7 ± 7.5	83.0 ± 5.1
Phorate sulfoxide	90.0 ± 7.4	74.6 ± 3.5
Phorate sulfone	88.4 ± 6.8	74.9 ± 2.6
Phorate oxon	82.2 ± 2.0	83.3 ± 1.2
Phorate oxon sulfoxide	63.3 ± 1.7	63.7 ± 2.1
Phorate oxon sulfone	81.1 ± 2.8	73.8 ± 4.0

추출 및 정제조건의 확립

식품공전(4.1.3.11)에 등재된 농산물에 대한 포레이트 시험법을 축산물 시료에 적용하였을 경우, 대사산물에 대한 회수율이 대체적으로 낮았는데 특히 포레이트 옥손 설폭사이드의 회수율이 63-64%로 현저히 낮은 것으로 확인되었다(Table 5). 이 방법은 농산물에 최적화된 분석법으로 축산물에 적용하였을 때에는 시료의 차이로 인해 분석 대상물질의 추출효율이 낮았거나 시료 내 지방을 포함한 다

량의 간섭물질들이 정제되지 않았기 때문인 것으로 판단되어 추출 및 정제방법을 개선하고자 하였다. 추출용매의 극성도를 높이기 위해 1% 아세트산 포함 아세토니트릴을 추출용매로 사용하였고, 이를 통해 모화합물에 비해 극성인 대사산물의 추출효율을 높일 수 있었다. 또한 이온 강도를 증강시키기 위해 무수 황산마그네슘을 사용하여 시료 내 수분층과 유기용매 층을 보다 명확하게 분리하여 대상 물질의 분배효율은 높이고 축산물 시료 내의 극성 불순물이 유기용매 층에 전이되는 것을 최소화하였다. 분리된 용매층은 모아 초저온냉동고에 30분 방치하고 원심분리하였는데 이 과정을 통해 시료에서 함께 추출된 지방의 일부를 제거할 수 있었다. 추가 정제를 위하여 카트리지 대신 PSA (primary secondary amine)와 C18 (octadecysilane)을 흡착제로 사용한 정제 방법을 선택하였다. 이때 사용되는 PSA는 두개의 아미노 그룹(-NH_2)을 포함하고 있어 카복실 그룹(-COOH)과 강한 수소결합을 하므로 축산물 시료에 존재하는 유기산 및 지방산 등과 결합하며[9], C18은 사슬형 탄소화합물로 지방을 포함한 비극성 간섭물질을 흡착시킨다. 따라서 이를 이용해 극성도에 차이가 있는 모화합물과 5종의 대사산물을 동일한 과정으로 정제하여 시료 내 간섭물질을 간단하고 효과적으로 제거하였고 분석대상 물질의 손실은 최소화할 수 있었다.

분석법의 검증

선택성 및 직선성

포레이트 및 대사산물 5종의 선택성(Selectivity)은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크

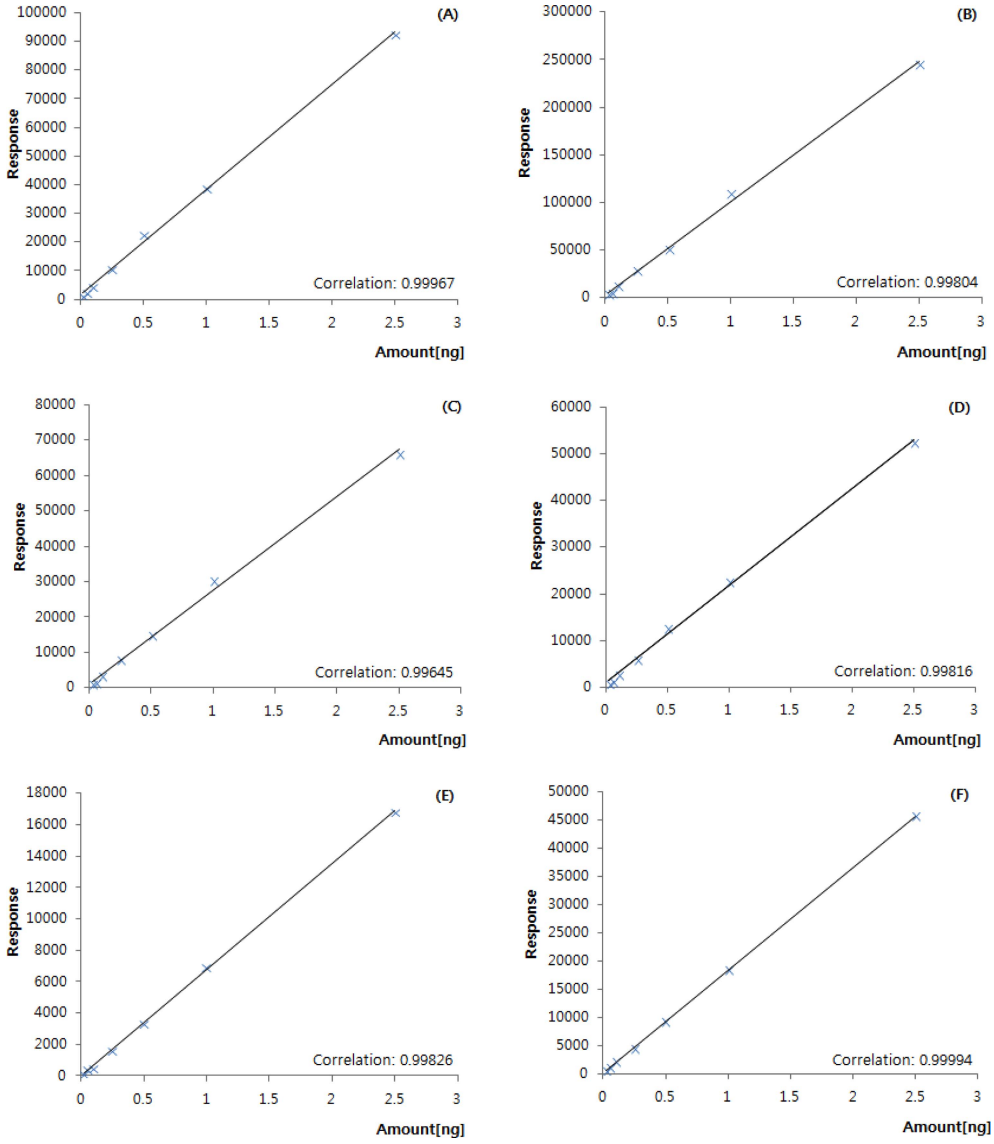


Fig. 3. Matrix matched calibration curves of (A) phorate, (B) phorate oxon, (C) phorate sulfoxide, (D) phorate oxon sulfoxide, (E) phorate sulfone, and (F) phorate oxon sulfone.

로마토그램을 서로 비교하여 평가하였다. 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 시료를 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 무처리 시료 중 포레이트 및 대사산물 5종과 머무름 시간과 질량 대 전하비(m/z)가 같은 어떠한 간섭물질도 검출되지 않아 검체 중 포레이트 및 대사산물 5종을 분석을 위해 확립된 본 분석법의 높은 분리능과 선택성을 확인할 수 있었다. 포레이트 및 대사산물 5종의 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 표준원액을 무처리 추출물로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 그리고 0.5 μg/mL 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 상관계수(r^2)가 0.996 이상으로 높은 직선성을 보였다(Fig. 3).

검출한계와 정량한계

포레이트 및 대사산물 5종의 검출한계는 기기 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 3 이상으로 결정하여 소고기 시료의 경우 분석기기의 최소검출량 0.005 ng에 따른 검출한계는 0.0008 mg/kg이었고, 정량한계는 신호 대 잡음비(S/N ratio) 10 이상으로 결정하여 0.004 mg/kg이었다. 우유 시료의 경우 검출한계는 0.002 mg/kg이었고, 정량한계는 0.008 mg/kg이었다. 본 분석법의 정량한계는 우리나라에서 설정되어 있는 포유류 고기에 대한 잔류허용기준인 0.05 mg/kg의 1/2 미만으로 본 분석법으로 잔류허용기준 준수여부를 판별하기에 문제가 없을 것으로 판단된다.

분석법의 회수율

분석법의 정확성을 평가하기 위하여 소고기 시료에는 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배 수준인 0.004, 0.04와 0.2 mg/kg의 농도로 우유시료에는 정량한계, 정량한계의 5배, 정량한계의 25배 수준인 0.008, 0.04, 0.2 mg/L의 농도로 회수율 실험을 5회 반복하여 수행하였다. 시험 결과 각 농도에서 평균 회수율은 79.2-113.9%이었고, 이때 상대표준편차도 19% 미만으로 조사되어 모든 분석물질에 대한 높은 정확성, 재현성 및 효율성을 확인할 수 있었다. 이 결과는 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라

Table 6. Validation results of analytical method for the determination of phorate and metabolites in livestock samples

Compounds	Beef		Milk	
	Fortification (mg/kg)	Ave[a]. ± RSD[b] (%)	Fortification (mg/kg)	Ave. ± RSD (%)
Phorate	0.004	82.9 ± 6.7	0.008	106.6 ± 14.5
	0.04	88.9 ± 5.5	0.04	98.9 ± 4.6
	0.2	101.3 ± 4.3	0.2	105.5 ± 15.7
Phorate sulfoxide	0.004	79.2 ± 7.3	0.008	109.6 ± 9.6
	0.04	104.9 ± 4.6	0.04	96.7 ± 17.0
	0.2	109.9 ± 3.6	0.2	101.4 ± 6.2
Phorate sulfone	0.004	98.3 ± 5.0	0.008	87.7 ± 13.2
	0.04	109.2 ± 2.7	0.04	101.9 ± 16.2
	0.2	109.5 ± 6.5	0.2	97.9 ± 11.3
Phorate oxon	0.004	91.5 ± 1.4	0.008	113.9 ± 19.2
	0.04	104.5 ± 3.7	0.04	99.3 ± 11.0
	0.2	109.9 ± 3.7	0.2	103.5 ± 12.5
Phorate oxon sulfoxide	0.004	86.0 ± 7.5	0.008	88.2 ± 10.8
	0.04	86.0 ± 5.9	0.04	95.2 ± 13.7
	0.2	96.3 ± 1.9	0.2	103.9 ± 7.1
Phorate oxon sulfone	0.004	91.9 ± 8.8	0.008	104.4 ± 7.0
	0.04	106.4 ± 1.9	0.04	103.7 ± 7.8
	0.2	106.4 ± 4.0	0.2	111.1 ± 11.4

[a]Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation.
[b]Relative standard deviation

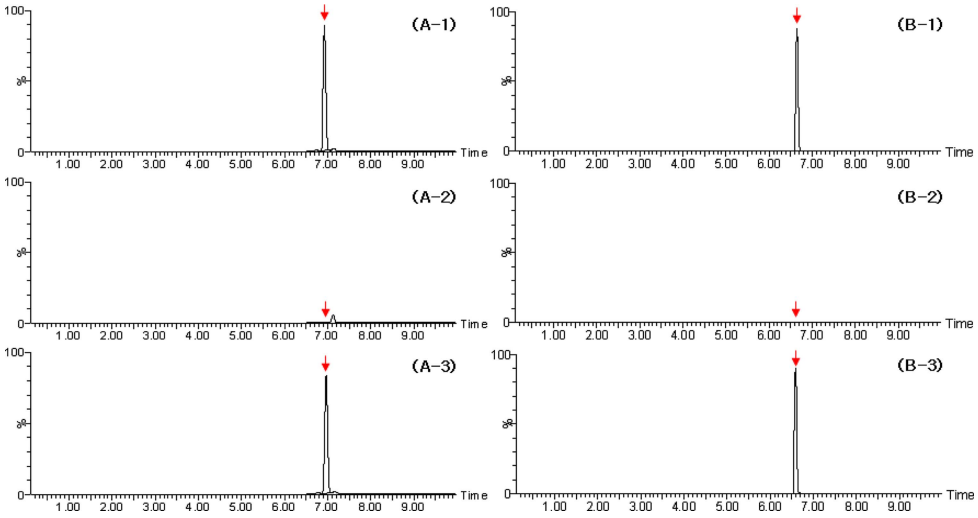


Fig. 4. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of (A-1) phorate standard at 0.05 mg/kg, (A-2) beef control, (A-3) recovery sample, (B-1) phorate oxon standard at 0.05 mg/kg, (B-2) beef control, and (B-3) recovery sample.

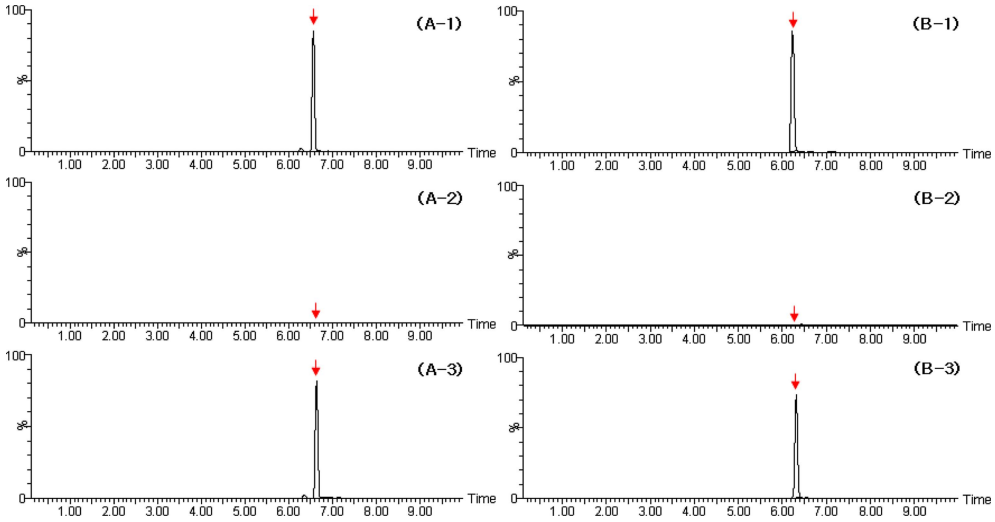


Fig. 5. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of (A-1) phorate sulfoxide standard at 0.05 mg/kg, (A-2) beef control, (A-3) recovery sample, (B-1) phorate oxon sulfoxide standard at 0.05 mg/kg, (B-2) beef control, and (B-3) recovery sample.

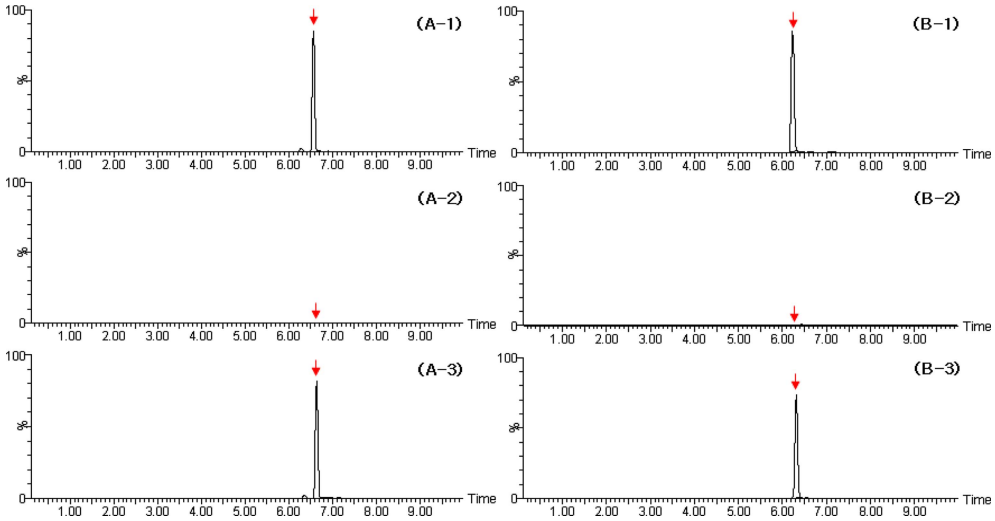


Fig. 6. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of (A-1) phorate sulfone standard at 0.05 mg/kg, (A-2) beef control, (A-3) recovery sample, (B-1) phorate oxon sulfone standard at 0.05 mg/kg, (B-2) beef control, and (B-3) recovery sample.

인(CODEX Alimentarius Commission, CAC/GL 40, 2003)의 잔류농약 분석 기준에서 > 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg의 30%, > 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg의 20%, > 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg의 15%보다 낮아 기준에 부합하므로 본 연구에서 개발한 추출 정제 방법이 축산물 중 잔류하는 포레이트 및 대사산물 5종을 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다(Table 6). LC-MS/MS를 이용하여 분석한 소고기 중 포레이트 및 대사산물 5종 회수율 크로마토그램은 Figs. 4-6에 제시하였다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of “Safety Evaluation and Analysis Method on Pesticide Residues in Foods-2014 (14161MFDS009)” from Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea in 2014.

국문요약

이 연구는 축산물 중 포레이트 및 대사산물 5종의 안전관리를 위한 공정분석법을 확립하기 위하여 수행하였으며 분석법의 선택성, 검출한계 및 정량한계, 회수율에 대한 검증을 통하여 포레이트 및 대사산물 5종의 공정시험법으로의 유효성을 확인하였다. 포레이트 및 대사산물 5종을 신속하고 효과적으로 동시에 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 사용하였고, 1% 아세트산 포함 아세토니트릴 추출 후

PSA, C18을 이용해 정제하였다. 개발된 분석법의 평균 회수율은 79.2-113.9%였으며, 분석오차는 19.2% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 개발된 분석법은 국제적 잔류농약 분석 가이드라인에 적합한 수준이었으며 축산물 중 포레이트 및 대사산물 5종의 잔류검사를 위한 공정분석법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. Macbean, C., The pesticide manual sixteenth ed, BCPC, pp. 883-884 (2012).
2. WHO, World Health Organization, JMPR document. (2004) Available from http://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/document/165.
3. KCPA, Korea Crop Protection Association, Agrochemicals Use Guide Book, pp. 729-730, (2014) Available from http://www.koreacpa.org/korea/bbs/board.php?bo_table=3_3
4. NIER, National Institute of Environmental Research, Hazardous Chemical Substance Classification and Labelling System. (2004) Available from http://ncis.nier.go.kr/ghs/hcs/search/search_01
5. WHO, World Health Organization. WHO/PCS/95.2, Pesticide residues in food: 1994 evaluations Part II Toxicology. 882. Phorate on INCHEM (1995) http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v94pr08.htm
6. M.C. Bowman, Morton Beroza, and James A. Harding, Determination of Phorate and Five of Its Metabolites in Corn. J.Agric. Food Chem., **17**(1), 138-142 (1969).
7. Sunny Y. Szeto and Marilyn J. Brown., Gas-Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Disulfoton, Phorate, Oxydemeton-Methyl, and Their Toxic Metabolites in Asparagus Tissue and Soil. J. Agric. Food Chem., **30**, 1082-1086 (1982).
8. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Analytical methods of pesticide residues in foods, pp. 139-146, fourth ed (2013).
9. W. Guan, Z. Li, H. Zhang, H. Hong, N. Rebeyev, Y. Ye, and Y. Ma. Amine modified graphene as reversed-dispersive solid phase extraction materials combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pesticide multi-residue analysis in oil crops. Journal of Chromatography A., **1286**, 1-8 (2013).