pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 1, pp. 30~39 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.1.30

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

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살균제 Sedaxane의 잔류시험법 개발 및 검증

조성민 · 도정아* · 박신민 · 이한솔 · 박지수 · 신혜선 · 장동은 · 최영내[1] · 정용현 · 이강봉
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,
[1]한국식품과학연구원

Development and Validation of an Analytical Method for Fungicide Sedaxane Determination in Agricultural Products using LC-MS/MS

Sung Min Cho, Jung-Ah Do*, Shin-Min Park, Han Sol Lee, Ji-Su Park, Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Young-Nae Choi[1], Yong-hyun Jung, and Kangbong 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, Korea
[1]Korea Advanced Food Research Institute, Uiwang, Korea
(Received January 8, 2018/Revised November 11, 2018/Accepted November 11, 2018)

ABSTRACT - An analytical method was developed for the determination of sedaxane in agricultural products using liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted with acetonitrile and partitioned with dichloromethane to remove the interference, and then purified by using silica SPE cartridges to clean up. The analytes were quantified and confirmed by using LC-MS/MS in positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). The matrix-matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.001-0.25 μg/mL) into a blank extract with r^2>0.99. For validation, recovery tests were carried out at three different concentration levels (LOQ, 10LOQ, and 50LOQ, n=5) with five replicates performed at each level. The recoveries were ranged between 74.5 to 100.8% with relative standard deviations (RSDs) of less than 12.1% for all analytes. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL 40, 2003) and Food Safety Evaluation Department guidelines (2016). The proposed analytical method was accurate, effective and sensitive for sedaxane determination in agricultural commodities.

Key words: Sedaxane, LC-MS/MS, Analytical method, Agricultural commodity, Fungicide.

세다산(Sedaxane)은 신젠타(Syngenta)에서 개발한 pyrazole carboxamide계 살균제로써 깜부기병, 아시아산 콩 녹병균 및 리족토니아 종(*Rhizoctonia* spp.)을 포함한 광범위한 곰팡이 병원균을 억제하는데 효과가 있으며, *trans*-isomer와 *cis*-isomer 두 종류의 입체이성질체를 포함하고 이들은 유사한 독성학적 특징 및 살진균 활성을 가지고 있다[1)]. 세다산의 화학식은 $C_{18}H_{19}F_2N_3O$, 분자량은 331.37 g/mol 물리·화학적 특징을 살펴보면 n-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 3.3으로 비극성 화합물의 특성을 나타낸다[2)].

*Correspondence to: Jung-Ah Do, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Chungcheongbuk-do, 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4211, Fax:82-43-719-4200
E-mail: jado@korea.kr

세다산의 잔류물의 정의는 미국(The Electronic Code of Federal Regulations, ECFR)과 일본(The Japan Food Chemical Research Foundation, JFCRF)의 경우 시스와 트랜스 이성질체의 합으로, 코덱스(Codex)와 유럽(EC)은 모화합물로 정하여 관리하고 있다[3-6)]. 세다산의 독성은 일본(Food Safety Commission of Japan, FSCJ)에서 신경독성(neurotoxicity), 기형유발성(teratogenicity), 번식독성(reproductivity toxicity), 유전독성(genotoxicity), 면역독성(immunotoxicity)이 없는 것으로 평가하였으며, 2년에 걸친 장기 독성/발암성 시험에서 자궁선암종과 간세포 종양 발생의 증가를 근거로 독성종말점을 NOAEL(The lowest no-observed-adverse-effect level) 11 mg/kg bw/day로 설정하였고, NOAEL에 안전계수 100을 고려하여 ADI (Acceptable Daily Intake)를 0.11 mg/kg bw/day로 설정하였다[7)]. 유럽(European Food Safety Authority, EFSA)의 경

우 세닥산 독성평가 결과 2년 반복투여 독성시험을 근거로 독성종말점을 NOAEL 11 mg/kg bw/day로 설정하였고, NOAEL에 안전계수 100을 고려하여 ADI를 0.11 mg/kg bw/day로 평가하여 설정하였다[8]. 2019년 1월 현재, 코덱스에서 잔류허용기준(Maximum Residue Limits, MRL)은 농산물과 축산물을 포함하여 감자 등 16품목에 대하여 0.01-0.1 mg/kg로 설정되어 있으며, 유럽은 농산물에만 적용되어 쌀 등 15품목에 대하여 0.01-0.02 mg/kg, 일본은 축산물과 농산물을 포함하여 보리 등 35품목에 대하여 0.01-0.02 mg/kg, 미국은 농산물에만 적용되어 대두 등 16품목에 대하여 0.01-0.1 mg/kg으로 설정되어있다[3-6]. 국내의 경우 2018년 수입식품에 대하여 감자에 대한 잔류허용기준 신설이 요청된 상태로 독성평가 및 잔류허용기준(안) 평가가 진행되었고, 이에 따라 본 연구에서는 세닥산의 잔류허용기준 신설에 따른 공정시험법을 개발하고자 하였다.

시험법의 경우 미국 환경보호청(United States Environmental Protection Agency, EPA)에서 물과 토양 중 세닥산을 HLB 카트리지를 이용하여 정제 후 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 사례는 보고되어 있었으나, 식품에 적용하여 분석한 사례는 국내외에 보고된 바가 없다[9-10]. 따라서 본 연구에서는 식품 중 잔류할 수 있는 세닥산의 안전관리를 위한 시험법을 최초로 개발하여 농산물 중 농약의 잔류허용기준 신설 및 잔류농약검사를 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

세닥산(순도 99.9%) 표준품은 신젠타(Syngenta)에서 제공받아 사용하였다. 아세토니트릴(Acetonitrile), 디클로로메탄(Dichloromethane), 메탄올(Methanol) 등은 HPLC 등급으로 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였고, 염화나트륨은 Wako(Osaka, Japan), 무수황산나트륨은 Merck (Darmstadt, Germany), 포름산은 Sigma Aldrich(St.Louise, MO, USA), 실리카(Silica) SPE 카트리지(1 g, 6 cc)는 Waters(Milford, MA, USA)에서 구입하였고, 실린지 필터(Nylon, 0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma(Barcelona, Spain)에서 제품을 각각 구입하여 사용하였다. 검체는 식물성 원료로 분류된 대표농산물 5종 감귤(과일류, mandarin), 감자(서류, potato), 고추(채소류, green pepper), 대두(두류, soybean), 현미(곡류, hulled rice) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50°C 이하에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

세닥산 표준품 10.01 mg을 10 mL의 아세토니트릴에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였으며, 이를 아세토니트릴로 희석하여 10 및 100 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 이를 시료 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.25 μg/mL로 조제하여 90% 이상의 무처리 추출물이 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

추출 및 액액분배

검체를 분쇄하여 균질화한 후 10 g(곡류, 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 10 g, 서류, 과일류, 채소류는 약 1 kg을 분쇄한 후 10 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고(곡류 및 두류의 경우 증류수 20 mL를 가한 후 30분간 방치) 아세토니트릴 50 mL를 가하여 진탕기에서 10분간 진탕한다. 추출물은 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기를 이용해 흡인여과한 뒤 아세토니트릴 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내려 앞의 여액과 합친 뒤 이를 40°C 이하 수욕 상에서 감압 농축한다. 농축 후 잔류물에 증류수 100 mL를 가하여 녹인 후 500 mL 용량의 분액여두에 옮기고 염화나트륨 10 g을 넣고 디클로로메탄 30 mL를 차례로 가하고 심하게 흔든다. 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 디클로로메탄층을 무수황산나트륨에 통과시켜 감압농축플라스크에 받고, 남아있는 수용액 층에 디클로로메탄 30 mL를 추가로 가하여 위의 과정을 반복한다. 이를 40°C 이하의 수욕 상에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 후, 잔류물에 디클로로메탄 10 mL를 가하여 최종부피가 10 mL가 되게 한다. 다만, 지방성 검체(대두, 현미)의 경우 잔류물에 미리 아세토니트릴로 포화시킨 헥산 30 mL를 잔류물에 가하여 녹인 후 250 mL 분량의 분액여두에 옮기고 헥산으로 포화시킨 아세토니트릴 30 mL로 2회 분배하여 추출한다. 합친 아세토니트릴 층을 40°C에서 감압 농축한 후 잔류물에 디클로로메탄을 가하여 최종부피를 10 mL가 되게 한다.

카트리지 정제

실리카 카트리지에 디클로로메탄 10 mL를 2-3 방울/초의 속도로 유출하여 버린 후 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정에서 얻은 용액 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1-2 방울/초의 속도로 유출하여 버린 후 이어 디클로로메탄 5 mL로 씻은 후 고정상 상단이 노출되기 전에 아세토니트릴/디클로로메탄(70/30, v/v) 10 mL를 카트리지상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출하여 감압농축플라스크에 취한다. 이를 40°C 이하 수욕상에서 감압농축 후 잔류물에 아세토니트릴을 가하여 최종부피 1 mL가 되게 한 뒤 실린지 필터(nylon, 0.2 μm)로 여과하여 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하였다.

Table 1. LC-MS/MS parameters of analysis condition for sedaxane

Parameter	Condition		
Instrument	LC: Xenera X2 LC-30AD(Shimazu, Kyoto, Japan) MS/MS: LCMS-8060(Shimadzu, Kyoto, Japan)		
Column	Cadenza HS-C_{18}(Imtakt, 3 mm I.D. × 150 mm L., 3 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Oven temp.	40°C		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in methanol B: 0.1% formic acid in water		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	10	90
	2.0	10	90
	2.1	80	20
	6.0	80	20
	6.1	10	90
	13.0	10	90
MS/MS condition			
Interface temp.	150°C		
Heating block temp.	400°C		
Desolvation line temp.	250°C		
Heating gas flow	10.0 L/min		
Nebulizer gas flow	3.0 L/min		

LC-MS/MS 분석조건

세다산 분석을 위해 Shimadzu(Kyoto, Japan)사의 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Spectrometer, LC-MS/MS-8060)를 이용하였다. 분석용 칼럼은 역상 칼럼인 Cadenza HS-C_{18}(Imtakt, 3 mm I.D. × 150 mm L., 3 μm)을 선택하였고, 기울기 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 메탄올과 0.1% 포름산 수용액을 이동상으로 사용하였다. 분석성분의 이온화법으로는 electro-spray ionization(ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였으며, LC-MS/MS의 분석조건은 Table 1과 같다.

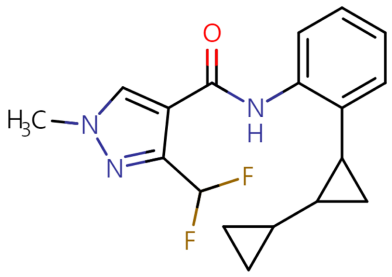
시험법의 검증

본 연구는 'CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)'과 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'을 적용하여 시험법의 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quiantification, LOQ), 회수율(recovery) 및 재현성(reproducibility)에 대한 유효성을 검증하였다[11-12]. 직선성 확인을 위하여 세다산을 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준 용액 0.001-0.25 μg/mL의 농도범위에 대한 각각의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(Coefficients of determination, r^2)를 구하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(Signal-to-noise ratio, S/N)를 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 확인하기 위하여 무처리 시료에 세다산의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 확인하였다. 회수율 실험의 처리 농도는 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도로 수행하였으며, 각 농산물 검체의 처리구는 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)를 계산하여 시험법의 정확성, 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한, 한국식품과학연구원과 실험실간 검증(inter-lab)을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

Results and Discussion

기기선정 및 분석조건 확립

세다산은 분자 내에 존재하는 amide기가 열에 불안정하고 분해온도가 270°C이며, 증기압이 1.7×10^{-7} Pa(25°C)으로 휘발성이 낮기 때문에 GC 분석 시 재현성이 낮아 적용되기 어렵다. 비공유 전자쌍과 이중결합의 전자전이에



$C_{18}H_{19}F_2N_3O$
M.W. 331.37

Fig. 1. Molecular structure of sedaxane

의해 UV-vis에서 강한 흡광성을 나타내는 conjugation 결합을 고려할 경우 LC-UVD를 이용한 분석이 용이할 것으로 판단되었다(Fig. 1). 따라서 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 PLS(positive list system) 도입에 따른 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 분석용 칼럼은 세닥산이 비극성(Log P_{ow}=3.3)인 특성을 고려하여 비극성 물질과 극성물질 모두 분리가 가능한 C_{18} 칼럼을 선택하였다. 이동상은 0.1% 포름산 함유 메탄올과 0.1% 포름산 수용액을 이용한 기울기 용리 방식으로 분석하였다. 이동상에 쓰인 포름산은 세닥산 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이한 protonation enhancer로 작용하였다[13]. 각 대상성분은 electro-spray ionization(ESI)법의 positive-ion mode를 사용하여 최적 특성이온을 선정하여 selected-ion monitoring(SIM)으로 분석하였다. Total ion chromatogram(TIC)과 mass spectrum을 통해 최적 특성이온을 선정하였다. 평균질량 331.37 g/mol(exact mass: 331.15 g/mol)인 세닥산의 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 $[M+H]^+$ 형태인 332.10 mass값을 확인하였다. 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM(multiple reaction monitoring) mode로 분석하였고 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였으며, 가장 높은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 설정하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 2에 나타내었다.

추출 및 분배조건 확립

추출 및 정제조건 확립을 위해 빠르고 쉽게 분석할 수 있는 QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) AOAC 2007.01 및 CEN 15662 method[14]를 세닥산에 적용한 결과 낮은 회수율로 적합하지 않은 것으로 판단되었다(회수율: 49.5-60.0%). 따라서 용매를 이용한 추출조건 확립을 위해 여러 분석조건을 검토하였다. 먼저 pKa 그래프 이온억압(ion-suppression) 조건에서 비이온화 지용성 화합물형태가 되어 비극성 유기용매로 추출이 가능하다. 또한 Log P_{ow} 값이 3.3으로 비극성을 띄는 화합물로 pKa 그래프에서 pH 2-12 범위에서 비이온상태로 존재하기 때문에 시료에 대해 별도의 pH조절 없이 유기용매를 이용하여 추출 및 정제가 가능할 것으로 판단되었다(Fig. 2). 대상성분을 비극성 유기용매를 이용하여 추출과 분배를 할 수 있으나 시료 입자 표면이나 내부에 세닥산이 존재할 수 있기 때문에 비극성 유기용매로 추출 시 시료 내부 침투성이 낮아 추출 효율이 낮을 것으로 사료되었다. 따라서 대표 농산물 5종에 대한 추출 용매는 수용성 유기용매를 이용하여 내부 침투성을 용이하게 하고 추출 효율을 높일 수 있는 추출조건을 확립하였다. 수용성 유기용매인 아세토니트릴은 다른 수용성 유기용매인 아세톤과 비교했을 때, 비극성 간섭물질의 추출율이 낮은 특성을 갖고 있으며, chlorophyll과 같은 고추, 대두 등의 색소 추출 효율이 낮아 추출용매로 적합한 것으로 판단되었다[15]. 추출이 끝난 시료 추출액에 극성 간섭물질과 세닥산 분리를 위한 액-액 분배법을 적용하였다. 액-액 분배 용매를 선정하기 위해 세닥산의 물리·화학적 특성, 용매의 극성지수 및 용매에 대한 용해도를 고려하여 디클로로메탄을 선정하였다. 디클로로메탄은 비교적 비극성 유기용매이며, 디클로로메탄에 대한 용해도(>500 g/L, 25°C)가 다른 비극성 유기용매에 비해 높아 분배 효율이 높을 것으로 판단되었다. 또한 액-액 분배 과정에 염화나트륨을 첨가하여 명확한 층 분리를 통해 분배 효과를 증대시키고, 극성 간섭물질이 디클로로메탄 층으로 전이되는 것을 최소화하였다. 다만 시료중 유지함량이 2% 이상인 곡류, 두

Table 2. Selected-ion of LC-MS/MS for sedaxane

Compound	Retention time (min)	Molecular weight	Exact mass	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1]
Sedaxane	5.4	331.37	331.15	332.10	159.00[2]	24
					139.00	36

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

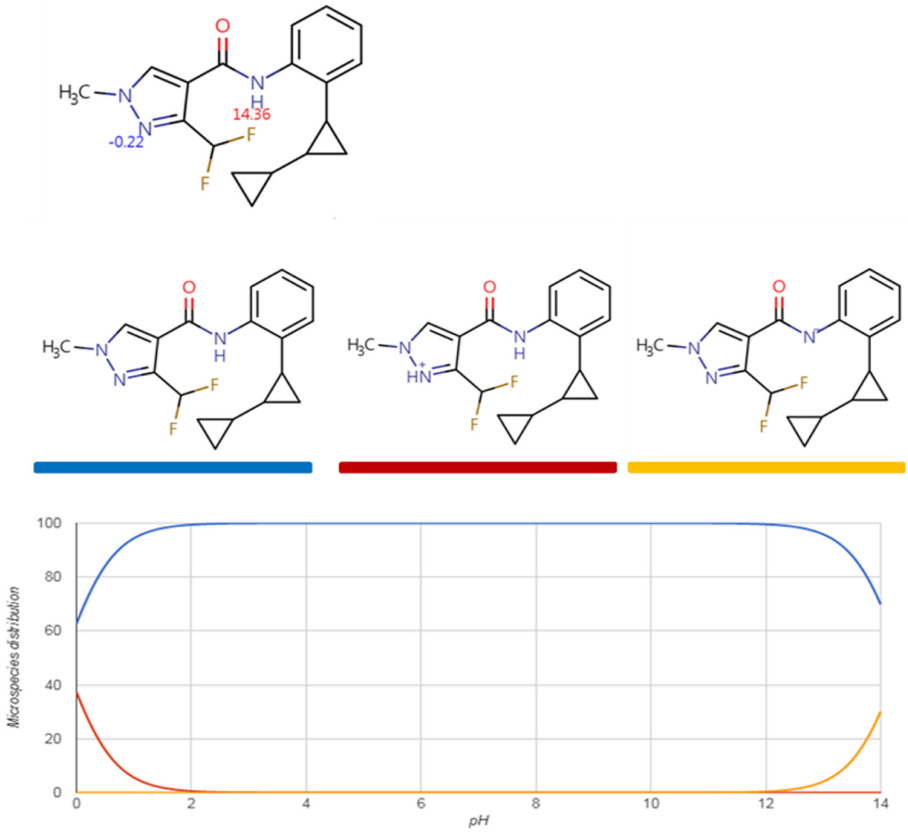


Fig. 2. Structures and pKa graph of sedaxane

Table 3. Comparison of extraction solvent for sedaxane

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery(%)	
		Acetonitrile	Acetone
Hulled rice	0.05	95.9 ± 2.4	73.9 ± 1.1
Potato	0.05	88.2 ± 1.2	58.8 ± 2.5
Soybean	0.05	80.8 ± 1.6	89.6 ± 1.7
Mandarin	0.05	118.7 ± 0.8	215.2 ± 2.6
Green pepper	0.05	70.5 ± 0.5	38.2 ± 1.9

류는 헥산/아세토니트릴 분배법을 추가로 적용하여 유지와 비극성 불순물 제거를 통해 matrix effect를 최소화하였고 대표농산물 5종에 대해 회수율 70.5% 이상의 높은 효율을 나타내었다(Table 3).

카트리지 정제법 확립

분배 과정이 끝난 분배액은 세닥산의 손실을 줄이고, 보다 우수한 정제효과를 얻기 위하여 고체상 추출법(Solid phase extraction, SPE) 중 흡착제에 대한 친화도의 차이를 이용하는 흡착 카트리지인 silica, florisil 및 HLB 카트리지를 사용하여 회수율을 비교하였다. 정제에 사용된 silica 카트리지는 극성 순상 흡착제로써 탄화수소나 염소, 플루오르가 치환된 탄화수소와 같이 비극성 용매 또는 극성이 낮은 에스테르 및 에테르로부터 분석물질을 용출하며, 아세토니트릴 또는 물과 같은 극성이 더 강한 용매로 분석물질을 용출하는 특성을 갖고 있다. Florisil 카트리지는 주로 유기 용매로부터 극성부터 중간 극성물질의 분석에 주로 사용되며, AOAC 및 EPA의 분석법을 이용한 농약분석에 많이 사용 되는 카트리지이다. Silica 카트리지와 florisil 카트리지는 이와 같이 순상 카트리지로 극성 물질을 분리하는 특성이 있으나 용출하는 유기용매의 특성을 이용하여 용매를 조합할 경우 비극성 분석 물질을 분리할 수 있다. HLB 카트리지는 Divinylbenzene–N-vinylpyrrolidone Copolymer 고정상이 충진되어있는 역상 카트리지로써 친

Table 4. Comparison of SPE cartridge for sedaxane

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	SPE cartridge		
			Florisil (%)	Silica (%)	HLB (%)
Dichloromethane	100	Loading (5 mL)	-	-	46.8
Ethyl acetate/ Dichloromethane	10/90	1 (10 mL)	62.0	60.0	24.0
	20/80	2 (10 mL)	4.0	-	-
	30/70	3 (10 mL)	4.0	-	-
	40/60	4 (10 mL)	2.0	-	-
Total			72.0	60.0	70.8
Dichloromethane	100	Loading (5 mL)	-	-	38.0
Acetone/ Dichloromethane	10/90	1 (10 mL)	73.6	35.8	22.8
	20/80	2 (10 mL)	-	-	-
	30/70	3 (10 mL)	-	-	-
	40/60	4 (10 mL)	-	-	-
Total			73.6	35.8	60.8
Dichloromethane	100	Loading (5 mL)	-	-	41.4
Acetonitrile/ Dichloromethane	90/10	1 (10 mL)	67.0	93.6	50.0
	80/20	2 (10 mL)	-	-	-
	70/30	3 (10 mL)	-	-	-
	60/40	4 (10 mL)	-	-	-
Total			67.0	93.6	91.4

Table 5. Comparisons of elution solvent ratio for sedaxane

Compound	Fraction	Elution efficiency(%)			
		Solvent ratio (v/v)[1)]			
		90/10	80/20	70/30	60/40
Sedaxane	1 (5 mL)	-	-	-	-
	2 (5 mL)	87.8	92.4	95.8	94.2
	3 (5 mL)	-	-	-	-
	4 (5 mL)	-	-	-	-
Total		87.8	92.4	95.8	94.2

[1)]Solvent ratio of Acetonitrile/Dichloromethane

수성이 강한 성분들은 카트리지에서 쉽게 용출되지만, 방향족 고리나 탄소수가 4개 이상인 카르복실 산을 함유하는 화합물은 흡착되는 원리를 이용한 카트리지이다.

세닥산은 Log P_{ow}값이 3.3으로 비극성 물질임을 고려하여 에틸아세테이트/헥산, 아세톤/헥산 및 에틸아세테이트/디클로로메탄의 혼합액으로 정제효율을 비교하였다. 에틸아세테이트/헥산과 아세톤/헥산의 혼합액에서 florisil, silica, HLB 카트리지 모두 회수율이 25.2-50.0%로 낮은 회수율을 보여 정제 용매로 사용할 수 없었다. 두 용매 조합에서 비극성 용매로 사용된 헥산은 비극성인 세닥산을 용출시키기에 적합할 것으로 판단하였으나, 세닥산은 헥산에 대한 용해도(410 mg/L)가 상대적으로 낮기 때문에 흡착카트리지의 활성기에 흡착된 세닥산이 용매와의 경쟁적 친화력이 낮아 용출이 모두 되지 않은 것으로 판단하였다. 반면, 에틸아세테이트/디클로로메탄의 혼합액에서의 각 카트리지별 회수율을 확인한 결과 florisil 카트리지에서 72.0%, silica 카트리지에서 60.0%, HLB 카트리지에서 70.8%의 회수율이 확인되었다. 디클로로메탄과의 혼합액 정제효율을 비교하기 위하여 에틸아세테이트/디클로로메탄, 아세톤/디클로로메탄 및 아세토니트릴/디클로로메탄 혼합액을 세분화하였고 그 결과, 아세토니트릴/디클로로메탄 혼합액에서 높은 회수율이 확인되었다(Table 4). 정제조건을 최적화

하기 위해 용매 조성을 세분화하여 확인한 결과, silica 카트리지에서 아세토니트릴/디클로로메탄 혼합액(70/30, v/v) 10 mL에서 가장 높은 회수율을 보여 최적의 정제용매로 선정하였다(Table 5). 따라서 최종 정제법은 디클로로메탄으로 재용해한 추출액 10 mL 중 간섭물질 최소화를 위해 5 mL를 카트리지에 유출시킨 후 디클로로메탄 5 mL로 씻어 버리고 아세토니트릴/디클로로메탄 혼합액(70/30, v/v) 10 mL로 용출시키는 방법으로 정제 효율을 높여 적용하였다.

시험법 검증

세닥산은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교, 평가하여 선택성(selectivity)을 확인하였다. 무처리 시료 중 세닥산의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 간섭물질은 검출되지 않아 본 시험법은 대상물질을 분석하는 것에 있어 높은 분리능과 선택성(selectivity)을 확보하였다. 개발된 시험법의 직선성(linearity)을 확인하기 위해 표준원액을 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.25 μg/mL 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 모든 농산물 시료 표준용액에서 결정계수(r^2) 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 3). 본 연구에서 확립한 시험용액 조제 및 기기분석 방법을 이용하여 검체 중 세닥산의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 구하였다. 세닥산의 검출한계는 기기의 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비를 3 이상으로 결정하고 정량한계는 신호 대 잡음비 10 이상으로 결정하여 세닥산의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.001 및 0.005 mg/kg으로 나타났다. PLS 도입으로 잔류허용기준이 정해지지 않은 농산물의 경우 불검출기준인 0.01 mg/kg을 검출할 수 있는 충분한 감도로 확

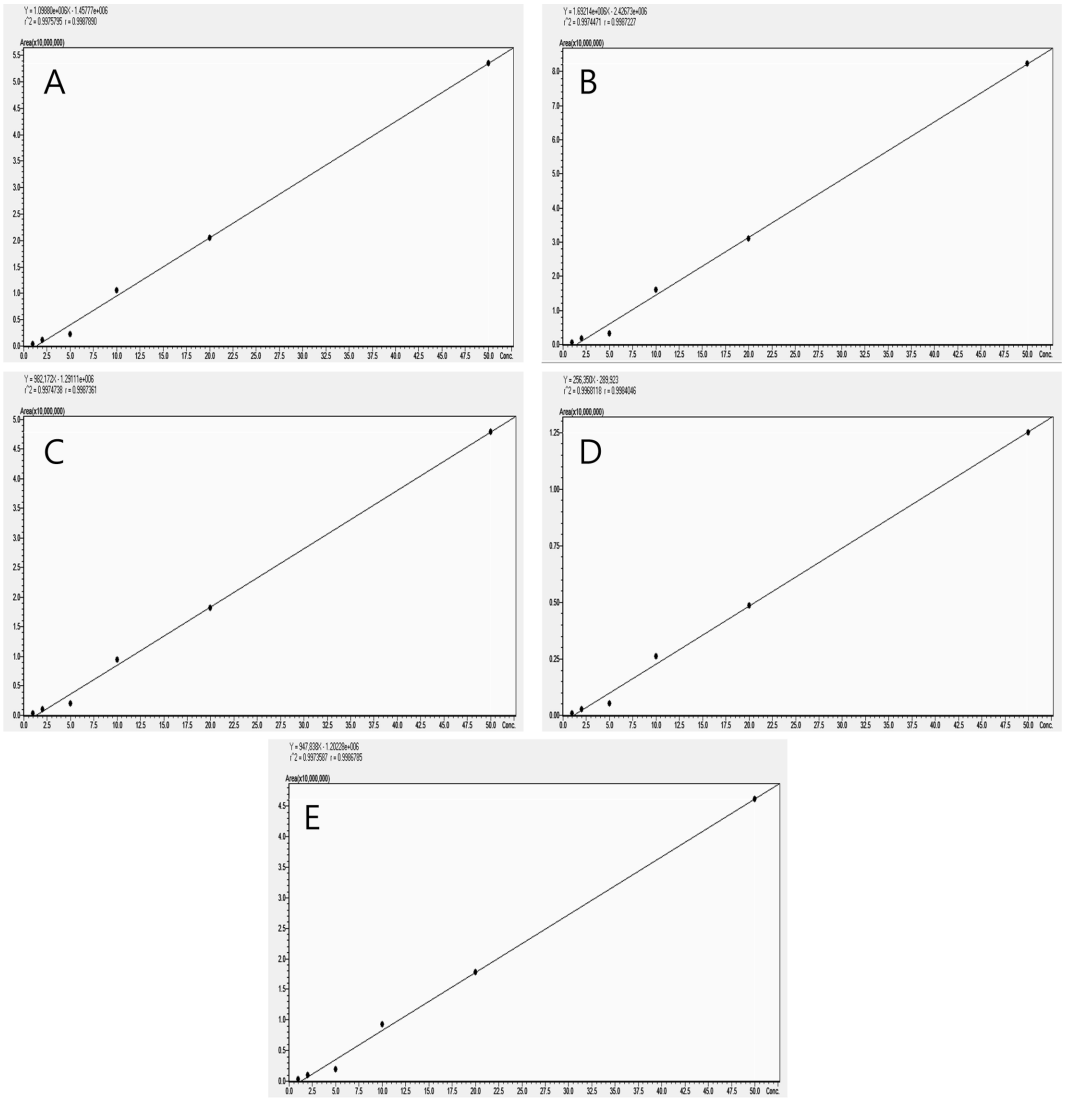


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of sedaxane in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

Table 6. Inter-laboratory validation results of analytical method for sedaxane residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1](%)		Ave[4] (%)	CV[5] (%)	LOQ (mg/kg)
		Lab A[2]	Lab B[3]			
Hulled rice	0.005	77.3 ± 5.2	92.1 ± 5.8	84.7	11.2	0.005
	0.05	87.8 ± 12.1	90.9 ± 2.8	89.4	9.0	
	0.25	80.6 ± 11.4	91.3 ± 9.7	86.0	13.0	
Potato	0.005	81.4 ± 10.1	82.7 ± 3.0	82.1	8.2	
	0.05	81.6 ± 11.2	94.3 ± 2.1	88.0	11.4	
	0.25	83.7 ± 11.7	94.3 ± 4.0	89.0	10.9	
Soybean	0.005	80.2 ± 10.7	94.1 ± 1.8	87.2	11.8	
	0.05	77.0 ± 11.0	90.5 ± 1.9	83.8	12.2	
	0.25	83.3 ± 8.3	98.3 ± 3.5	90.8	11.0	
Mandarin	0.005	100.8 ± 4.6	80.9 ± 1.7	90.9	12.5	
	0.05	86.8 ± 3.2	75.5 ± 4.2	81.2	8.7	
	0.25	86.4 ± 9.0	76.1 ± 3.3	81.3	10.2	
Green pepper	0.005	80.7 ± 6.5	90.1 ± 0.8	85.4	7.7	
	0.05	88.2 ± 5.7	100.2 ± 3.7	94.2	8.3	
	0.25	74.5 ± 0.9	102.4 ± 2.3	88.5	17.4	

[1]RSD: Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation
[2]Lab A: Ministry of Food and Drug Safety
[3]Lab B: Korea Advanced Food Research Institute
[4]Ave.: Recovery average of inter-laboratory
[5]CV: Coefficient of variation of inter-laboratory

인되었다.

확립된 시험법을 이용하여 5종의 농산물 시료에 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배 농도(0.005, 0.05 및 0.25 mg/kg)로 5반복 회수율 실험을 통하여 시험법의 정확성, 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 개발된 시험법의 결과, 세닥산의 각 농도별 평균 회수율은 74.5~100.8%이었고, 상대표준편차는 12.1% 이하로 분석되었다. 따라서 본 연구 결과는 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)의 잔류농약 분석 기준에서 상대표준편차가 처리농도 >0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg일 때 30%, >0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 20%, >0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg의 15%이하로 세닥산의 경우 3개의 농도에서 기준보다 낮게 분석되어 분석 기준에 적합하므로 분석물질에 대한 높은 정확성, 재현성 및 정밀성을 확인할 수 있었다. 식약처 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'의 처리농도 >1 μg/kg, ≤ 10 μg/kg일 때, 회수율 범위 60~120%, 변이계수(CV)는 32%, >10 μg/kg, ≤ 100 μg/kg일 때, 회수율 범위 70~120%, CV값 22%, >100 μg/kg, ≤ 1,000 μg/kg일 때, 회수율 범위 70~120%, CV값 18%로 가이드라인에 부합한 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 개발한 농산물 중 잔류하는 세닥산의 추출 및 정제 방법은 분석이 두 가이드라인에 부합하였고, 잔류농약 분석 기준에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 6)[12-13]. LC-MS/MS를 이용한 5종의 농산물 시료 중 세닥산의 회수율 크로마토그램은 Fig. 4에 제시하였다.

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법은 시험법의 유효성을 검증하기 위하여 한국식품과학연구원과 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 한국식품과학연구원에 동일하게 제공하고, 회수율 및 표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 회수율은 75.5~102.4%, 표준편차는 9.7% 이하였다. 두 실험실간의 평균 회수율은 81.2~94.2%이고, 변이계수(CV)는 17.4% 이하로 확인되였다. 따라서, CODEX 가이드라인에서 제시한 실험실간 검증 기준은 처리농도 >1 μg/kg, ≤ 0.01 mg/kg의 45%, >0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 32%에 만족하고, 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)의 처리농도 >1 μg/kg, ≤ 10 μg/kg의 46%, >10 μg/kg, ≤ 100 μg/kg의 34%, >100 μg/kg, ≤ 1,000 μg/kg의 25%에 만족하여 모든 처리농도에서 두 가이드라인에 부합한 것을 확인하였다(Table 6). 따라서 본 연구에서 확립한 시험법은 식품공전에 수록하여 잔류허용기준을 통한 안전관리 및 적부판정을 위한 시험법으로 적합할 것으로 확인된다.

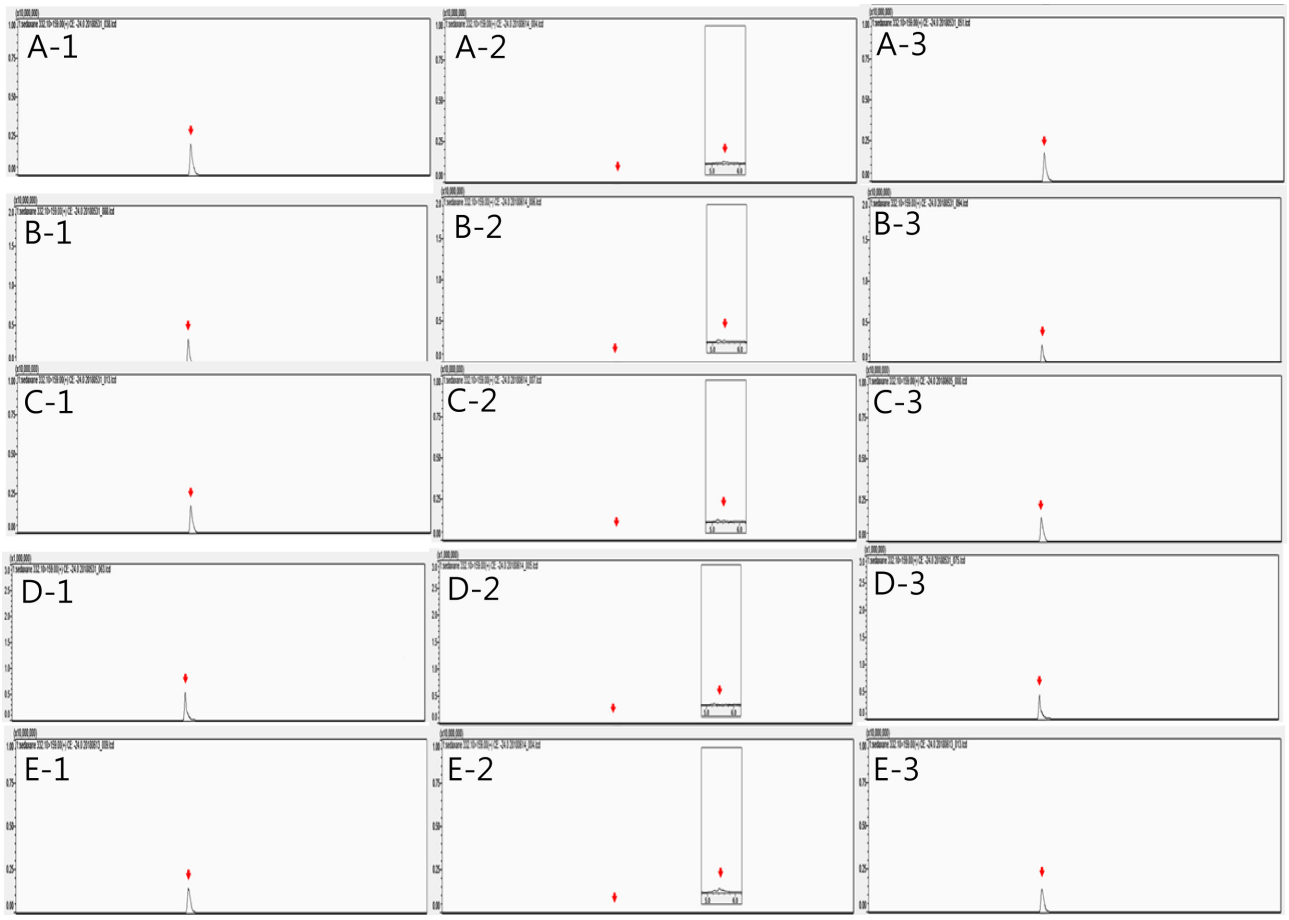


Fig. 4. Representative MRM(quantification ion) recovery chromatograms of sedaxane (332.1>159.00) on (1) matrix-matched standard, (2) control and (3) recovery test(fortification concentration: 0.05 mg/kg) in (A) hulled rice (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin, (E) green pepper

Acknowledgement

본 연구는 2018년도 식품의약품안전평가원 “2018년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(18161식품위013)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

세닥산은 pyrazole carboxamide계 살균제로 광범위한 곰팡이 병원균을 억제하는데 효과가 있으며, *trans*-isomer와 *cis*-isomer 두 종류의 입체이성질체를 포함하고 이들은 유사한 독성학적 특징 및 살진균 활성을 가지고 있다. 세닥산의 잔류물의 정의는 농산물에서 미국(EPA)과 일본(JFCRF)에서 시스와 트랜스 이성질체의 합으로, 코덱스(Codex)와 유럽(EC)에서 모화합물로 설정되어 있다. 세닥산은 국내의 경우 2018년 수입식품 중 감자에 대한 잔류허용기준 신설이 최초 요청되었으며 국내 유통 농산물 중 잔류량에 대한 안전관리 확보를 위해 잔류물의 정의를 모화합물로 규정하고 적부판정을 위한 공정시험법을 개발하고자 하였다. 세닥산의 물리·화학적 특성을 고려하여 아세토니트릴을 이용하여 진탕추출 후 실리카 카트리지를 이용한 정제 조건을 확립하여 LC-MS/MS를 이용한 시험법을 확립하였다. 세닥산의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었고, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.001, 0.005 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배 수준으로 회수율 실험한 결과 평균 회수율(5반복)은 74.5-100.8%이었으며 분석오차는 12.1%이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 본 연구는 국제식품규격위원회 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 적합한 수준임을 검증하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물 중 잔류할 수 있는 세닥산 안전관리를 위한 공정시험법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

Reference

1. Syngenta Crop Protection AG, Sedaxane Korea Import Tolerance Potato. Switzerland (2017).
2. Chemicalize, Sedaxane. Available at https://chemicalize.com/#/calculation (2019).
3. The Electronic Code of Federal Regulations. Available at https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=9ac8127ddce252beb81bbcf4a1eb720b&ty=HTML&h=L&mc=true&r=SECTION&n=se40.26.180_1665 (2017).
4. The Japan Food Chemical Rresearch Foundation. Available at http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=36950 (2015).
5. CODEX Alimentarius International Food Standards. Available at http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=259 (2015).
6. European Commission, EU Pesticides database. Available at http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN (2016).
7. Food Safety Commission of Japan, Risk assessment report-pesticides FS/953 (2014).
8. European food safety authority, Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance sedaxane. *EFSA Journal* **11**, 3057 (2013).
9. United States Environmental Protection Agency, Sedaxane independent laboratory validation-soil (2008).
10. United States Environmental Protection Agency, Sedaxane independent laboratory validation-water (2010).
11. CODEX Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis (2003).
12. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines on standard procedures for preparing analysis method (2016).
13. Rossmann, J., S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel and W. Kirch: Simultaneous determination of most prescribed antibiotics inmultiple urban wastewater by SPE-LC–MS/MS. *J. Chromatogr, B.*, **969**,162-170 (2014).
14. Tomasz, R., Tomasz, T.: A review of recent developments and trends in the QuEChERs sample preparation approach. *Central European Journal of chemistry.,* **13**, 980-1010 (2015).
15. Wong, J.W., Zhang, K., Tech, K., Hayward, D.G., Krynitsky, A.J., Cassias, I., Schenck, F.J., Banerjee, K., Dasgupta, S., Brown, D.: Multiresidue pesticide analysis of Ginseng powders using acetonitrile or acetone based extraction, solid-phase extraction cleanup, and Gas Chromatography Mass Spectrometry/Selective Ion Monitoring (GC-MS/SIM) or Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). *J. Agric. Food Chem.,* **58**, 5884-5896 (2010).