pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 3, pp. 220~227 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.3.220

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

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Fluoroimide의 잔류농약 분석법 개선

김남영[1] · 박은지[1] · 심재한[2] · 이정미[1]* · 정용현[1] · 오재호[1]
[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 잔류물질과
[2]전남대학교 농업생명과학대학 농식품생명화학부

Improvement of an Analytical Method for Fluoroimide Residue in Agricultural Products Using LC-MS/MS

Nam Young Kim[1], Eun-Ji Park[1], Jae-Han Shim[2], Jung Mi Lee[1]*, Yong Hyun Jung[1], Jae-Ho Oh[1]
[1]*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*
[2]*Division of Applied Bioscience and Biotechnology College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju, Korea*

(Received February 4, 2021/Revised May 24, 2021/Accepted May 24, 2021)

ABSTRACT - Fluoroimide is a fungicide and is also used as a pesticide for persimmons and potatoes. The established fluoroimide pesticide analysis method takes a long time to perform and uses benzene, a carcinogen. In addition, a lower limit of quantification is required due to enforcement of the Positive List System. Therefore, this study aimed to improve the analysis method for residual fluoroimide to resolve the problems associated with the current method. The analytical method was improved with reference to the increased stability of fluoroimide under acidic conditions. Fluoroimide was extracted under acidic conditions by hydrogen chloride (4 N) and acetic acid. $MgSO_4$ and NaCl were used with acetonitrile. C_{18} (octadecylsilane) 500 mg and graphitized carbon black 40 mg were used in the purification process. The experiment was conducted with agricultural products (hulled rice, potato, soybean, mandarin, green pepper), and liquid chromatograph-tandem mass spectrometry was used for the instrumental analysis. Recovery of fluoroimide was 85.7-106.9% with relative standard deviations (RSDs) of less than 15.6%. This study reports an improved method for the analysis of fluoroimide that might contribute to safety by substituting the use of benzene, a harmful solvent. Furthermore, the use of QuEChERS increased the efficiency of the improved method. Finally, this research confirmed the precise limit of quantification and these results could be used to improve the analysis of other residual pesticides in agricultural products.

Keywords: Fluoroimide, LC-MS/MS, Pesticide residue, Recovery

Fluoroimide는 pyrrole계열의 살진균제로서 감과 감자의 둥근무늬낙엽병 및 역병 방제에 사용되고 있는 농약이다[1)]. 국내에서 fluoroimide의 일일섭취허용량(acceptable daily intake, ADI)은 0.093 mg/kg b.w./day로 설정되어있으며, 최대잔류허용기준(maximum residue limit, MRL)은 감 0.5 mg/kg, 감자 0.1 mg/kg으로 설정되어있다[2)]. 국외의 경우 일본은 3-35 mg/kg의 수준으로 총 4개 품목에서 잔류허용기준이 설정되어 있으나, 그 외 CODEX, European Commission, Environmental Protection Agency에서는 fluoroimide에 대해 기준이 설정되어 있지 않다.

우리나라 식품의약품안전처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)에서는 농산물에 대한 안전관리를 강화하기 위해 농약허용물질목록관리제도(positive list system, PLS)를 도입하였다. PLS는 잔류허용기준이 설정되어있지 않은 농약에 대해 일괄적으로 0.01 mg/kg (ppm)의 허용기준을 적용하는 제도로써 2016년 12월 31일부터 견과종실류 및

*Correspondence to: Jung Mi 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 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4205, Fax:+82-43-719-4200
E-mail: mythljm@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

열대과일류에 적용을 시작으로 2019년 1월 1일부로 모든 농산물에 PLS를 적용하였으며, 이로 인해 잔류 농약에 대해 정밀하고 낮은 정량한계를 충족할 수 있는 시험법이 필요하다.

기존의 fluoroimide 분석으로는 강과 논에서 fluoroimide를 NaCl용액 및 dichloromethane, sodium sulfate 으로 추출하여 GC-ECD를 통해 회수율을 82.4% 까지 확인한 결과가 있다[3]. 또한, 감자와 당근에서 fluoroimide를 acetonitrile 및 acetone으로 추출 후 감압여과하여 dichloromethane으로 분액 추출한 뒤 GC-ECD/NPD로 fluoroimide를 분석하여 회수율을 87%까지 확인한 선행연구가 있다[4]. 선행연구에서 회수율은 가이드라인 범위를 만족하나, 본 연구는 대표 농산물에서 적용이 가능하고 전처리방법을 간소화시킴과 동시에 PLS도입에 따라 정밀한 정량한계를 위해 새로운 fluoroimide의 시험법을 모색하고자 하였다.

Fluoroimide는 120°C 이하의 온도 및 자외선과 가시광선에 안정한 특성을 보인다. 그러나 pH에는 민감하여 pH 조건에 따라 가수분해 되는 특성이 있는데, 높은 pH에서 짧은 소멸시간(DT_{50}: Disappearance time 50)을 보인다. 표준품회사 Wako사에서는 fluoroimide 표준품의 DT_{50}을 pH 8에서 1.4분, pH 7에서 7.5분, pH 3에서는 52.9분으로 표기하고있다. Fluoroimide는 잔류농약분석법에서 강산성의 조건을 유지하여 안정시킬 필요가 있으며, 불안정한 특성을 보완하기 위해 전처리 시간을 줄인다면 높은 효율을 나타낼 것으로 사료된다. 분석방법을 간소화시키기 위해 QuEChERS법을 적용하고자 하였으며, QuEChERS법은 농약을 분석하는 방법 중에서도 신속하고, 저렴하고, 쉽고 단순한 방법으로 좋은 전처리 방법이 될 수 있다[5]. Fluoroimide의 잔류농약분석법은 검체의 추출 및 정제과정에서 benzene을 사용하는 방법으로, 발암물질인 benzene은 시험자가 만성으로 노출될 시 백혈구감소증, 재생불량성빈혈, 백혈병등을 유발하며[6,7], 국제암연구소(International agency of research on cancer, IARC)에서는 benzene을 Group 1(Carcinogenic to humans)로 분류하고 있다[8,9]. 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 fluoroimide를 전처리함에 있어서 산성에서 안정한 fluoroimide의 특성을 바탕으로 산을 첨가하고, QuEChERS법을 적용하여 빠르고 효율적인 전처리를 실시하였다. 또한, 발암물질인 benzene을 acetonitrile로 대체함으로서 시험자의 안전성에 기여하여 해당 전처리법은 fluoroimide 분석에 적합한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 fluoroimide 분석법을 개선하여 기존 시험법 대비 시험자의 안전과 pH에 민감한 fluoroimide의 특성을 고려해 산성조건에서 전처리를 진행하여 안정성을 높이고자 하였으며, 빠르고 효과적인 전처리 과정을 통해 분석효율을 높이고자 하였다.

Materials and Methods

농약 및 시약

실험에 사용된 fluoroimide (99.0%) 표준품은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 추출과정 및 이동상 용매에 쓰인 acetonitrile과 methanol은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Hessen, Germany)에서 구입하였으며, 검체 중 fluoroimide 추출에 사용된 $MgSO_4$는 Junsei (Tokyo, Japan), NaCl은 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Fluoroimide가 처리된 농산물의 추출액을 정제하기위해 쓰인 C_{18}과 GCB (Graphitized Carbon Black)는 Waters (Milford, MA, USA) 사 제품을 사용하였으며, PSA (Primary Secondary Amine)는 Agilent Technologists (Santa Clara, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 추출 및 정제 후 여과에 사용된 PTFE syringe filter (0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma (Sant cugat del vallès, Barcelona, Spain)에서 구입하였다. 실험에 사용된 농산물 5종은 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[10]의 잔류농약의 식품군별 대표작물로서 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류)로 무농약제품으로 사용하였다. 5가지 검체를 균질화 하여 밀봉된 용기에 담아 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Fluoroimide의 검량곡선 작성

Fluoroimide의 표준품을 2% acetic acid가 함유된 acetonitrile에 희석하여 100 μg/mL로 제조하였다. 표준용액은 Matrix-matched 영향을 감안하여 fluoroimide를 처리하지 않은 추출물 900 μL에 fluoroimide 표준용액 100 μL를 첨가하여, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 μg/mL의 농도로 제조하였다. 제조된 fluoroimide의 표준원액은 50 mL 갈색유리병에 담아 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

검체 5 g(곡류 및 두류는 분쇄하여 체눈크기 500 μm test sieve (Chung gye Industrial, Gunpo, Korea)로 통과, 서류와 채소류, 과일류는 분쇄)를 50 mL 원심분리관에 넣고 4 N HCl을 첨가하였다(곡류 및 두류는 4 N HCl 10 mL 첨가 후 10분 습윤화, 서류와 채소류, 과일류는 4 N HCl 2 mL 첨가). 그 후 2% acetic acid 함유 acetonitrile 20 mL을 넣고 진탕기(JP/SR-2W, TAITEC, Koshigaya, Japan)에서 10분 동안 진탕하였다. 진탕 뒤 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl을 첨가하여 1분간 다시 진탕하고, 4°C, 4,500 × g 조건 아래 10분간 원심분리[11] 하였다(Megafuge 16R, Thermo scientific, Waltham, MA, USA). 원심분리 후 상등액은 PTFE (polytetrafluoroethylene) syringe filter (0.2 μm × 13 mm)를 사용하여 여과한 뒤, 시험용액으로 사용하였다.

Table 1. Analytical conditions of LC-MS/MS for the determination of fluoroimide

Condition	Content		
Instrument	LC: Accela (Thermo, Waltham, MA, USA) MS/MS: TSQ Vantage (Thermo, Waltham, MA, USA)		
Chromatographic separation			
Column	Imtakt UK-C8 (Imtakt, Kyoto, Japan) (2.0 mm I.D. × 100 mm L, 3 μm)		
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Column temperature	40°C		
Mobile phase	A : 5 mM Ammonuim formate in water B : 5 mM Ammonuim formate in methanol		
	Gradient	Time (min)	B (%)
	0	90	10
	1.5	90	10
	3.0	10	90
	5.0	10	90
	5.1	90	10
	8.0	90	10
MS/MS condition			
Spray voltage	3.7 kV		
Capillary temperature	320°C		
Vaporizer temperature	300°C		

기기 분석

기기분석은 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS, LC-ACCELA, Mass spectrometry-TSQ vantage, Thermo scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, 기기조건은 Table 1에 나타내었다. 이온화 방법으로는 electrospray ionization (ESI) 방법의 positive-ion mode를 선택하였으며, 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 선정하고, 최적 조건의 정량이온과 정성이온을 선택한 뒤 collision energy (CE) 값을 설정하여 분석을 진행하였다.

시험법의 유효성 검증

시험법 검증은 'CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)'과 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원에서 제시하고 있는 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'을 근거로 하여 검증하였다[10,12]. 가이드라인의 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantfication, LOQ), 선택성(selectivity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 민감도(sensitivity), 직선성(linearity)과 같은 검증요소를 바탕으로 하여 개선된 시험법을 검증하였다. Fluoroimide 검량선(matrix-calibration curve)은 총 7개 농도로 하였으며, 각 농도별 peak의 area 값으로 계산하고 직선성을 판단하기 위한 결정계수 R^2값을 표기하였다. 해당 5개 검체에 대해 검토농도를 LOQ, 10 × LOQ, 50 × LOQ로 하여 회수율을 확인하였으며, 농도별 5반복 수행하여 시험법의 정확성과 정밀성을 검토하고 회수율의 평균 및 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산해 회수율을 검증하였다. 시험법의 검증은 타기관에서 동일한 시험법으로 검증을 진행하였다.

Results and Discussion

추출 정제과정 최적화

Fluoroimide의 추출 및 정제 과정은 몇 가지의 조건을 달리하여 최적의 조건을 선택하여 실험을 진행하였다. 농산물 5개 검체 중 fluoroimide의 회수율을 CODEX 가이드라인에 적합한 수치로 도출하기 위해, fluoroimide의 안정성을 높일 수 있는 낮은 pH에서 추출과정을 진행하고자 하였다. 추출 중 습윤화 과정에서 4N의 HCl을 첨가하여 강산성의 상태를 유지하고 추출용매에 acetic acid를 첨가해 산성 조건을 유지하고자 하였다. 현미와 대두의 경우 4 N HCl을 5 mL과 10 mL (pH 0.20-0.23), 감자와 감귤, 고추는 1 mL과 2 mL (pH 0.28-0.35)로 첨가 조건을 나누어 비교하였다. 추출용매는 acetic acid가 포함된 acetonitrile을 사용하였으며, acetic acid의 조건을 2%와 4%로 하여 비교하였다. Fig. 1(A)를 보면, 현미와 대두에서 4 N HCl 5 mL 보다는 10 mL에서 더 좋은 회수율이 확인되었으며, acetic acid의 농도에 따른 회수율은 큰 차이를 보이지 않아 2% acetic acid로 하였다. 현미와 대두의 최종적으로 확립된 추출 조건은 4 N HCl 10 mL로 습윤화를 진행하고, 2% acetic acid가 포함된 acetonitrile을 추출용매로 하였다. Fig. 1(B)에서 다른 검체인 감자, 감귤, 고추의 결과를 보면 감자에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 감귤에서는 4N HCl 2 mL과 2% acetic acid 조건에서 좋은 회수율을 보였고, 고추에서는 4N HCl 1 mL과 4% acetic acid 조건에서 좋은 회수율을 보였다. 모든 검체 중 현미, 대두, 감귤에서 4N HCl 2 mL, 2% acetic acid의 추출용매 조건이 적합한 결과로 확인되어 최종적으로 4 N HCl 2 mL, 2% acetic acid acetonitrile로 결정하였다.

정제조건은 C_{18} (Octadecylsilane)과, PSA (primary secondary amine), GCB (graphitized carbon black)를 사용하여 조건을 확립하고자 하였다. d-SPE (dispersive-solide phase extraction) 정제과정에 쓰이는 PSA는 (+) 전하를 띠는 작용기로 (-) 전하를 띠는 유기산과 같은 물질을 제거하는 역할을 하며, C_{18}은 지질과 같은 비극성 간섭물질을 제거

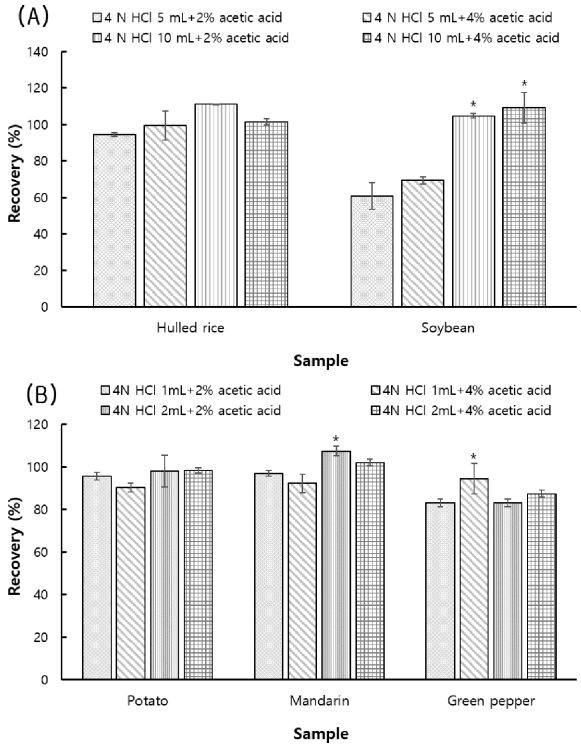

Fig. 1. Comparison of extraction solvent for fluoroimide analysis (n=3). Means with different letters are significantly different (P<0.05).

하는 역할을 한다. 또한, GCB는 클로로필, 스테롤, 카로티노이드 등의 색소를 제거하는데, 본 연구에서는 이러한 정제재의 첨가량별 회수율 확인과 2가지 이상의 정제제를 혼합하였을 때 회수율을 측정하였다[12,13]. Fig. 2를 보면, C_{18}의 경우 250, 500, 750 mg의 조건으로 나누어 회수율을 확인한 결과 유의적인 차이는 보이지 않았으나 그 중 높은 회수율을 보인 500 mg 조건을 선택하였고, PSA의 경우 첨가량 대비 큰 차이를 보이지 않아 100 mg을 선택하였다. GCB는 모든 조건에서 100% 이상의 높은 회수율을 보여 색소의 제거가 확인되는 40 mg으로 선택하였다. C_{18}과 PSA, GCB 정제재 중 2-3가지를 혼합하였을 때 회수율을 측정한 결과, 2가지 혼합과 3가지 혼합 총 4개 조건에서 회수율은 모두 CODEX 가이드라인에 부합한 회수율을 나타냈다(Table 2). 그 중에서 가장 높은 회수율을 보인 C_{18}과 GCB의 혼합물을 선택하였다. PSA는 첨가시 알칼리성이 되므로 산성에 안정한 fluoroimide의 성질과 맞지 않아 최종적으로 배제하였다. 최종적으로 Association of Official Analytical Chemists의 QuEChERS법을 변형하여 결정된 fluoroimide의 추출 및 정제조건을 확립하였으며(Fig. 3), 재료 및 방법에서 서술한 추출 및 정제를 진행하였다[14]. 전처리 후 LC-MS/MS를 이용하여 기기분석을 실시하였다.

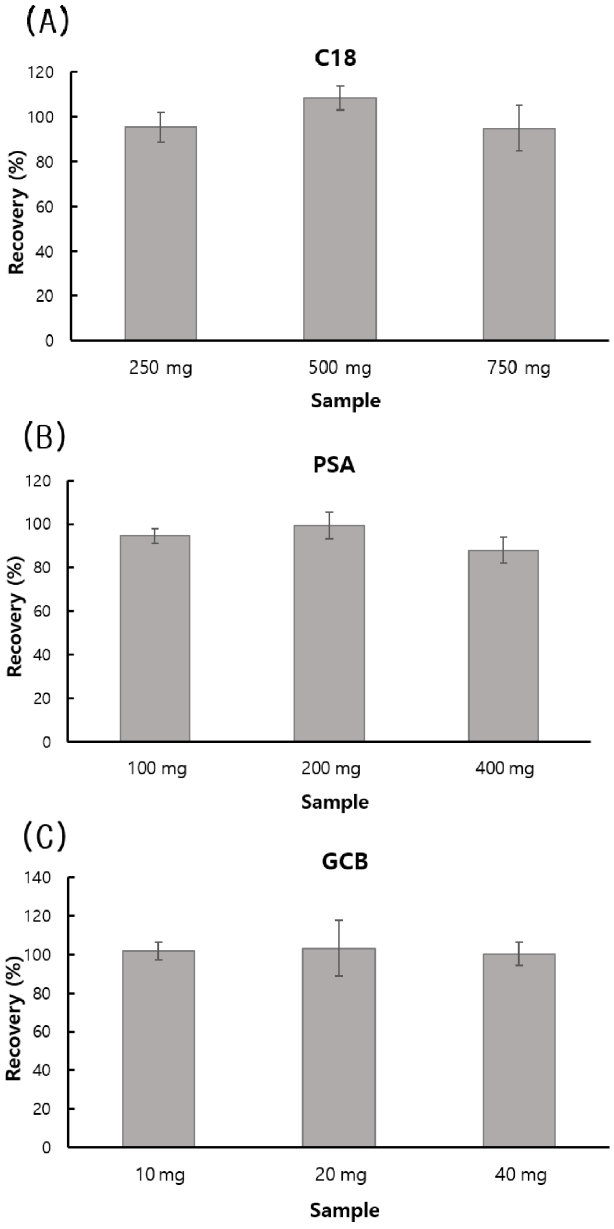

Fig. 2. Comparison of purification meterials for fluoroimide analysis (n=3). Means with different letters are significantly different (P<0.05).

Table 2. Recovery rate of fluoroimide purification conditions

Purification materials	Recovery (%)
C_{18} (500 mg) + GCB (40 mg) + PSA (100 mg)	99.1±7.6
C_{18} (500 mg) + GCB (40 mg)	104.3±10.7
C_{18} (500 mg) + PSA (100 mg)	93.5±9.1
GCB (40 mg) + PSA (100 mg)	103.2±9.1

기기분석조건 확립

추출 및 정제조건을 확립한 fluoroimide에 대해 기기분석 조건을 확립하고자 하였다. 기존 fluoromide의 분석법

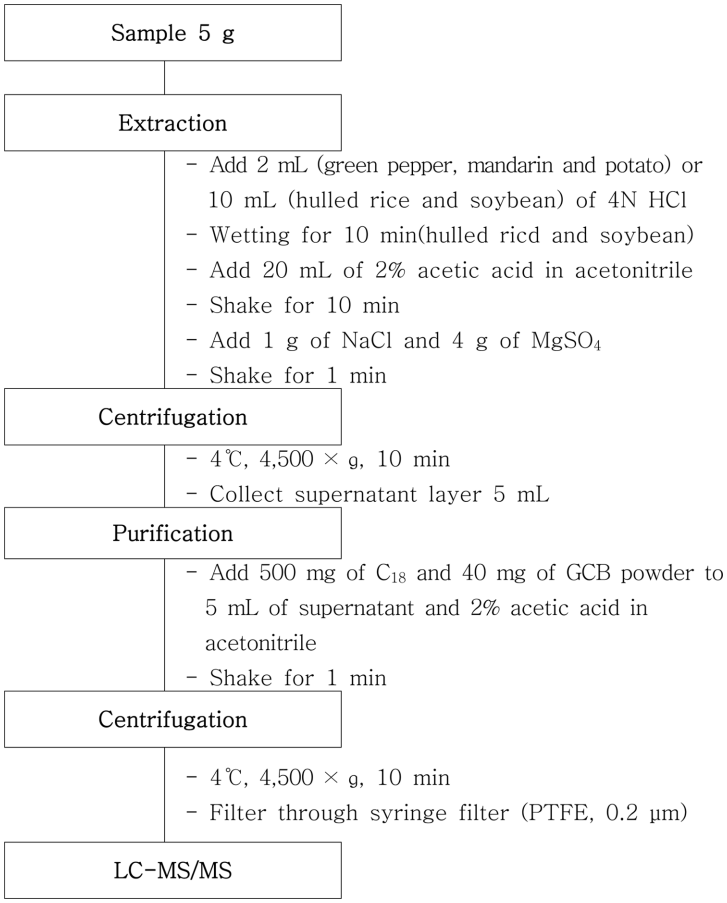

Fig. 3. Flow chart for fluoroimide analysis.

Table 3. Selected-ions of LC-MS/MS for fluoroimide

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[a)] (eV)
Fluoroimide	4.0	260.1	258.96	259	110[b)]	31
					83	43
					168	24

[a)]Collision energy.
[b)]Quantification ion.

에는 GC/ECD를 사용하는 것으로 되어있으나[15], fluoroimide는 Log P_{ow}값이 3.04인 중간극성 화합물로, 120℃ 이하에서 안정하고 휘발성이 낮은 특성을 가지고 있어 GC로 분석하기에 어려움이 있다. 또한 2019년부터 모든 농산물에 대해 확대 시행된 PLS에 따라 기준이 없는 경우 불검출 수준(0.01 mg/kg)으로 적용하기 때문에 정량한계 0.05 mg/kg인 기존방법의 개선이 필요하다. 이를 위해 액체크로마토그래피-질량분석기(liquid chromatograph-tadem mass spectrometry, LC-MS/MS)를 선택하였으며. 칼럼은 Imtakt UK-C_8 (2.0 mm I.D. × 100 mm L, 3 μm)을 사용하였다. 칼럼선택의 경우 C_{18} 칼럼 XbridgeTM C_{18} (2.1 mm I.D. × 100 mm L, 3.5 μm), MGII C_{18} (2.0 mm I.D. × 100 mm L, 3 μm), Accucore C_{18} (2.1 mm I.D. × 100 mm L, 2.6 μm)와 UK-C_8 (2.0 mm I.D. × 100 mm L, 3 μm)을 사용하여 fluoroimide의 peak를 비교 분석하였다. Fig. 4를 보면, fluoroimide 분석 시 (A)-(C)에서 peak의 폭이 넓고, 쪼개짐에 대한 문제가 확인 되었으나, (D)에서는 peak의 분리가 잘되었으며 가이드라인에 부합하는 S/N값과 높은 선택성을 보여, 최종적으로 C_8 칼럼을 선택하였다. 이동상 용매는 acetonitrile과 methanol, 증류수를 검토하고 acetic acid, formic acid를 확인하였을 때 peak의 형태나 tailing 현상으로 감도가 좋지 않아 최종적으로 5 mM Ammonium

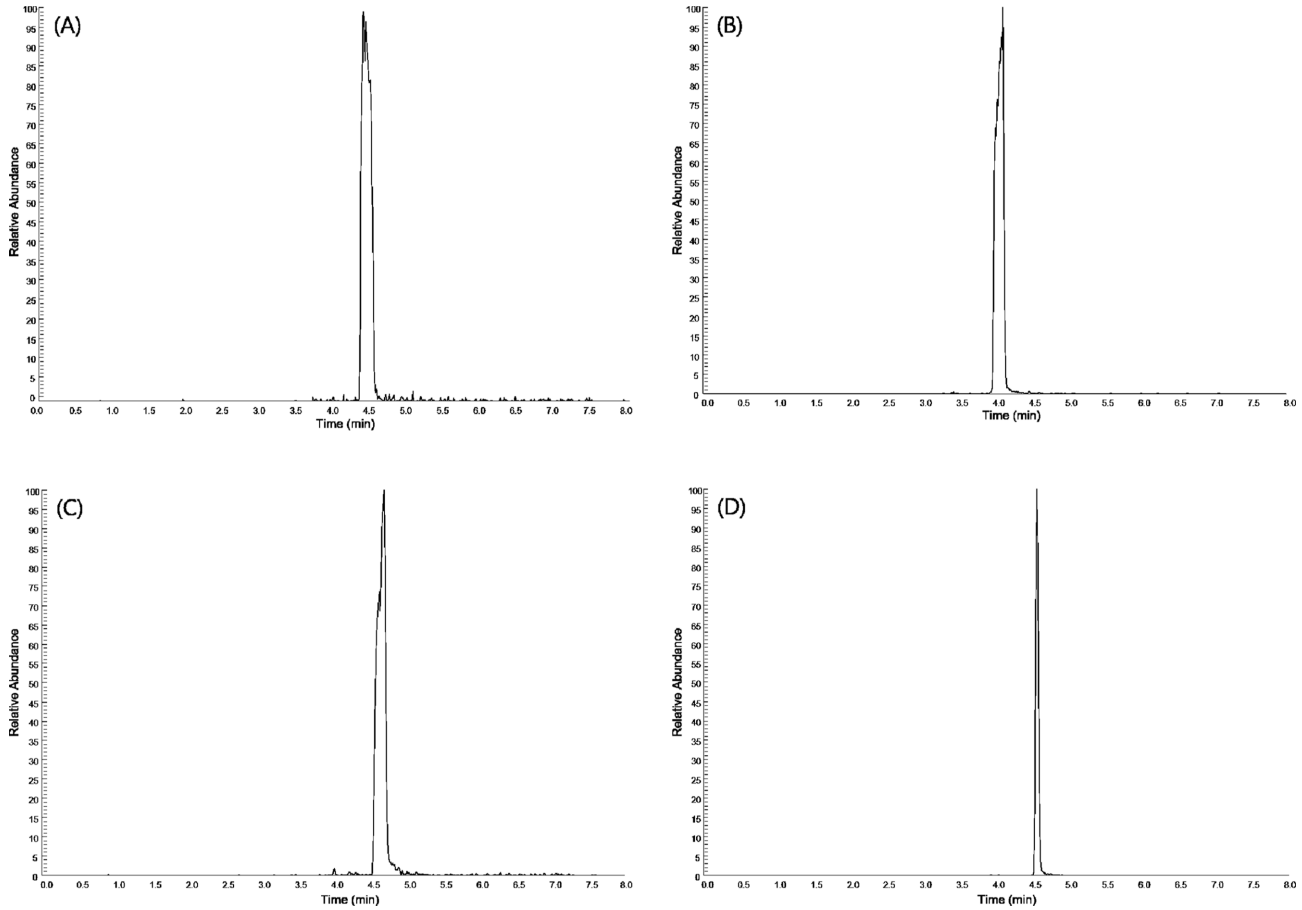

Fig. 4. Chromatogram of fluoroimide by column type. (A): Xbridge TM C_{18}, (B): MGII C_{18}, (C): Accucore C_{18}, (D): UK-C_8.

formate 물과 5 mM Ammonium formate methanol을 사용하였으며, 기울기 용리 방식으로 진행하였다. Fluoroimide는 $[M+H]^+$ 형태로 이온화되기 때문에, 이온화법으로는 ESI에서 positive-ion mode를 사용하였으며, 기기에서의 이온화 조건은 Table 3에 나타내었다. LC-MS/MS 분석은 매트릭스의 간섭현상을 고려하여 측정 검체에 대해 matrix-matched calibration 법으로 정량하였다.

직선성 확인

Fluoroimide의 회수율은 구간별 농도에 따른 calibration curve를 작성하여 계산하였다. 매질간섭효과를 감안하여 표준원액을 5가지 검체별로 matrix-matched calibration curve를 작성하고 각 curve의 직선성(linearity)을 검증하였다. Table 4를 보면 5가지 검체에서 총 7개 농도 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 calibration curve의 결정계수 r^2값이 0.99 이상으로 CODEX 가이드라인($r^2 \geq 0.98$)에 부합한 결과로 높은 직선성을 확인할 수 있었다. 해당 calibration curve를 통해 현미, 감자, 대두, 감귤, 고추 5가지 검체에 대한 fluoroimide의 회수율을 확인하였다.

Table 4. Matrix-matched calibration curve formula of fluoroimide

Sample	Calibration curve equality	R^2
Hulled rice	y = 158.94x - 27.001	0.9996
Potato	y = 143.5x - 20.132	0.9996
Soybean	y = 170.83x - 3.291	0.9993
Mandarin	y = 301.5x + 391.28	0.9996
Green pepper	y = 224.89x + 382.26	0.9988

Fluoroimide의 회수율 확인

Fluoroimide의 회수율은 CODEX 가이드라인에 따라 농도를 LOQ, 10 × LOQ, 50 × LOQ로 설정하여 확인하였다. 5가지 검체별 회수율을 Table 5에 표시하였고, QuEChERS법에 따라 개선된 fluoroimide의 시험법에 대한 검증은 전남대학교에 의뢰하였으며, 회수율은 CODEX 가이드라인에 따라 그 결과값을 확인 및 검증하였다. LOQ, 10 × LOQ, 50 × LOQ의 농도에서 현미의 회수율은 89.6-105.7%, 감자는 93.6-98.8%, 감귤은 85.7-96.8%로 확인되었고, 감귤과 고추는 각각 85.7-96.8%과 89.9-93.8%의 회

Table 5. Inter-laboratory validation results of analytical method for fluoroimide residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[1)](%)		Ave[2)] (%)	CV[3)] (%)
		Lab. A[4)]	Lab. B[5)]		
Hulled rice	0.01	89.6±8.0	104.3±9.4	95.1	11.3
	0.1	104.6±5.5	94.8±11.6	100.9	8.8
	0.5	105.7±2.5	106.1±0.6	105.8	1.9
Potato	0.01	97.6±13.4	110.2±5.8	102.3	12.0
	0.1	98.8±6.2	104.0±1.5	100.8	5.4
	0.5	93.6±0.7	106.7±7.6	98.6	8.2
Soybean	0.01	99.7±13.2	96.7±10.4	98.6	11.6
	0.1	102.3±3.5	107.6±1.1	104.3	3.7
	0.5	106.9±3.7	108.1±6.6	107.4	4.5
Mandarin	0.01	85.7±9.3	100.1±6.6	91.1	11.9
	0.1	96.8±3.2	97.6±7.5	97.1	4.7
	0.5	93.7±2.9	85.3±7.8	90.5	6.6
Green pepper	0.01	93.8±15.6	110.9±3.1	100.3	14.3
	0.1	89.9±6.0	95.5±3.6	92.0	5.8
	0.5	92.3±4.9	104.9±7.6	97.0	8.8

[1)]Recovery ± RSD: Mean values of 5 and 3 times replications with standard deviation.
[2)]Ave: Recovery average of inter-laboratory.
[3)]CV: Coefficient of variation of inter-laboratory.
[4)]Lab. A: Ministry of Food and Drug safety, Pesticide & Veterinary Drug Residue division.
[5)]Lab. B: Chonnam National University, Natural Products Chemistry Laboratory.

수율을 나타내었다. 본 연구에서 확인한 fluoroimide의 회수율은 모두 CODEX 가이드라인에 제시된 회수율 기준범위를 만족하였다. 상대표준편차 CV의 기준범위는 실험실 내 기준 해당 농도에서 최소 18-32%의 기준 범위이며, Table 5의 Lab. A인 잔류물질과에서 확인한 상대표준편차는 최대 15.6%로 가이드라인에서 제시하고 있는 기준범위를 만족하였다.

Lab. B(전남대학교)에서 검증한 결과는 현미가 94.8-106.1%, 감자에서 104.0-110.2%의 회수율을 보였고, 대두 96.7-108.1%, 감귤 85.3-100.1% 그리고 고추에서 95.5-110.9%의 회수율을 보였다. 검증기관 Lab B에서 확인한 회수율은 농도별로 가이드라인의 기준 범위에 만족하는 회수율 보였으며, 상대표준편차는 11.6% 이하로 가이드라인에 만족하는 결과를 확인하였다. 잔류물질과와 전남대학교의 실험실 간 회수율은 90.5-107.4%, 상대표준편차는 14.3% 이하로 기준 범위를 만족하여, 시험법의 정확성과 정밀도를 검증하였다.

본 연구에서는 pyrrole계열의 살진균제인 fluoroimide에 대한 잔류농약 시험법을 개선하고자 하였다. 그동안 많이 사용된 fluoroimide에 대한 시험법은 복잡하고 1급 발암물질인 benzene을 사용하였으며, 2019년부터 전면시행된 PLS 제도에 맞춰 낮은 잔류허용기준(0.01 mg/kg)을 고려해야 하는 문제점이 있었다[8,9]. 이와 같은 문제를 개선하기 위해 benzene은 acetonitrile로 대체하여 시험자의 안전성을 확보하였으며, 0.01 mg/kg 이하의 정량한계 수준으로 PLS 제도에 부합한 조건으로 개선하였다. Fluoroimide를 분석하기 위한 전처리 과정은 빠르고 간편한 QuEChERS법을 적용하여 분석시간을 단축시키고 효율을 높였다[5]. 또한, pH에 민감한 fluoroimide의 특성을 고려하여 전처리 과정 중 낮은 pH를 유지시키기 위해 HCl 및 acetic acid를 첨가하여 전처리 과정 중 fluoroimide의 안정성을 확보하였다.

Acknowledgments

This study was supported by a grant (19161수안기582) of MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY in 2019, Republic of KOREA.

국문요약

Fluoroimide는 감과 감자의 둥근무늬낙엽병과 역병을 억제하는데 효과가있는 살진균제로서, 이전 사용되었던 fluoroimide의 시험법은 전처리시 발암물질인 benzene을 사용하는 문제가 있었으며, 복잡한 시험법으로 인해 시간이

오래걸리고 효율이 떨어지는 단점이 있었다. 또한, fluoroimide의 특성상 산성에서 안정한 편이므로 전처리 시 이를 고려해야 하는 문제가 있었으며, PLS시행에 따라 기존의 정량한계인 0.05 mg/kg보다 낮은 정량한계 요구로 인해 fluoroimide에 대한 새로운 전처리방법이 필요하였다. Fluoroimide가 산성에서 안정한 특성을 고려하여, 추출 시 4N의 염산을 사용하였고 용매는 acetic acid가 포함된 acetonitrile을 사용하였으며, $MgSO_4$와 NaCl을 통해 추출하였다. 정제는 C_{18} (Octadecylsilane)과 GCB (graphitized carbon black)를 첨가하여 정제하였으며, 기기분석은 LC-MS/MS로 분석하였다. 대표농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)을 대상으로 정량한계(0.01 mg/kg), 정량한계 10배(0.1 mg/kg), 정량한계 50배(0.5 mg/kg)의 수준으로 회수율 실험을 5반복 실시하였으며, 그 결과는 농산물 5종에서 85.7-106.9%의 회수율을 확인하였으며, 분석오차는 15.6% 이하의 결과를 보여, 국제식품 규격위원회 가이드라인의 잔류농약 분석 기준 및 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 부합하였다. 상기의 결과를 통해 개선한 fluoroimide의 시험법은 benzene을 대체해 실험자의 안전성을 확보하였고, QuEChERS법을 적용하여 효율을 높여, 안전관리에 대한 공정시험법으로서 활용가능할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Nam Young Kim	https://orcid.org/0000-0001-7608-4122
Eun-Ji Park	https://orcid.org/0000-0002-5812-4888
Jae-Han Shim	https://orcid.org/0000-0002-5361-2903
Jung Mi Lee	https://orcid.org/0000-0003-2840-5010
Yong Hyun Jung	https://orcid.org/0000-0002-7789-0836
Jae-Ho Oh	https://orcid.org/0000-0002-4298-1965

References

1. Paranjape, K., Gowariker, V., Krishnamurthy, V.N., Gowariker, S., 2014. The pesticide encyclopedia. CABI, Walling ford, Oxfordshire, UK, pp. 215.
2. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 2020. Pesticides MRLs in agricultural commodities. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju, Korea, pp. 157.
3. Mamun, I.R., Park, J.H., Choi, J.H., Kim, H.K., Choi, W.J., Han, S.S., Hwang, K.S., Jang, N.I., Assayed, M.E., El-dib, M.A., Shin, H.C., El-aty, A.M.A., Shim, J.H., Development and validation of a multiresidue method for determination of 82 pesticides in water using GC. *J. Sep. Sci.*, **32**, 559-574 (2009).
4. Kim, M.J., Jung, S.S., Park, J.S., Kim, J.E., Lee, Y.D., Kim, J.H., Oh, C.H., Application of the pesticide multiresidue analysis method for potatoes and carrots. *Korean J. Food Sci. Technol*., **37**, 304-307 (2005).
5. Ock, H.S., Developmental trend of analytical methods for pesticide residues. *Korean J. Pest. Sci*., **13**, 336-348 (2009).
6. Cha, C.H., Kim, K.J., Kim, J.C., Paik, N.W., Development of technology for environmental assessment and biological monitoring of workers exposed to benzene. *Korean J. Occup. Environ. Med*., **6**, 122-133 (1994).
7. An, S.C., Kang, J.W., Kim, H., Effects of benzene exposure on genetic damage of human white blood cells. *Chungbuk Med. J*., **13**, 189-204 (2003).
8. Blair, A., Marrett, L., Beane Freeman, L., Occupational cancer in developed countries. *Environ. Health*, **10(suppl 1)**, S9 (2011).
9. Baek, K., Park, D., Ha, K., Benzene exposure matrices using employee's exposure assessment data. *J. Korean Soc. Occup. Environ. Hyg.*, **25**, 146-155 (2015).
10. Hwang, I.G., Moon, G.I., Jang, M.I., Kim, S.H., Ko, Y.H., Jo, Y.J., Lee, S.M., Kang, Y.W., Heo, E.J., Im, H.S., Seo, I.W., Kang, T.S., 2016. Guideline on standard procedures for preparing analysis method. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, pp. 2-16.
11. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.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).
12. CODEX Alimentarius Commission, (2021, May 28). Guidelines on good laboratory practice in residue analysis (2003, CAC/GL 40-1993). Retrieved from https://products.ihs.com/Ohsis-SEO/779086.html
13. Wilkowska, A., Biziuk, M., Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.*, **125**, 803-812 (2011).
14. Rejczak, T., Tuzimski, T., A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.*, **13**, 980-1010 (2015).
15. Lee, S.J., Lee, G.S., Jang, M.I., Lee, S.M., Kim, H.J., Kim, M.K., Jo, Y.J., Kim, M.A., Lee, Y.D., 2017. Food code residue pesticide manual, fifth ed. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, pp. 610-612.