pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 3, pp. 186~193 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.3.186

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

HPLC-UVD를 이용한 농산물 중 살균제 Oxathiapiprolin의 잔류분석법 확립

장진 · 김희정[1] · 도정아 · 고아영 · 이은향 · 주윤지 · 김은주[2] · 장문익* · 이규식

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의료기기심사부 구강소화기기과
[2]경인지방식품의약품안전청 시험분석센터 유해물질분석과

Establishment of an Analytical Method for Determination of Fungicide Oxathiapiprolin in Agricultural Commodities using HPLC-UV Detector

Jin Jang, Heejung Kim[1], Jung Ah Do, Ah-Young Ko, Eun Hyang Lee,
Yunji Ju, Eunju Kim[2], 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 28159, Korea
[1]Dental and Gastroenterology Devices Division, Department of Medical Device Evaluation, National Institute of Food Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
[2]Hazardous Substances Analysis Team, Center for Food and Drug Analysis, Gyeongin regional Korea Food and Drug Administration, Incheon 22133, Korea
(Received March 8, 2016/Revised April 6, 2016/Accepted May 16, 2016)

ABSTRACT - An analytical method was developed for the determination of oxathiapiprolin in agricultural commodities. Oxathiapiprolin is a new oomycide (fungicide of piperidinyl thiazole isoxazoline class) which controls downy mildew in cucurbits caused by *Pseudoperonospora cubensis* (oomycete plant pathogen). Agricultural commodities were extracted with acetonitrile and partitioned with dichloromethane to remove the interference, adjusting pH between 9 and 10 by 1 N sodium hydroxide. After purification by silica SPE cartridge to clean up the interference of organic compounds, they were finally quantified by HPLC-UVD (high performance liquid chromatograph ultraviolet detector) using a wavelength at 260 nm and confirmed by LC-MS (liquid chromatograph mass spectrometer) in electro-spray ionization positive ion mode. The standard calibration curve was linear with coefficients of determination (r^2) 1.00 over the calibration ranges (0.025-2.5 mg/L). Recoveries were ranged between 86.7 to 112.7%, with relative standard deviations less than 10% at three concentration levels (LOQ, 10LOQ, and 50LOQ) performing five replicates. The overall results were determined and estimated according to the CODEX guidelines (CAC/GL40). The proposed method for determination of oxathiapiprolin residues in agricultural commodities can be used as an official method.

Key words : HPLC-UVD, maximum residue limits, fungicide, oxathiapiprolin, analytical method

Oxathiapiprolin은 오이, 호박, 시금치, 멜론 등의 채소 작물에서 노균병(downy mildew) 방제에 사용되는 새로운 piperidinyl thiazole isoxazoline 계열 난균강 살균제(oomycide, fungicide)로 2012년 Dupont사에서 개발하였다[1]. 난균강(oomycete) 병원균 *Pseudoperonospora cubensis*는 포자낭의 운동성있는 유주자를 이용해 공기 중으로 전달·번식되어 노균병을 유발하는데 oxathiapiprolin은 식물 잎과 잎맥을 통해 침투·이행하여 병원균 *P. cubensis*의 포자형성과 효모성장을 저해하여 방제 효과를 나타낸다[2,3].

Oxathiapiprolin은 JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues)에서 2016년 평가대상 신규약제 13종 중 하나로 분류되어 국제식품규격위원회(CODEX)를 통해 포도를 포함한 농산물 20종 등에 국제 잔류허용기준(MRL, Maximum Residue Limit)이 설정될 예정이다[4]. 2016년 현

*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, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4204, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: 1004@korea.kr

재 국외기준은 일본(감자 외 5종, 0.05-0.5 ppm), 미국(상추 외 11종, 0.01-15 ppm), 호주(양파 외 7종, 0.01-15 ppm) 등에서 이미 설정된 상태이다[5-8]. 국내에서는 채소류 6종(고추, 피망, 양파, 오이, 토마토, 포도)에 oxathiapiprolin의 농약 사용등록이 신청되어 잔류허용기준이 신설될 예정으로 기준의 적합유무를 판단하기 위한 검사법 마련이 요구되었다.

적부판정을 위한 검사는 식품 중 잔류농약의 분석법을 통해 이루어지며 분석대상은 잔류물의 정의에 의해 결정된다. 노출가능성이 높거나 독성이 강하여 식품섭취 과정에서 위해하게 작용할 수 있는 대사산물은 잔류물의 정의에 포함시켜 모화합물과 함께 관리하는데 oxathiapiprolin의 잔류물의 정의는 위해성이 높은 대사산물이 없어 일본, 미국, 호주와 동일하게 모화합물로 규정하였다.

이때 분석법은 식품공전에 수재되어 표준화된 공정분석법으로 사용될 예정이기 때문에 잔류허용기준(MRL)의 1/2 이하를 만족하는 수준으로 정량한계 설정이 가능하다면 LC-MS/MS (liquid chromatograph tandem mass spectrometer)와 같은 고가의 장비보다 HPLC-UVD (high performance liquid chromatograph ultraviolet detector)와 같은 범용적인 기기 사용을 권장한다.

그간 oxathiapiprolin의 잔류분석은 Wu 등과 Ju 등에 의한 포도, 수박, 오이, 토마도, 감자, 밀 등 농산물 시료와 수질, 토양 등 환경 시료 중 분석법이 보고되었으며 모두 대사산물(IN-E8S72, IN-WR791)을 포함한 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)법 기반의 동시분석법으로 formic acid 수용액과 acetonitrile을 이용하여 추출하였고 dispersive-SPE (d-SPE)법으로 최소한의 정제 후 LC-MS/MS로 분석하였다[9,10]. 이때 전처리된 시료는 분석대상에 최적화된 정제법보다 간섭물질의 영향이 커 농산물 안전성평가에 수시로 활용되는 일상적인 검사법 뿐만 아니라 질량분석기를 제외한 보편적인 분석기기에 적용이 까다로울 것으로 판단되었다.

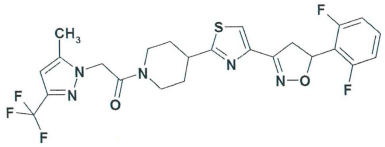
따라서 본 연구에서는 카트리지 정제로 간섭물질을 최소화하여 다양한 작물에 적용할 수 있는 보편화된 HPLC-UVD를 이용한 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)의 잔류농약 분석 기준에 준용하는 분석법을 개발하여 국내외 농산물 안전성 평가시 적부판정용 공정시험법으로 활용하고자 하였다. 개발된 분석법은 국내 등록예정작물인 채소류의 대표작물 고추와 향후 농산물 추가 등록을 고려해 식품공전법 상 지정된 농산물군 대표작물 4종(감귤, 감자, 대두, 현미)을 포함한 농산물 5종에 적용하였다. 본 연구에서 개발된 분석법은 분석법의 직선성, 선택성, 정밀성, 정확성 및 재현성 등을 검증하였으며, 경인지방식약청과의 실험실간 검증(inter-lab)을 통해 분석법의 신뢰성 및 유효성을 확보하였다[11].

Materials and Methods

시약 및 재료

Oxathiapiprolin (99.6%) 표준품은 Dupont (Wilmington, DE, USA)사에서 제공받아 사용하였고(Table 1), acetonitrile, ethyl acetate, dichloromethane, *n*-hexane 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였

Table 1. Physicochemical characteristics of oxathiapiprolin

Property	Contents
IUPAC name	1-(4-{4-((5*RS*)-5-(2,6-difluorophenyl)-4,5-dihydro-1,2-oxazol-3-yl)-1,3-thiazol-2-yl}-1-piperidyl)-2-(5-methyl-3-(trifuluoromethyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)ethanone
CAS No.	1003318-67-9
Classification	Fungicide (oomycide)
Molecular formula	$C_{24}H_{22}F_5N_5O_2S$
Molecular weight	539.53
Melting point	146.4°C
Boiling point	Decomposes before boiling
Degradation point	289.5°C
Log P_{ow}	3.66
Vapor pressure	$1.141 \cdot 10^{-3}$ mPa (25°C)
Solubility	In water 0.1749 mg/L (20°C), In acetone 162800, *o*-xylene 5800, dichloromethane 352900, *n*-hexane 10 (all in mg/L).
Chemical structure	

다. Sodium chloride (NaCl)은 Wako (Osaka, Japan)에서 anhydrous sodium sulfate은 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였고, sodium hydroxide (NaOH)는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)의 1 N NaOH로 제조된 용매를 구입하여 사용하였다. 크로마토그래피 정제를 위한 silica 및 Florisil SPE 카트리지(6 cc, 1 g)는 Waters (Milford, MA, USA) 제품을 이용하였다. 검체는 국내 사용기준 설정을 위한 채소류의 대표작물 고추와 그 외의 농산물군 대표작물 감귤(과일류), 감자(서류), 대두(콩류), 현미(곡류)는 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 −50°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

Oxathiapiprolin 표준품 10.04 mg을 10 mL의 acetonitrile에 용해하여 1,000 μg/mL의 수준의 표준원액을 조제하였고, 이를 acetonitrile/distilled water (50/50, v/v)으로 희석하여 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 및 2.5 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 액액분배

과일류, 채소류, 서류는 약 1 kg을 잘게 갈아 혼합한 균질 시료 20 g을 정밀히 달아(TB-4002, Denver instrument, Denver, CO, USA) 250 mL 원심분리관에 넣고 acetonitrile 100 mL을 가해 진탕기(MMV-1000W, Eyela, Tokyo, Japan)에서 10분간 진탕하였다. 콩류 및 곡류 등 건조 검체는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 20 g을 취하여 증류수 40 mL를 가하여 30분간 방치 후 acetonitrile 100 mL을 가하여 진탕기에서 10분간 진탕하였다. Acetonitrile 추출액은 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기로 흡인여과(MZ 2C, Vaccubrand, Wertheim, Germany)하여 acetonitrile 40 mL로 잔사 및 용기를 씻어내려 합쳤다. 합친 여액을 40°C 이하의 수욕상에서 감압(Hei-VAP Advantage ML/G3, Heidolph, Schwabach, Germany)하여 용매를 모두 날려버린 후 증류수 100 mL를 가하고 1N NaOH를 천천히 가하여 pH 9-10로 조절하였다. 이를 500 mL 용량의 분액여두에 옮겨 포화식염수 10 mL와 dichloromethane 50 mL를 차례로 가한 후 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 dichloromethane 층을 anhydrous sodium sulfate에 통과시켜 감압농축플라스크에 받고, 남아있는 수용액 층에 dichloromethane 50 mL를 추가로 가하여 위의 과정을 반복하였다. 이를 40°C 이하의 수욕 상에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 후, 잔류물에 dichloromethane을 가하여 최종 부피가 16 mL가 되게 하였다. 다만, 지방성 검체인 대두와 현미의 경우 잔류물에 acetonitrile 포화 *n*-hexane 30 mL를 건고물에 가하여 녹인 후 250 mL 분량의 분액 여두에 옮기고 *n*-hexane 포화 acetonitrile 30 mL으로 2회 분배 추출하였다. 합친 acetonitrile 층을 40°C에서 감압 농축한 후 잔류물에 dichloromethane을 가하여 최종부피 16 mL가 되게 하였다.

카트리지 정제

Silica 카트리지에 dichloromethane 5 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버린다. 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출액 중 4 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출시켜 버리고 고정상 상단이 노출되기 전에 ethyl acetate/dichloromethane (15/85, v/v) 8 mL를 유출시켜 씻어 버린 뒤 ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v) 10 mL를 용출시켜 받은 시험액을 감압농축플라스크에 취하였다. 이를 40°C이하 수욕상에서 감압하여 용매를 모두 날려버리고 플라스크를 상온으로 냉각한 후, 잔류물에 acetonitrile/distilled water (50/50, v/v)을 가하여 최종부피 2 mL가 되게 하여 시험용액으로 한 뒤 시린지 필터(nylon, 0.22 μm)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

Table 2. Analytical conditions for the determination of oxathiapiprolin residues

Instrument	HPLC-UVD (Waters Acquity H series, Milford, MA, USA)
Column	Xselect HSS C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
Mobile phase	Acetonitrile/distilled water (65/35, v/v)
Flow rate	1 mL/min
Column temperature	40°C
Detection	Absorption (260 nm)
Injection volume	20 μL

Table 3. Confirmative conditions for identifying oxathiapiprolin

Instrument	LC-MS (Waters TQ-S series, Milford, MA, USA)		
Column	XBridge C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 μm)		
Ionization mode	ESI positive-ion mode		
Flow rate	0.2 mL/min		
Mobile phase	A: Acetonitrile B: Distilled water		
Gradient condition	Time (min)	A(%)	B(%)
	0	10	90
	3	10	90
	10	95	5
	13	10	90
	15	10	90
Oven temperature	40°C		
Cone voltage	74 V		
Injection volume	5 μL		

기기분석

농산물 중 oxathiapiprolin의 잔류분석을 위해 HPLC-UVD (Waters Acquity H series) 를 사용하여 흡광파장 260 nm로 검출하였고, 기기분석 조건은 Table 2에 나타내었다. 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC-MS (Waters TQ-S series)를 이용하여 재확인하였으며 그 조건은 Table 3과 같다.

분석법의 검증

본 연구에서는 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인 (CAC/GL 40)의 잔류농약 분석 기준에 따라 분석법의 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 회수율 시험을 통한 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 재현성(repeatability)을 평가하였다. 직선성 확인을 위하여 oxathiapiprolin 표준 용액 0.025-2.5 μg/mL을 이용하여 농도 대비 피크 면적에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of determination, r^2)를 구하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 각각 3, 10 이상으로 하였다. 분석법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 무처리 농산물 검체에 oxathiapiprolin 표준용액을 첨가하여 회수율실험을 진행하였다. 회수율 실험 시 처리농도는 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도로 수행하였으며 각 농산물 검체의 처리구는 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)를 계산하여 분석법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한, 경인지방식품의약품안전청과 실험실간 검증(inter-lab)을 실시하여 분석법의 유효성을 확인하였다.

Results and Discussion

기기선정 및 분석조건 확립

Oxathiapiprolin은 분자 구조 내 할로겐 원소 fluorine (F)이 다수 포함되어 있긴 하지만 분해온도(289.5°C)와 증기압(1.141 · 10^{-3} mPa)에 따라 비휘발성 물질로 분류(Table 1)되기 때문에 GC-ECD (gas chromatograph electron capture detector) 분석이 어려울 것으로 예상되었다. 따라서 분자 구조 내 산소(O), 질소(N), 황(S) 원자의 비공유 전자쌍과 이중결합의 전자전이에 의해 특정 파장대를 흡수하는 특성을 이용하여 HPLC-UVD로 분석하였다. Oxathiapiprolin 분석파장을 선택하기 위해 PDA (photodiode array) 검출기로 210 nm에서 350 nm까지 스캔한 결과 최대흡수파장(λ_{max})이 259.2 nm임을 확인하여 측정파장을 260 nm으로 선택하였다(Fig. 1). 칼럼은 비극성 화합물의 분리에 적합한 C_{18}(4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며 oxathiapiprolin peak의 선택성을 확보하기 위해 이동상은

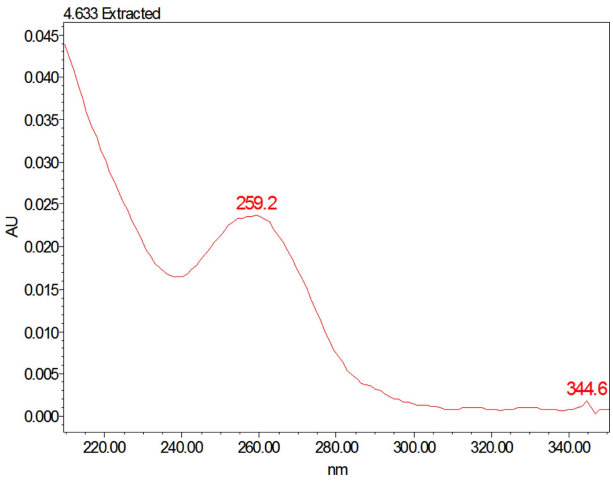
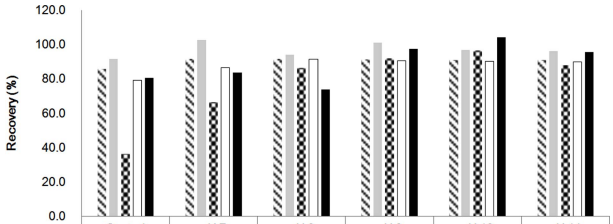


Fig. 1. HPLC-PDA spectrum of oxathiapiprolin.



	Control	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
Mandarin	85.6	91.5	91.4	91.4	90.9	91.1
Pepper	91.7	102.7	94.1	101.3	96.7	96.1
Potato	36.4	66.3	86.3	91.9	96.4	87.9
Hulled rice	79.0	86.5	91.5	90.6	90.3	90.0
Soybean	80.5	83.7	73.8	97.5	104.1	95.6

Fig. 2. Effect of pH on oxathiapiprolin partition efficiency.

acetonitrile과 distilled water (65/35, v/v)을 이용하였다. 또한 표준용액 조제 및 분석시료 조제 시 기기분석 이동상 용매인 acetonitrile/distilled water (50/50, v/v)을 사용한 것은 기기분석 시 대칭형의 sharp한 peak을 얻기 위함이었다.

추출 및 분배 조건 확립

Acetonitrile 추출액 중 비극성 간섭물질 제거를 위해 dichloromethane으로 액액분배를 수행하였다. 수용액 상의 극성 추출액에서 비극성 용매로의 효과적인 분배를 위해 pH를 조절하여 이온억압상태를 만들어 이온이 해리되는 것을 방지하였다[12,13]. Oxathiapiprolin은 짝산의 산해리상수(pKa)가 2.25인 약염기성 물질이기 때문에 추출액을 농축하여 증류수로 희석한 뒤 염기성 용매인 1 N sodium hydroxide (NaOH)를 이용하여 pH 변화에 따른 분배효율을 비교하였다(Fig. 2). 감자를 제외한 농산물 검체에서 회수율은 pH 변화에 관계없이 양호하였으나 감자는 pH 9-10 구간에서만 90%이상의 회수율을 보였기 때문에 분배 시 최적 pH는 5종의 농산물 검체가 모두 90%이상의 회수율을 보였던 pH 9-10사이로 결정하였다. 추출액 중 유지성분을 함유하고 있는 지방성 물질인 대두 및 현미의

Table 4. Comparison of SPE cartridges and elution solvents for oxathiapiprolin analysis

Experiment 1	Fraction	Florisil (%)	Silica (%)
DCM/*n*-hexane	Loading (4 mL)	-	-
	10/90 (5 mL)	-	-
	20/80 (5 mL)	-	-
	30/70 (5 mL)	-	-
	40/60 (5 mL)	-	-
	50/50(5 mL)	-	-
Total		-	-
Experiment 2	Fraction	Florisil (%)	Silica (%)
Ethyl acetate/ DCM	Loading (4 mL)	-	-
	10/90 (5 mL)	-	-
	20/80 (5 mL)	36.9	69.1
	30/70 (5 mL)	40.1	18.2
	40/60 (5 mL)	-	-
	50/50 (5 mL)	-	-
Total		76.1	87.3
Experiment 2-1	Fraction	Florisil (%)	Silica (%)
Ethyl acetate/ DCM	Loading (4 mL)	-	-
	15/85 (10 mL)	-	6.3
	20/80 (10 mL)	85.5	88.3
	25/75 (10 mL)	-	-
Total		85.5	94.6
Experiment 2-2	Fraction	Florisil (%)	Silica (%)
Ethyl acetate/ DCM	Loading (4 mL)	-	-
	15/85 (8 mL)	-	-
	20/80 (10 mL)	84.9	96.5
	25/75 (10 mL)	-	-
Total		84.9	96.5

경우 추출 시 다량의 유지성분이 동시에 추출되어 농축 후 잔여물이 남게 되기 때문에 유지 및 비극성 성분의 정제를 위해 추가로 acetonitrile과 *n*-hexane을 이용한 분배법을 적용하였다.

카트리지정제법 확립

분배 추출액은 극성도를 이용하여 물질을 정제하는데 사용하는 흡착 크로마토그래피를 이용하여 불순물을 정제하였다. 흡착크로마토그래피에 사용되는 흡착제는 alumina, Florisil, silica 및 활성탄 등이 있으나 alumina나 활성탄은 흡착력이 강해 비극성인 농약과 방해물질을 분리하기에는 적합하지 않다고 판단하여 Florisil 카트리지와 silica 카트리지를 선택해 비교하였다.

Log P_{ow} 값이 3.66인 점을 고려하여 Florisil 및 silica 카트리지에 비교적 비극성용매들의 조합인 dichloromethane/*n*-hexane, ethyl acetate/dichloromethane을 비교한 결과, 전자의 용매 사용시 모든 처리구에서 용출되지 않았고, 후자의 용매 사용 시 oxathiapiprolin이 용출됨을 확인하였기 때문에 이를 정제 용매로 선택하여 분획별 정제방법을 최적화하였다(Table 4). 시료 로딩 후 oxathiapiprolin은 ethyl acetate/dichloromethane (10/90, v/v) 5 mL로 Florisil 및 silica 카트리지에서 모두 용출되지 않았고 ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v) 5 mL (Florisil: 36.9%, silica: 69.1%)와 ethyl acetate/dichloromethane (30/70, v/v) 5 mL (Florisil: 40.1%, silica: 18.2%)에서 용출됨을 확인하였다. 이에 분획을 세분화하고 용출용매를 늘려 시험을 수행한 결과, ethyl acetate/dichloromethane (15/85, v/v) 10 mL에서 Florisil과 silica 카트리지는 각각 불용출, 소량 용출(6.3%)임을 확인하였고, 다음 분획 ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v) 10 mL에서 Florisil 카트리지, silica 카트리지는 각각 85.5%, 88.3%로 확인되어 전체 oxathiapiprolin의 용출량은 Florisil 카트리지 85.8%, silica 카트리지 94.6%로 계산되었다.

따라서 상대적으로 대상 성분의 전체 용출량이 높은 silica 카트리지를 이용하여 ethyl acetate/dichloromethane (15/85, v/v) 8 mL를 유출시켜 세척과정을 거친 후 ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v) 10 mL로 용출시키는 방법을 최종정제방법으로 결정하였다. 이때 silica 카트리지가 Florisil 카트리지보다 높은 회수율을 보인 것은 같은 용출조건에서 Florisil이 oxathiapiprolin에 대한 흡탈착이 상대적으로 약하기 때문인 것으로 판단되었다.

분석법의 검증

선택성 및 직선성

Oxathiapiprolin의 표준용액, 무처리 농산물 검체 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 개발된 분석법의 선택성(selectivity)을 평가하였다. 무처리 시료 중 oxathiapiprolin의 머무름 시간(5.6 분)에서 어떠한 간섭물질도 검출되지 않음으로 개발된 분석법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인하였다. 개발된 분석법의 직선성(linearity) 확인을 위해 표준원액을 acetonitrile/distilled water (50/50,v/v)로 희석하여 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 μg/mL 20 μL를 HPLC-UV에 주입하여 분석한 결과 결정계수(r^2)는 1.00로 확인되었다.

검출한계와 정량한계

확립한 시험용액 조제 및 기기분석법을 이용하여 검체 중 oxathiapiprolin의 검출한계 및 정량한계를 구하였다. 검출한계는 최소검출량이 0.15 ng (S/N > 3)이었고 아래의 계산식에 따라 0.003 mg/kg으로 나타났다. 정량한계는 최소검출량이 0.01 ng (S/N > 10)으로 아래의 계산식에 따라 0.01 mg/kg으로 나타났다.

Table 5. Intra and Inter-laboratory validation results of analytical method for oxathiapiprolin in agricultural commidities

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD(%)		Average[3] (%)	CV[4] (%)
		MFDS[1]	Kyungin[2]		
Pepper	0.01	86.9 ± 4.9	89.6 ± 7.5	88.2	2.2
	0.1	104.7 ± 4.9	81.1 ± 4.7	92.9	17.9
	0.5	91.9 ± 6.5	80.8 ± 4.4	86.4	9.1
Mandarin	0.01	103.7 ± 5.4	92.0 ± 3.1	97.9	8.5
	0.1	106.3 ± 4.3	82.2 ± 4.5	94.3	18.1
	0.5	86.7 ± 5.2	85.9 ± 1.7	86.3	0.6
Potato	0.01	102.0 ± 6.8	90.4 ± 8.6	96.2	8.5
	0.1	112.7 ± 3.4	84.0 ± 4.3	98.4	20.7
	0.5	92.8 ± 3.2	83.1 ± 0.8	88.0	7.8
Soybean	0.01	91.2 ± 7.9	80.8 ± 8.1	86.0	8.5
	0.1	104.5 ± 6.9	83.0 ± 3.3	93.7	16.2
	0.5	88.4 ± 0.6	77.6 ± 2.3	83.0	9.2
Hulled rice	0.01	97.1 ± 9.0	79.2 ± 8.3	88.2	14.4
	0.1	109.7 ± 7.2	80.2 ± 5.4	94.9	22.0
	0.5	91.0 ± 2.3	82.4 ± 1.7	86.7	7.0

[1]Ministry of Food and Drug Safety (n = 5)
[2]Kyungin Regional Food and Drug Administration (n = 3)
[3]Recovery average of inter-laboratory
[4]Coefficient of variation of inter-laboratory

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

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

분석법의 회수율

분석법의 정확성(accuracy), 정밀성(precision) 및 재현성(repeatability)을 평가하기 위하여 농산물 검체에 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배 수준인 0.01, 0.1, 0.5 mg/kg의 농도로 5 반복 회수율 시험을 수행하였다. 시험 결과 각 농도에서 평균 회수율은 86.7-112.7%이었고, 이 때 상대표준편차(RSD)도 10% 미만으로 나타나 개발된 분석법의 정확성, 정밀성, 재현성을 확인하였다. 이 결과는 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)의 기준인 처리농도 > 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg의 30%, 처리농도 > 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg의 20%, 처리농도 > 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg의 15%인 기준에 부합하므로 본 연구에서 개발한 추출 정제 방법이 농산물 중 잔류하는 oxathiapiprolin을 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다(Table 5). HPLC-UVD를 이용하여 분석한 oxathiapiprolin의 표준품, 농산물 시료의 무처리, 농산물 시료의 회수율 크로마토그램은 Fig. 3에 제시하였다.

실험실간 검증

개발된 oxathiapiprolin 분석법으로 실험실간 검증을 수행한 결과(Table 5) oxathiapiprolin의 각 기관의 평균 회수율은 86.7-112.7%(잔류물질과), 77.6-92.0%(경인청)으로 조사되어 두 기관의 평균값은 전체 처리구에서 83.0-98.4%로 나타났다. 변이계수(CV) 또한 전체 처리구에서 모두 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)의 기준인 처리농도 > 1 μg/kg, ≤ 0.01 mg/kg의 45%, 처리농도 > 0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 32%, 처리농도 > 0.1 mg/kg, ≤ 1 mg/kg의 23%에 적합한 것으로 확인되어 개발된 분석법의 재현성과 유효성을 확보하였다.

재확인법

개발된 분석법의 잔류분의 신뢰성 확보를 위해 LC-MS를 이용하여 농산물 시료 중 oxathiapiprolin을 재확인하였다. 이온화모드는 ESI^+ (electro-spray ionization positive ion) mode를 사용하였고 아래의 분석조건을 바탕으로 TIC (total

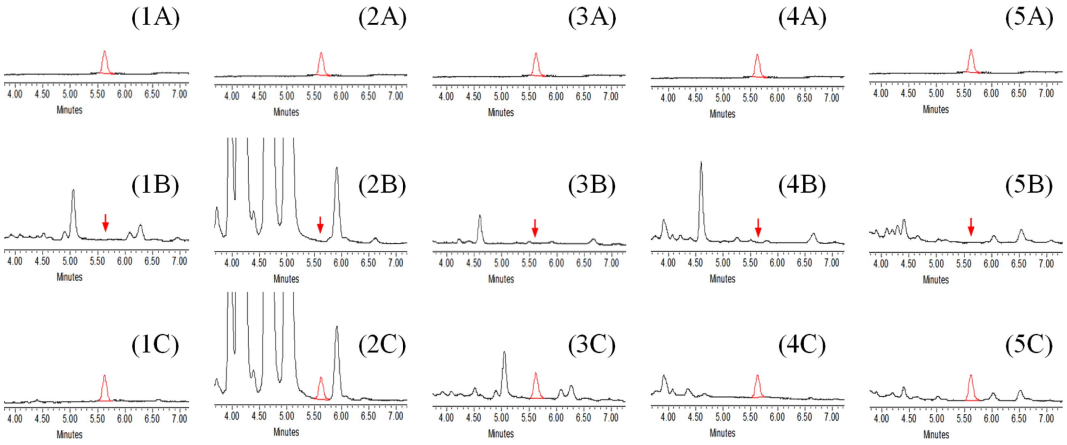


Fig. 3. HPLC-UV chromatograms of oxathiapiprolin corresponding to: standard (A: 0.1 mg/kg), control (B), recovery (C: 0.1 mg/kg) in 1, pepper; 2, mandarin; 3, potato; D, soybean; and E, hulled rice.

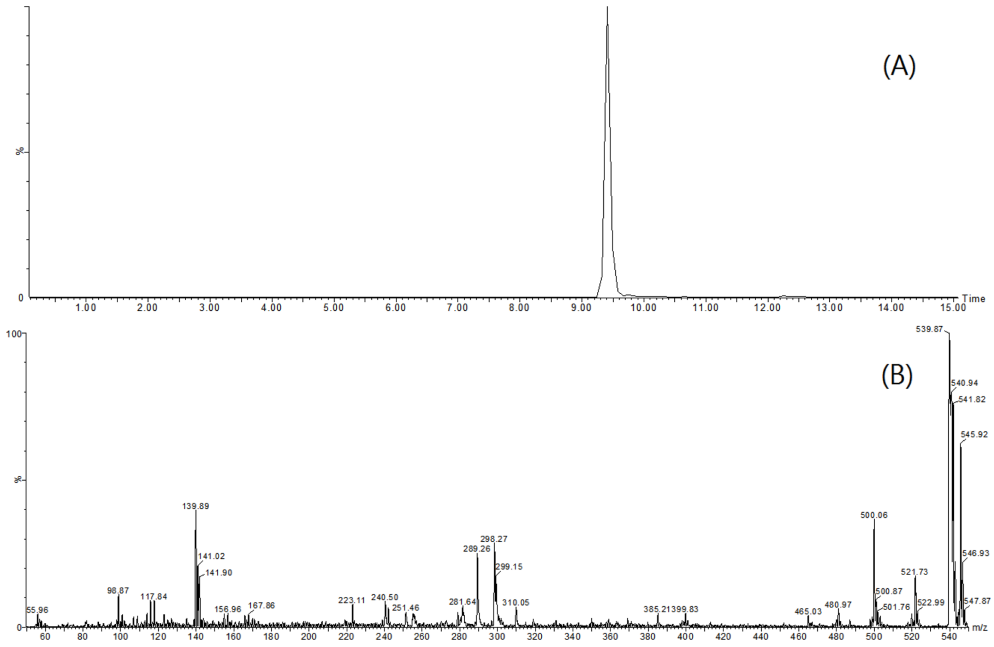


Fig. 4. Full scan chromatogram (A), and spectrum (B) of oxathiapiprolin standard (1 μg/mL).

ion chromatogram와 mass spectrum으로 SIM (selected-ion monitoring)분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 관측질량이 539.1인 oxathiapiprolin($C_{24}H_{22}F_5N_5O_2S$) 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이$(M+H)^+$ 형태인 539.8 mass 값을 확인하였다. 이 때 cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 74 V에서 oxathiapiprolin의 최대의 peak 강도가 나타남을 확인하였다. 이에 Table 3의 최적화된 분석조건으로 분석하여 scan mode의 결과와 SIR mode (single ion recording) 결과가 일치함을 확인하였다(Fig. 4). 최적 이온은 감도가 높으며 분자량을 직접 반영하는 539.8 m/z를 최적 특성이온으로 선정하였고, 이때 oxathiapiprolin의 머무름 시간은 9.4분이었다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년도 식품의약품안전평가원 “2015년 식품 중 잔류농약 위해평가 등을 통한 안전관리 연구(15161-MFDS042)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

Oxathiapiprolin은 병원균의 포자형성과 효모성장을 저해하여 노균병을 방제하는 piperidinyl thiazole isoxazoline 계열 살균제로 2015년 국내 사용등록이 요청된 신규약제이다. 본 연구에서는 oxathiapiprolin의 신규등록과 관련해 안전관리를 위한 공정시험법 마련이 요구되어 농산물 중 잔류분석법을 개발하였다. 농산물 중 oxathiapiprolin은 acetonitrile로 추출한 뒤 분배효율 향상을 위해 1 N sodium hydroxide (NaOH)를 이용해 염기성으로 조절하여 비해리 상태로 만든 뒤 dichloromethane으로 액액분배하였으며 분배추출액은 silica SPE 카트리지로 정제한 뒤 HPLC-UVD로 분석하였다. 개발된 분석법의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 각각 0.003, 0.01 mg/kg이었고, 대표농산물 5종(고추, 감귤, 감자, 대두, 현미) 중 oxathiapiprolin의 평균 회수율은 86.7-112.7%(상대표준편차, RSD ≤ 10%)으로 나타났다. 이는 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)을 만족하는 것으로 확인되었다. 따라서 개발된 분석법은 국내외 유통 농산물 중 oxathiapiprolin의 안전평가를 위한 잔류량 적부 판정에 있어 공정시험법으로 사용되기에 적합할 것으로 판단된다.

References

1. Lededa, A., and Cohen Y.: Cucurbit downy mildew (Pseudoperonospora cubensis)-biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Eur J Plant Pathol*, **129**, 157-192 (2011).
2. Chao, J., Fengshou, D., Xingang, L., Huanhuan Z., and Jun, X.: Rapid residue analysis of oxathiapiprolin and its metabolites in typical Chinese soil, water, and sediments by a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, **38**, 909-916 (2015).

3. Cohen Y.: The Novel Oomycide Oxathiapiprolin Inhibits All Stages in the Asexual Life Cycle of Pseudoperonospora cubensis - Causal Agent of Cucurbit Downy Mildew. PLoS ONE 10(10): e0140015 (2015).
4. CODEX, reques for commnets on the establishment of the codex schedules and priority lists of pesticides, CX4/40.2 CL 2015/3-PR (2015) Available from ftp://ftp.fao.org/codex/Circular_Letters/CxCL2015/cl15_03e.pdf
5. MHLW, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan proposes the revision of MRLs for 10 agricultural chemicals. (2015) Available from: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Japan%20proposes%20the%20revision%20of%20MRLs%20for%2010%20agricultural%20chemicals_Tokyo_Japan_10-28-2015.pdf
6. EPA, United states environmental protection agency. Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food: Oxathiapiprolin tolerance for residue. Available from: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e35c54e3aaefa8d362fbdbef75eab055&mc=true&node=se40.24.180_1685&rgn=div8
7. APVMA, Australian pesticides and veterinary medicines authority, Agricultural and veterinary chemicals code instrument No. 4(MRL standard) 2012 F2016C00073 Available from: https://www.comlaw.gov.au/Details/F2016C00073
8. Health Canada, Proposed maximum residue limit PMRL-2015-50 Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/alt_formats/pdf/pest/part/consultations/pmrl2015-50/pmrl2015-50-eng.pdf
9. Wu, X., Xum, J., Dong, F., Liu, X. Li, Y., and Zheng Y.: Simultaneous determinations of oxathiapiprolin and two metabolites in fruits, vegetables and cereal using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1239**, 30-37 (2014).
10. Ju. C., Dong. F., Liu, X., Wu, X., Zhao, H., Zheng, Y., and Xu, J.: Rapid residue analysis of oxathiapiprolin and its metabolite in typical chinese soil, water, and sediments by a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, **38**, 909-916 (2015).
11. CAC (CODEX Alimentarius Commission). Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy (2003).
12. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Analytical methods of pesticide residues in foods, pp. 24-25, fourth ed (2013).
13. Jang, J., Kim, H. Ko, A-Y, Lee, E-H, Joo, Y. J., Kim, J., Chang, M-I and Rhee G-S.: Development of an Official Analytical Method for Determination of Imazapyr in Agricultural Commodities using HPLC-UVD. *Korean J. Pestic. Sci.*, **3**, 5-13 (2015).