pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 3, pp. 228~238 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.3.228

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

GC-MS/MS를 이용한 농산물 중 잔류농약 5종 동시시험법 개발 및 검증

박은지[1] · 김남영[1] · 심재한[2] · 이정미[1]* · 정용현[1] · 오재호[1]
[1]식품의약품안전평가원, [2]전남대학교

Development and Validation of a Simultaneous Analytical Method for 5 Residual Pesticides in Agricultural Products using GC-MS/MS

Eun-Ji Park[1], Nam Young Kim[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]*College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju, Korea*

(Received January 7, 2021/Revised April 23, 2021/Accepted May 20, 2021)

ABSTRACT - The aim of this research was to develop a rapid and easy multi-residue method for determining dimethipin, omethoate, dimethipin, chlorfenvinphos and azinphos-methyl in agricultural products (hulled rice, potato, soybean, mandarin and green pepper). Samples were prepared using QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and analyzed using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Residual pesticides were extracted with 1% acetic acid in acetonitrile followed by addition of anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$) and anhydrous sodium acetate. The extracts were cleaned up using $MgSO_4$, primary secondary amine (PSA) and octadecyl (C_{18}). The linearity of the calibration curves, which waas excellent by matrix-matched standards, ranged from 0.005 mg/kg to 0.3 mg/kg and yielded the coefficients of determination (R^2) ≥ 0.9934 for all analytes. Average recoveries spiked at three levels (0.01, 0.1, 0.5 mg/kg) and were in the range of 74.2-119.3%, while standard deviation values were less than 14.6%, which is below the Codex guideline (CODEX CAC/GL 40).

Key words: Pesticide, Agricultural products, Analytical method, GC-MS/MS, QuEChERS

농업기술의 발달에 따라 농약의 사용은 농산물의 생산량과 품질은 향상시키고 노동시간은 단축시켰다. 농약은 농작물을 해치는 균, 곤충, 바이러스, 잡초 등을 방제하고 생리활성을 증진시키며 목적에 따라 살균제, 살충제, 제초제, 생장조절제로 나뉜다. 하지만 독성을 지니고 있어 종류 및 사용량에 따라 사람과 가축에 독성을 나타낼 수 있으며 환경을 오염시킬 수도 있다. 따라서 각 국가에서는 안전사용기준(good agricultural practice, GAP)과 농약잔류허용기준(maximum residue limits, MRL)을 설정하여 안전성을 확보하고 있다.

디메티핀은 잎의 팽창과 건조를 막아주는 식물생장조절제, 제초제로 화학식은 $C_6H_{10}O_4S_2$이며 210.3 g/mol의 분자량을 지닌다[1,2]. 물리화학적 특징을 살펴보면 Log P_{ow}가 –0.5로 극성 화합물의 특성을 나타낸다. 디클로르보스는 지방족 유기인계 살충제로 파리 및 바퀴벌레 구제용으로 많이 사용되고 있으며 가축용 살충제로 사용되기도 한다[3,4]. 화학식은 $C_4H_7Cl_2O_4P$이며 221.0 g/mol의 분자량을 지닌다. 물리화학적 특징으로는 Log P_{ow}가 1.4로 극성 화합물의 특성을 보인다. 오메토에이트는 유기인계 살충제로 진딧물, 응애 구제용으로 사용되고 있다. 화학식은 $C_5H_{12}NO_4PS$이며 213.2 g/mol의 분자량을 지닌다. 물리화학적 특징으로는 Log P_{ow}가 –0.9로 극성 화합물의 특성을 지닌다. 클로르펜빈포스는 유기인계 살응애제, 살충제로 자연계에 trans (*E*)-chlorfenvinphos와 cis (*Z*)-chlorfenvinphos로 존재하며 그 합으로 정의된다[5,6]. 화학식은 $C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$이며 의 359.6 g/mol분자량을 지닌다. 물리화학적 특징으로는 Log P_{ow}가

*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.

3.1로 비극성 화합물의 특성을 나타낸다. 아진포스메틸은 국내에서 사용빈도가 높은 유기인계 살충제로 노르스름한 결정 형태를 하며 화학식은 $C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$이며 317.3 g/mol의 분자량을 지닌다[7]. 물리화학적 특징으로는 Log P_{ow}가 2.8로 비극성 화합물의 특성을 보인다.

국내 농산물 중에 대한 기준으로는 디메티핀은 4종에 대한 MRL이 존재하며, 디클로보스는 35종, 오메토에이트는 42종, 클로르펜빈포스는 8종, 아진포스메틸은 69종에 대한 농약잔류허용기준이 존재한다[8]. 농산물에 대한 MRL 범위는 디메티핀은 0.05-0.5 mg/kg, 디클로보스는 0.05-5 mg/kg, 오메토에이트는 0.01-3 mg/kg, 클로르펜빈포스는 0.05 mg/kg, 아진포스메틸은 0.1-5 mg/kg 수준으로 설정되어 있으며 2019년 1월 1일부로 허용물질목록관리제도(positive limit system, PLS)가 모든 농산물을 대상으로 확대되었기 때문에 최저기준인 0.01 mg/kg 이하의 정량한계 수준을 만족하는 시험법이 필요하다.

또한 과거의 국내 식품공전 중 농산물의 디메티핀 시험법과 디클로르보스 등 19종 시험법은 전처리 과정 중 벤젠을 사용하고 있어 이를 대체하는 시험법 개발이 필요하였다. 벤젠은 세계보건기구(WHO)에서 인체발암물질 1군으로 분류한 인체에 유해한 대표적인 유해용매로 피부에 자극을 일으키거나 눈에 심한 자극을 일으키는 등 심하면 유전적인 결함이나 신체에 손상을 일으킬 수 있으며 환경에 미치는 독성도 치명적이다[9,10]. 이와 같은 이유로 본 연구에서는 기존의 19종 시험법 중 식품공전의 다른 시험법으로 정량이 가능한 것은 제외한 4종에 디메티핀을 추가한 5종에 대하여 유해 용매를 대체하고 정량 한계를 개선하는 동시다성분 시험법을 마련하고자 하였다.

Materials and methods

시약 및 검체

Dichlorvos (98%) 표준품은 Wako Pure Chemical (Osaka, Japan), omethoate (96.6%), dimethipin (99.0%) 그리고 chlorfenvinphos (99.3%) 표준품은 Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), azinphos-methyl (97.2%) 표준품은 Accustandard (New Haven, CT, USA)에서 구입하였다. 아세토니트릴(Acetonitrile)은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 황산마그네슘(Magnesium sulfate)은 Junsei (Tokyo, Japan), 아세트산(Acetic acid)은 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland), Primary secondary amine (PSA)는 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), C_{18}은 Waters (Milford, Ireland)로부터 구입하였다. 무농약 농산물 검체로 식품공전상 대표농산물 5종인 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류)를 구입하여 균질화 후 밀봉된 용기에 담아 –20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

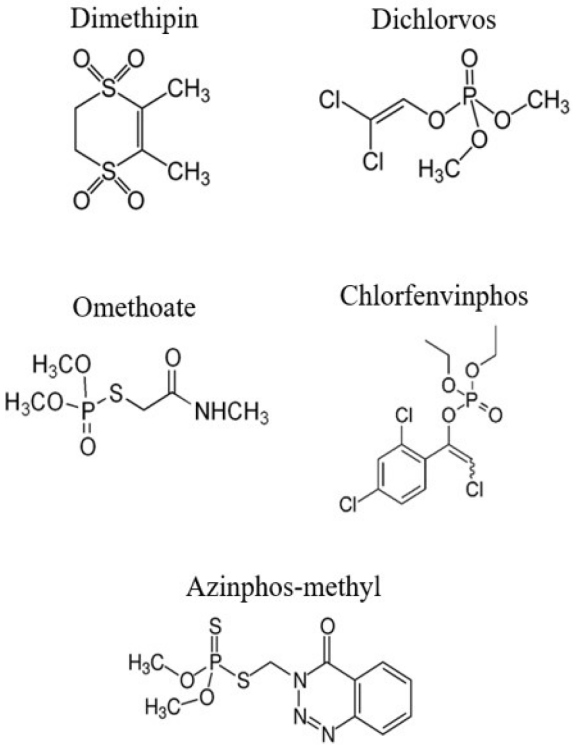

Fig. 1. Molecular structure of dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl.

표준원액 및 표준용액의 조제

디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸 표준품을 각각 아세톤에 용해하여 1,000 μg/mL (1,000 ppm)의 표준원액을 조제하였다. 각 표준원액 1,000 μg/mL을 혼합하여 100 μg/mL로 아세토니트릴에 희석하여 혼합표준용액으로 하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 검체의 무처리 추출물 900 μL에 10 μg/mL 표준용액 100 μL를 넣어 1.0 μg/mL 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 μg/mL의 농도가 되도록 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄하고 서류, 과일류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄하여 균질화 하였다. 균질화된 검체는 각각 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고, 곡류와 두류의 경우 각각 증류수 5 mL과 10 mL을 가하여 20분간 습윤화하였다. 1% 아세트산을 함유한 아세토니트릴 10 mL을 가하여 1분간 진탕 후 황산마그네슘 6 g, 아세트산나트륨 1.5 g을 가하여 교반진탕기(Eyela MMV-1000W, Tokyo Rikakikai

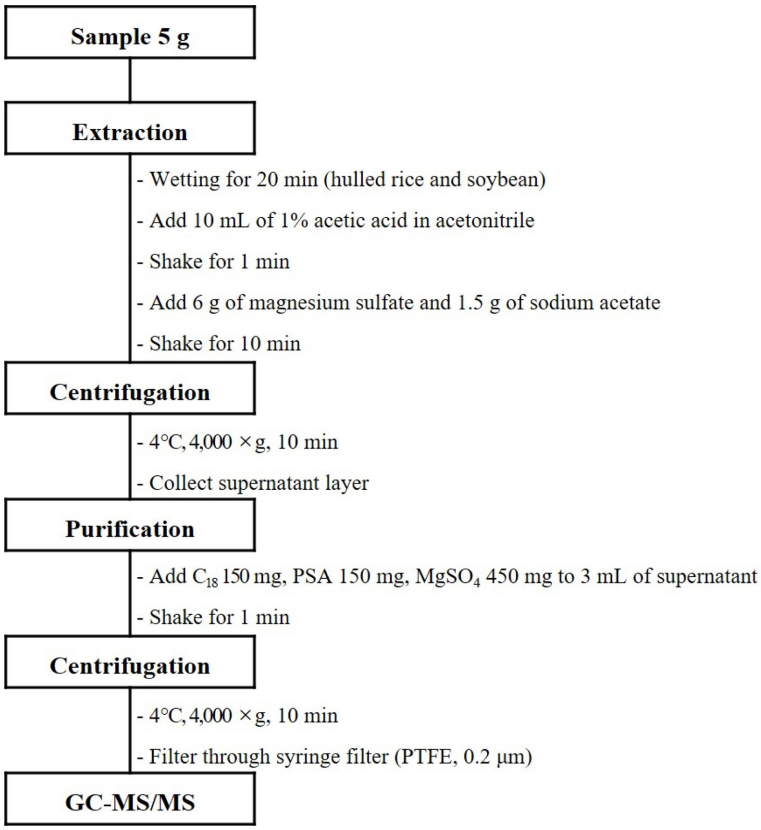

Fig. 2. Experimental flow chart for dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl.

Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 10분간 진탕하였다. 시료는 원심분리기(Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany)를 사용하여 4°C, 4,000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 3 mL을 취하여 C_{18} 150 mg, PSA 150 mg 및 황산마그네슘 450 mg이 담긴 15 mL 원심분리관에 넣고 1분간 진탕한 뒤 원심분리기를 이용하여 4°C, 4,000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 정제된 상등액을 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μm × 13 mm, Teknokroma, Barcelona, Spain)로 여과한 후 이를 시험용액으로 사용하였다(Fig. 2)[11,12,13].

GC-MS/MS 기기분석 조건

기기분석에는 7890B gas chromatography (GC) System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)과 7010 GC/MS Triple Quad (Agilent)를 사용하여 GC-tandem mass spectrometry (MS/MS) 분석을 하였다. 분석용 컬럼은 5% Diphenyl, 95% Dimethylpolysiloxan의 DB-5MS UI 컬럼(30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm, Agilent Technologies)을 이용하여 분리하였다. 컬럼 오븐 온도는 80°C에서 5분간 유지시킨 후 계속해서 10°C/분으로 300°C까지 승온시키고 3분간 유지하였다. 주입구의 온도는 280°C로 설정하였다. 이동상기체로는 헬륨을 사용하였으며 유속은 1.2 mL/분으로 설정하였다. 시료는 splitless mode로 1 μL씩 주입하였다. 질량분석기의 이온화 소스의 온도는 230°C로 설정하

Table 1. Analytical conditions of GC-MS/MS for the determination of dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl

Parameters	Condition		
Column	DB-5MS UI (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)		
Flow rate	1.2 mL/min		
Injection volume	1 μL		
Injection mode	Splitless mode		
Mobile phase	Helium (He)		
Injection temp.	280°C		
Oven temp.	Rate (°C/min)	Set point (°C)	Hold time (min)
		80	5
	10	300	3
MS/MS condition			
Ion source	EI		
Source temp.	230°C		
Electron energy	70 eV		

Table 2. Optimal MRM transition and parameters of GC-MS/MS analysis

Compound	Molecular weight	Exact mass	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[a] (eV)	RT[b] (min)
Dimethipin	210.3	210.00	118	58[c]	10	17.1
			124	76	10	
			124	59	40	
Dichlorvos	221.0	219.94	185	93[c]	20	10.3
			185	109	20	
			109	79	10	
Omethoate	213.2	213.02	156	110[c]	10	15.2
			156	79	30	
			110	79	10	
(*E*), (*Z*)-Chlorfenvinphos	359.6	357.96	323	267[c]	20	(*E*)-20.1 (*Z*)-20.3
			323	159	40	
			267	159	40	
Azinphos-methyl	317.3	317.00	160	77[c]	20	24.5
			160	51	40	
			132	77	20	

[a]CE: Collision energy.
[b]RT: Retention time.
[c]Quantitation ion.

였고 이온화법으로는 electron ionization (EI)법의 positive-ion mode를 사용하였다(Table 1). 감도가 우수한 이온을 정량이온(quantification ion) 및 정성이온(qualification ion)으로 선택하여 MRM (multiple reaction monitoring) 조건을 확립하였다(Table 2).

시험법 유효성 검증

확립된 디메티핀 등 5종 동시시험법의 유효성은 Codex 가이드라인[14] 및 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인[15]에 따라 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 기기상 검출한계(limit of detection, LOD), 기기상 정량한계(limit of quantification, LOQ), 시험법 정량한계, 정확성(accuracy) 및 반복성(repeatability) 확인을 통해 검증하였다. 선택성은 농산물 검체 5종의 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 시료의 크로마토그램을 비교하여 확인하였다. 직선성 확인을 위해 디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸을 검체의 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 표준용액 0.0005-0.3 mg/L의 농도로 제조하였다. 그리고 농도 범위에 대한 각각의 피크 면적을 토대로 검량선을 작성하고 검량선의 결정계수(coefficient of determination, R^2)를 구하여 직선성을 확인하였다. 기기상 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 검출된 피크의 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio, S/N) 각각 3, 10 이상으로 구하였고 최소검출농도와 전처리과정 중 희석배율을 계산하여 시험법 정량한계로 구하였다. 정확성 및 반복성을 위해 실험실내 검증과 실험실외 검증을 하였다. 실험실내 검증을 위해 농산물 검체 중 고추시료에 정량한계, 정량한계 10배 및 정량한계 50배에 해당하는 농도를 5반복 처리한 다음 정확도 및 정밀도를 계산하였다. 이 과정을 3일간 반복하여 일간(inter-day)정확도와 정밀도를 산출하였다. 회수율의 평균을 통해 정확도를 계산하였고, 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 통해 정밀도를 구하였다. 그리고 실험실외 검증을 위하여 서로 다른 두 실험실에서 농산물 검체 5종에 정량한계, 정량한계 10배 및 정량한계 50배에 해당하는 농도를 5반복 처리한 다음 회수율의 평균과 상대표준편차를 산출하였다.

Results and discussion

기기분석 조건 확립

디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 크로르펜빈포스 및 아진포스메틸은 분자구조 내에 황(Sulfur, S) 또는 인(Phosphorus, P)을 함유하고 있어 GC-FPD (gas chromatography-flame photometric detector) 또는 GC-NPD (gas chromatography-nitrogen phosphorous detector)를 이용한 분석이 가능하다[16-19]. 하지만 2019년 1월 1일부터 PLS가 모든 농산물을 대상으로 확대되어 잔류허용기준이 설정되지 않거나 허가되지 않은 농약에 대해서 일률적으로 0.01 mg/kg의 잔류허용기준을 적용한다. 그래서 0.01 mg/

kg 이하의 정량한계 수준을 만족하기 위하여 GC-MS/MS를 이용하여 고감도 분석을 진행하였다. 오븐온도는 80°C부터 300°C까지 기울기 용리방식으로 분석하였다. 대상성분의 이온화법으로는 EI법의 positive-ion mode를 사용하였고 Table 1에 나타낸 분석조건을 바탕으로 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 그리고 product ion scan모드로 product ion을 선정하고 검출강도가 가장 높은 collision energy를 선택하였다. 가장 감도가 좋은 product ion을 정량이온으로, 그 다음으로 감도가 좋은 product ion을 정성이온으로 설정하였다. 각 성분의 머무름 시간은 디메티핀 17.1분, 디클로르보스 10.3분, 오메토에이트 15.2분, (*E*)-클로르펜빈포스 20.1분, (*Z*)-클로르펜빈포스 20.3분, 아진포스메틸 24.5분으로 확인되었다. 클로르펜빈포스는 잔류물의 정의에 따라 (*E*)-클로르펜빈포스와 (*Z*)-클로르펜빈포스의 합으로 계산하였다.

추출 정제과정 최적화

디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스, 아진포스메틸의 물리화학적 특성을 참고하여 추출 및 정제조건을 검토하였다. 수분을 함유하고 있는 농산물 검체는 표면이 수분으로 수화되어 있어 침투성이 낮은 비극성 유기용매보다 수용성 유기용매를 이용하는 것이 더 우수한 추출 효율을 보인다. 대표적인 수용성 유기용매인 아세톤, 메탄올 및 아세토니트릴을 검토한 결과 아세톤에서는 오메토에이트의 평균 회수율이 70.1%로 낮았고 메탄올의 경우 디클로르보스, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸의 평균 회수율이 70% 이하로 저조하였다. 아세트산을 함유한 아세토니트릴의 경우 모든 대상물질의 평균 회수율이 우수하였으며, 특히 1% 아세트산을 함유한 아세토니트릴에서 평균 회수율이 99.2-109.0%로 높게 나타났다 (Table 3). 그리고 QuEChERS법 중 사용하는 시약이 서로 다른 original[11], AOAC 2007.01[12], CEN 15662법[13]의 추출효율을 비교하였다. 그 결과 추출 후 디메티핀의 평균 회수율은 81.8-107.6%, 디클로르보스의 평균 회수율은 86.5-98.3%, 오메토에이트의 평균 회수율은 101.4-107.7%, 클로르펜빈포스의 평균 회수율은 97.1-108.4%, 아진포스메틸의 평균 회수율은 89.1-110.0%이었다. 하지만 original법과 CEN 15662법을 이용하여 추출한 뒤 정제를 진행하였을 때 디클로르보스, 오메토에이트 그리고 아진포스메틸의 평균 회수율이 크게 감소하였다. 추출 방법으로 AOAC 2007.01법을 이용한 다음 정제를 진행하였을 때 디메티핀의 평균 회수율은 99.9%, 디클로르보스의 평균 회수율은 90.2%, 오메토에이트의 평균 회수율은 111.1%, 클로르펜빈포스의 평균 회수율은 115.7%, 아진포스메틸의 평균 회수율은 98.7%이었다(Table 4). 1% 아세트산 함유 아세토니트릴을 이용하여 QuEChERS AOAC 2007.01법으로 추출과정 확립 후 d-SPE를 이용하여 정제효율을 비교하였다. 정제에 사용되는 황산마그네슘, C_{18} 및 PSA의 양이 서로 다른 d-SPE 1(황산마그네슘 75 mg/mL, C_{18} 50 mg/mL, PSA 50 mg/mL), d-SPE

Table 3. Comparisons of extraction efficiency depending on solvent

	Compound (Recovery±RSD[a], %)				
	Dimethipin	Dichlorvos	Omethoate	Chlorfenvinphos	Azinphos-methyl
Acetone	95.8±2.1	89.7±6.3	70.1±11.0	110.6±0.5	96.4±3.7
Methanol	78.4±0.8	62.6±5.8	89.4±11.2	48.0±22.5	51.3±1.0
Acetonitrile (1% acetic acid)	99.4±2.5	99.5±4.5	107.0±0.7	109.0±7.1	99.2±0.8
Acetonitrile (3% acetic acid)	95.5±1.3	94.2±4.0	92.7±2.4	97.3±5.3	102.7±0.1
Acetonitrile (5% acetic acid)	98.3±2.5	92.1±2.0	90.5±0.2	94.3±0.8	99.3±1.2

[a]Recovery±RSD: Mean values of 2 times replications with standard deviation.

Table 4. Comparisons of recovery depending on QuEChERS method

Extraction method	Compound (Recovery±RSD[a], %)				
	Dimethipin	Dichlorvos	Omethoate	Chlorfenvinphos	Azinphos-methyl
Original	119.8±0.6	11.8±8.5	7.1±2.8	129.9±8.2	41.1±2.1
AOAC 2007.01	99.9±18.0	90.2±20.4	111.1±20.9	115.7±17.1	98.7±19.5
CEN 15662	116.6±8.9	8.7±12.5	2.5±17.1	125.2±12.4	25.7±28.1

[a]Recovery±RSD: Mean values of 2 times replications with standard deviation.

Table 5. Comparisons of purification efficiency for dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl

	Compound (Recovery±RSD[a)], %)				
	Dimethipin	Dichlorvos	Omethoate	Chlorfenvinphos	Azinphos-methyl
d-SPE 1	90.8±9.9	98.2±1.7	93.8±0.7	101.1±3.1	106.7±1.7
d-SPE 2	94.9±7.6	102.7±3.9	96.7±4.2	108.2±1.5	108.6±0.8
d-SPE 3	104.2±1.1	97.6±4.9	97.9±2.2	102.3±0.1	106.4±6.0
d-SPE 4	101.9±15.4	95.3±1.0	98.7±1.3	97.4±1.4	102.3±0.6

[a)]Recovery±RSD: Mean values of 2 times replications with standard deviation.

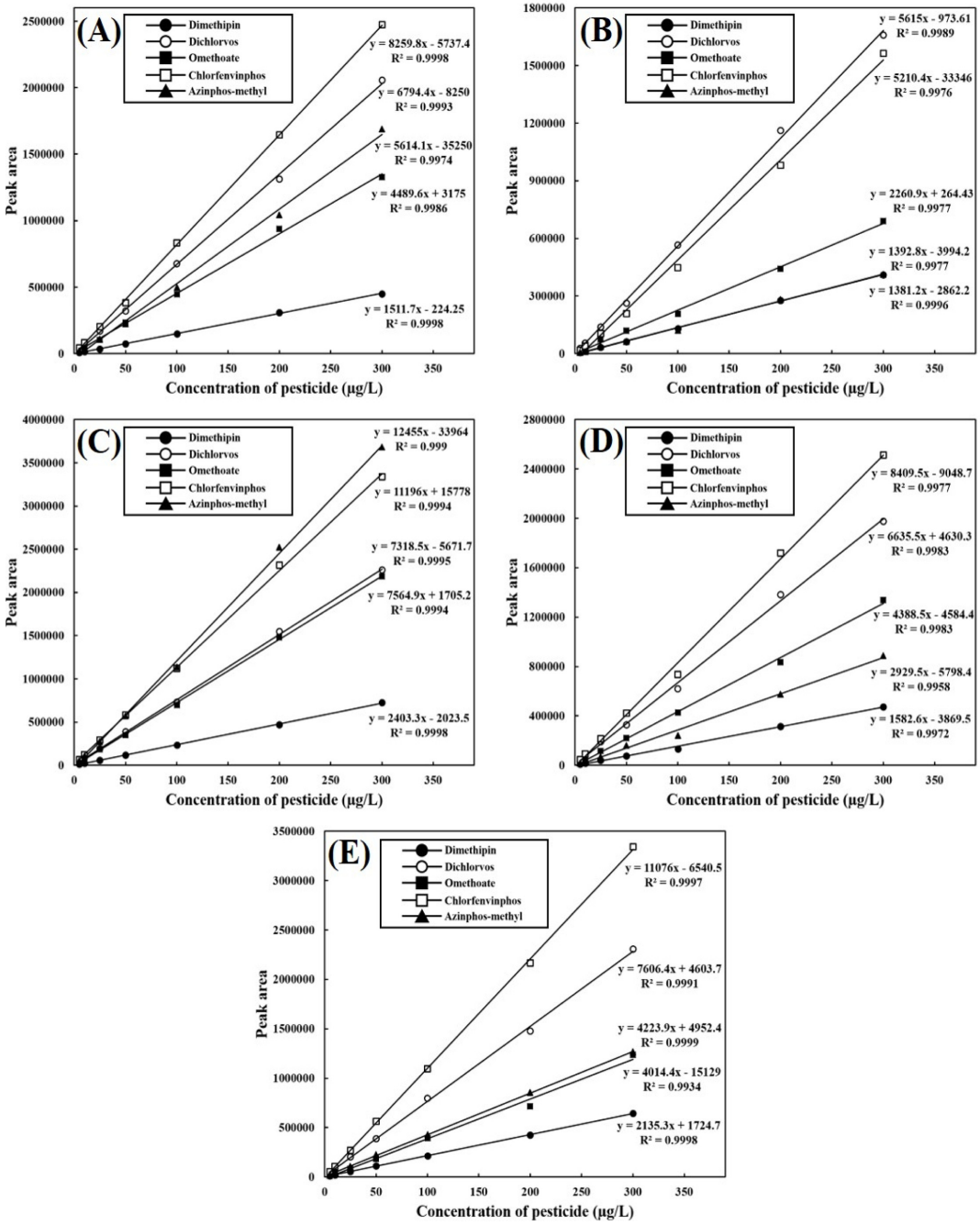

Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

2(황산마그네슘 150 mg/mL, C_{18} 25 mg/mL, PSA 50 mg/mL), d-SPE 3(황산마그네슘 150 mg/mL, C_{18} 50 mg/mL, PSA 25 mg/mL) 및 d-SPE 4(황산마그네슘 150 mg/mL, C_{18} 50 mg/mL, PSA 50 mg/mL) 4가지 조건을 검토하였다. 정제 후 회수율은 90.8-108.6%로 나타났으며 전체적으로 회수율이 우수한 d-SPE 4 조건을 선정하였다(Table 5).

시험법 검증

디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 선택성을 확인하였다. 무처리 시료 중 디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 동일한 간섭물질은 검출되지 않아 대상물질들을 분석하는 것에 있어 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 확보한 것을 확인할 수 있었다. 표준원액을 무처리 추출물로 희석하여 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 μg/L 농도의 matrix-matched 표준용액을 조제한 뒤 GC-MS/MS에 1 μL를 주입하여 분석한 결과 모든 농산물 시료 표준용액에서 결정계수(R^2)가 0.99 이상으로 높은 직선성을 확인하였다(Fig. 3). 본 연구에서 확립한 분석조건에서의 디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸에 대한 검출한계와 정량한계는 기기의 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비를 3 이상과 10 이상으로 결정하였다. 아래의 계산식에 따라 검출한계는 0.003 mg/kg, 정량한계는 0.01 mg/kg으로 산출되었다.

검출한계(mg/kg)
= 최소검출농도(μg/mL,i S/N ≥ 3)×희석배수

$$= 0.0015(\text{mg/L}) \times \left(\frac{10(\text{mL})}{5(\text{g})}\right) = 0.003 \text{ mg/kg}$$

정량한계(mg/kg)
= 최소검출농도(μg/mL, S/N ≥ 10)×희석배수

$$= 0.005(\text{mg/L}) \times \left(\frac{10(\text{mL})}{5(\text{g})}\right) = 0.01 \text{ mg/kg}$$

허용물질목록관리제도(PLS)에 따라 잔류허용기준이 설정되지 않은 농약의 경우 최저기준을 적용하여 0.01 mg/kg이하의 정량한계 수준을 만족해야 한다. 본 시험법의 정량한계는 0.01 mg/kg으로 잔류허용기준이 정해지지 않은 농산물에 적용할 수 있는 것으로 확인되었다.

시험법의 정확성 및 정밀성을 확인하기 위하여 5종의 농산물 시료에 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배 수준인 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리하여 회수율 실험을 5반복 수행하였다. 그 결과 각 농도에서 디메티핀의 평균 회수율은 90.8-114.1%, 디클로르보스는 96.0-113.5%, 오메토에이트는 79.8-119.3%, 클로르펜빈포스는 97.3-107.6% 그리고 아진포스메틸은 74.2-117.7%이었다. 상대표준편차는 모두 14.6% 이하로 나타나 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인에 적합함을 확인하였다[16,17]. 농산물 5종의 무처리군 및 처리군의 크로마토그램을 비교한 결과 디메티핀, 디클로르보스, 오메토에이트, 클로르펜빈포스 및 아진포스메틸의 머무름 시간에 간섭물이 존재하지 않는 것으로 나타났다.

실험실내 및 실험실간 시험법 검증

시험법의 정밀도 및 정확도를 확인하기 위해 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg을 처리하여 회수율 실험을 3회 반복 분석하여 일간(3일간) 정밀도와 정확도를 측정하였다. 고추 시료에 첨가한 결과 각 농도에서 디메티핀의 평균 회수율은 99.3-105.6%, 디클로르보스는 99.3-105.1%, 오메토에이트는 89.4-97.6%, 클로르펜빈포스는 100.8-101.7% 그리고 아진포스메틸은 89.8-98.9%이었다. 일간 정밀성의 상대표준편차는 모두 14.0% 이하로 나타났다(Table 6). 그리고 외부 실험기관인 전남대학교와 실험실간 검증을 수행하여 시험법의 유효성을 확인하였다. 동일한 방법으로 분석하고 실험실간 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 대상물질들의 농도별 평균 회수율이 디메티핀은 81.0-117.1%, 디클로르보스는 75.4-113.5%, 오메토에이트는 74.7-119.3%, 클로르펜빈포스는 92.8-119.9%, 아진포스메틸은 74.2-117.7%이었으며 상대표준편차는 모두 14.6%미만으로 확인되었다(Table 7). 실험실간 변이계수(CV, %)는 처리농도 >1 μg/kg, ≤0.01 mg/kg의 46%, 처리농도 >0.01 mg/kg,

Table 6. Inter-day (over a period of 3 days) accuracy and precision of analytical method for dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl

Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD(%)				
	Dimethipin	Dichlorvos	Omethoate	Chlorfenvinphos	Azinphos-methyl
0.01	99.3±5.2	105.1±6.5	95.5±11.4	101.3±5.8	98.9±6.2
0.1	104.4±3.8	100.3±2.5	97.6±6.7	101.7±5.5	91.5±7.7
0.5	105.6±1.0	99.3±4.1	89.4±14.0	100.8±2.5	89.8±12.6

Table 7. Inter-laboratory validation results of analytical method for dimethipin, dichlorvos, omethoate, chlorfenvinphos and azinphos-methyl

Pesticide	Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[a](%)		Mean[b]	CV[c]
			Lab. A[d]	Lab. B[e]		
Dimethipin	Hulled rice	0.01	102.7±1.6	109.3±2.3	105.1	3.7
		0.1	97.7±1.6	105.4±0.3	100.6	4.1
		0.5	94.6±3.2	104.8±3.2	98.4	6.1
	Potato	0.01	103.7±3.9	117.1±5.1	108.7	7.5
		0.1	99.3±1.7	94.9±4.6	97.6	3.5
		0.5	104.4±1.2	87.4±6.6	98.0	9.5
	Soybean	0.01	114.1±8.8	81.0±3.1	101.7	18.5
		0.1	102.0±3.7	91.8±6.1	98.2	6.8
		0.5	96.6±7.9	90.9±7.7	94.5	7.9
	Mandarin	0.01	107.8±2.7	99.1±1.3	104.5	4.8
		0.1	103.1±2.3	91.2±2.6	98.6	6.6
		0.5	105.4±0.8	86.9±2.9	98.5	9.9
	Green pepper	0.01	90.8±3.6	115.4±3.2	100.0	13.1
		0.1	102.6±2.3	96.4±1.7	100.2	3.8
		0.5	106.1±1.5	84.5±1.8	98.0	11.5
Dichlorvos	Hulled rice	0.01	96.0±4.9	106.3±2.5	99.8	6.6
		0.1	104.6±4.5	97.9±6.2	102.1	5.8
		0.5	99.8±6.9	103.4±6.5	101.1	6.5
	Potato	0.01	105.5±1.2	104.9±12.0	105.3	6.5
		0.1	96.6±2.7	86.0±3.2	92.6	6.5
		0.5	102.9±2.4	75.4±16.1	92.6	17.0
	Soybean	0.01	113.5±8.2	111.5±3.6	112.8	6.6
		0.1	108.7±2.5	88.9±8.3	101.3	11.0
		0.5	109.0±7.7	83.6±12.4	99.5	15.7
	Mandarin	0.01	97.9±4.6	83.9±5.7	92.7	9.1
		0.1	102.9±4.0	94.5±7.5	99.8	6.6
		0.5	101.7±3.4	91.9±11.9	98.0	8.3
	Green pepper	0.01	100.0±4.1	86.1±14.4	94.8	10.8
		0.1	100.4±5.6	99.6±2.9	100.1	4.6
		0.5	100.1±6.1	85.0±7.0	94.4	10.1
Omethoate	Hulled rice	0.01	119.3±4.3	94.5±13.0	110.0	13.5
		0.1	109.5±5.3	94.4±3.3	103.8	8.7
		0.5	86.8±7.0	104.4±9.7	93.4	12.4
	Potato	0.01	106.8±7.5	116.1±6.6	110.3	7.9
		0.1	87.8±6.1	84.5±3.2	86.6	5.3
		0.5	103.2±6.9	74.7±11.4	92.5	17.7
	Soybean	0.01	113.5±11.7	97.3±6.0	107.4	12.5
		0.1	99.1±3.1	102.7±4.5	100.4	3.8
		0.5	83.1±6.9	103.0±4.8	90.6	12.7
	Mandarin	0.01	92.3±8.9	84.2±8.6	89.2	9.4
		0.1	79.8±5.0	77.4±6.1	78.9	5.2
		0.5	86.5±14.6	78.1±4.1	83.4	12.7
	Green pepper	0.01	115.5±6.8	100.2±14.1	109.8	11.3
		0.1	97.4±8.5	96.7±5.4	97.1	7.1
		0.5	86.1±13.8	78.1±11.1	83.1	13.2

Table 7. Continued

Pesticide	Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery± RSD[a] (%)		Mean[b]	CV[c]
			Lab. A[d]	Lab. B[e]		
Chlorfenvinphos	Hulled rice	0.01	97.5±5.1	105.5±2.6	100.5	5.7
		0.1	103.7±2.3	113.5±2.7	107.3	5.2
		0.5	97.3±2.9	106.1±3.8	100.6	5.1
	Potato	0.01	105.2±3.7	119.9±4.2	110.7	7.8
		0.1	101.4±3.8	103.4±3.0	102.2	3.4
		0.5	107.6±9.1	98.4±3.3	104.1	8.6
	Soybean	0.01	100.5±11.3	110.9±3.3	104.4	9.9
		0.1	103.2±7.8	107.6±0.2	104.8	6.2
		0.5	106.5±6.4	103.0±0.6	105.2	5.2
	Mandarin	0.01	102.6±1.6	110.2±4.2	105.4	4.6
		0.1	103.6±3.9	107.3±0.5	105.0	3.4
		0.5	99.6±1.9	99.6±0.5	99.6	1.5
	Green pepper	0.01	105.4±9.4	119.3±2.2	110.6	9.4
		0.1	106.0±5.2	105.1±1.3	105.6	4.0
		0.5	102.3±5.9	92.8±0.4	98.7	6.8
Azinphos-methyl	Hulled rice	0.01	111.8±2.1	105.9±5.9	109.6	4.4
		0.1	96.0±0.8	93.1±0.5	94.9	1.7
		0.5	80.7±3.0	106.0±7.0	90.2	15.3
	Potato	0.01	89.9±9.0	101.1±10.3	94.1	10.7
		0.1	105.9±6.8	81.3±13.2	96.7	15.5
		0.5	101.4±13.1	76.0±8.7	91.9	18.4
	Soybean	0.01	117.7±6.4	117.6±2.5	117.7	5.0
		0.1	79.0±4.0	84.1±7.6	80.9	6.1
		0.5	74.2±9.0	95.3±7.9	82.1	15.5
	Mandarin	0.01	100.8±5.3	111.3±9.8	104.7	8.5
		0.1	87.6±8.0	79.4±7.6	84.5	8.9
		0.5	98.5±12.5	74.4±7.1	89.5	17.7
	Green pepper	0.01	110.9±12.9	103.8±6.5	108.2	11.1
		0.1	103.6±4.7	99.3±0.5	102.0	4.3
		0.5	109.9±6.9	109.5±4.0	109.7	5.6

[a]Recovery±RSD: Mean values of replications with standard deviation.
[b]Mean: Recovery average of inter-laboratory.
[c]CV: Coefficient of variation of inter-laboratory.
[d]Lab. A: Ministry of Food and Drug safety, Pesticide & Veterinary Drug Residue division (n=5).
[e]Lab. B: Chonnam National University, Natural Products Chemistry Laboratory (n=3).

≤0.1 mg/kg의 34%, 처리농도 >0.1 mg/kg, ≤1 mg/kg의 25%보다 낮아 Codex 가이드라인 및 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인에 적합한 것으로 확인되었다.

국문요약

PLS 제도가 모든 농산물을 대상으로 확대됨에 따라 잔류허용기준이 설정되지 않거나 허가되지 않은 농약에 대해서 일률적으로 0.01 mg/kg의 잔류허용기준을 적용하기 때문에 농약 시험법의 정량한계 수준은 0.01 mg/kg 이하를 만족시켜야 한다. 현재 식품공전에 존재하는 7.1.4.12 디메티핀 시험법은 정량한계가 0.05 mg/kg이며 7.1.3.2 디클로르보스 등 19종 시험법은 정량한계가 존재하지 않는다. 그리고 두 시험법 모두 전처리 과정 중 벤젠을 사용하여 인체 및 환경에 유해할 뿐 아니라 충전칼럼을 사용하여 노후화되고 복잡하다는 단점이 있다. 본 연구는 전처리 과정에 벤젠을 사용하는 성분 중 대체 시험법이 존재하지 않는 5종을 선별하여 다른 용매로 대체하고 QuEChERS 법을 적용하여 0.01 mg/kg의 정량한계를 만족하는 동시시

험법을 마련하고자 하였다. 대상성분들의 물리·화학적 특성을 고려하여 QuEChERS법을 이용한 최적 추출·정제법을 선정하여 LC-MS/MS를 이용한 분석법을 확립하고자 하였다. 수용성 유기용매인 1% 아세트산 함유 아세토니트릴을 추출용매로 사용하고 무수황산마그네슘 및 아세트산나트륨을 첨가하여 추출법을 최적화하고 d-SPE 흡착제를 통해 추출물 중 간섭물질을 효과적으로 제거하여 최적 정제조건을 확립하였다. 결정계수(R^2)는 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었고, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.003, 0.01 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 정량한계, 정량한계 10배 및 정량한계 50배 수준으로 처리한 다음 회수율 실험을 한 결과 평균 회수율이 디메티핀은 90.8-114.1%, 디클로르보스는 96.0-113.5%, 오메토에이트는 79.8-119.3%, 클로르펜빈포스는 97.3-107.6% 그리고 아진포스메틸은 74.2-117.7%이었으며 상대표준편차는 모두 14.6% 이하로 확인되었다. 또한 실험실간 검증 결과 두 실험실간 회수율 평균값이 디메티핀은 94.5-108.7%, 디클로르보스는 92.6-112.8%, 오메토에이트는 74.7-116.1%, 클로르펜빈포스는 98.7-110.7% 그리고 아진포스메틸은 80.9-117.7%이었으며 상대표준편차는 모두 18.4% 이하로 나타났다. 본 연구는 국제식품규격위원회 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL40)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 디메티핀 등 5종의 안전관리를 위한 공정시험법으로 활용 가능할 것이다.

Acknowledgments

This study was supported by a grant(19161수안기582) of ministry of food and drug safety in 2019, Republic of korea.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Eun-Ji Park https://orcid.org/0000-0002-5812-4888
Nam Young Kim https://orcid.org/0000-0001-7608-4122
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. Metzger, J.D., Keng, J., Effects of dimethipin, a defoliant and desiccant, on stomatal behavior and protein synthesis. *J. Plant Growth Regul.*, **3**, 141-156 (1984).
2. Metzger, J.D., Keng, J., Cellular basis for dimethipin-induced loss of leaf turgor and desiccation. *J. Plant Growth Regul.*, **6**, 33-40 (1987).
3. Macdonald, R.S., Surgeoner, G.A., Solomon, K.R., Harris, C.R., Effect of four spray regimes on the development of permethrin and dichlorvos resistance, in the laboratory, by the house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, **76**, 417-422 (1983).
4. Han, J., Kim, G.H., Susceptibilities of german cockroach, *Blattella* germanica to insecticides according to application methods. *Korean J. Appl. Entomol.*, **43**, 241-247 (2004).
5. Beynon, K.I., Edwards, M.J., Elgar, K., Wright, A.N., Analysis of crops and soils for residues of chlorfenvinphos insecticide and its breakdown products. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 302-307 (1968).
6. Suett, D.L., Influence of formulation on chlorfenvinphos uptake and cabbage root fly control on radish. *Ann. Appl. Biol.*, **92**, 173-184 (1979).
7. Lee, H., Han, J., Yoon, E., Kim, H., Hwang, I.G., Choi, D.M., Lee, K.B., Won, K.P., Song, I.S., Park, S.E., Shin, D.C., Cumulative risk assessment of organophosphorus pesticides in the diet. *J. Food Hyg. Saf.*, **16**, 21-26 (2001).
8. Ministry of Food Drug Safety, (2021, June 18). Pesticides MRLs in agricultural commodities. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/02_01.jsp
9. Huff, J., Benzene-induced cancers: abridged history and occupational health impact. *Int. J. Occup. Environ. Health*, **13**, 213-221 (2007).
10. Edokpolo, B., Yu, Q.J., Connell, D., Health risk assessment of ambient air concentrations of benzene, toluene and xylen (BTX) in service station environments. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **11**, 6354-6374 (2014).
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. Lehotay, S.J., Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **90**, 485-520 (2007).
13. Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboonc, N., Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 2548-2560 (2010).
14. CODEX Alimentarius Commission, 2003. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993. CAC, Rome, Italy.
15. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, June 18). Guide-

lines on standard procedures for preparing analysis method. Retrieved from http://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=8215
16. Stan, H.J., Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas-chromatography with mass spectrometric detection state-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. *J. Chromatogr. A*, **892**, 347-377 (2000).
17. Cengiz, M.F., Certel, M., Göçmen, H., Residue contents of DDVP (Dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chem.*, **98**, 127-135 (2006).
18. Suett, D.L., Persistence and degradation of chlorfenvinphos, diazinon, fonofos and phorate in soils and their uptake by carrots. *Pest. Sci.*, **2**, 105-112 (1971).
19. Athanasopoulos, P.E., Pappas, C., Effects of fruit acidity and storage conditions on the rate of degradation of azinphos methyl on apples and lemons. *Food Chem.*, **69**, 69-72 (2000).