pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 4, pp. 298~305 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.4.298

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

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

임승희 · 도정아* · 박신민 · 박원민 · 윤지혜 · 김지영[1] · 장문익[2]*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[1]서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과, [2]식품의약품안전처 감사담당관실

Development and Validation of an Analytical Method for Determination of Fungicide Benzovindiflupyr in Agricultural Commodities Using LC-MS/MS

Seung-Hee Lim, Jung-Ah Do*, Shin-Min Park, Won-Min Pak, Ji Hye Yoon, Ji Young Kim[1], and Moon-Ik Chang[2]*
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
[1]Import Food Analysis Division, Seoul Regional Food and Drug Administration, Seoul, Korea
[2]Audit and Inspection Office, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
(Received April 25, 2017/Revised May 21, 2017/Accepted July 4, 2017)

ABSTRACT - Benzovindiflupyr is a new pyrazole carboxamide fungicide that inhibits succinate dehydrogenase of mitochondrial respiratory chain. This study was carried out to develop an analytical method for the determination of benzovindiflupyr residues in agricultural commodities using LC-MS/MS. The benzovindiflupyr residues in samples were extracted by using acetonitrile, partitioned with dichloromethane, and then purified with silica solid phase extraction (SPE) cartridge. Correlation coefficient (r^2) of benzovindiflupyr standard solution was 0.99 over the calibration ranges (0.001~0.5 μg/mL). Recovery tests were conducted on 5 representative agricultural commodities (mandarin, green pepper, potato, soybean, and hulled rice) to validate the analytical method. The recoveries ranged from 79.3% to 110.0% and then relative standard deviation (RSD) was less than 9.1%. Also the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.0005 and 0.005 mg/kg, respectively. The recoveries of interlaboratory validation ranged from 83.4% to 117.3% and the coefficient of variation (CV) was 9.0%. All results were followed with Codex guideline (CAC/GL 40) and Ministry of Food and Safety guideline (MFDS, 2016). The proposed new analytical method proved to be accurate, effective, and sensitive for benzovindiflupyr determination and would be used as an official analytical method.

Key words : Benzovindiflupyr, LC-MS/MS, Analytical Method, Agricultural Commodity, Fungicide

벤조빈디플루피르는 곡류, 두류 등 작물의 녹병(rust) 방제에 사용되는 pyrazole carboxamide계의 신규 살균제로 2011년 Syngenta사에서 개발하였다[1]. 작용기작은 미토콘드리아의 전자전달계에 연계된 구연산회로(citric acid cycle)에 관여하는 숙실산탈수소효소(succinate dehyderogenase)를 억제함으로써 녹병균인 *Phakopsora pachyrizi* (Asian soybean rust fungus)를 저해하는 것으로 알려져 있다[2].

2017년 4월 현재, 벤조빈디플루피르에 대한 식품 중 잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)은 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC)에서 대두를 포함한 9종의 식품에 0.01~0.05 mg/kg으로 설정되어 있고, 미국(USA)은 보리 등 23종에 0.01~50.0 mg/kg으로 설정되어 있다[3,4]. 그 외에 유럽연합(EU)은 포도를 포함한 223종에 불검출 기준인 0.01 mg/kg을 포함하여 최대 0.5 mg/

*Correspondenceto: 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 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4211, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: jado@korea.kr
*Correspondence to: Moon-Ik Chang, Audit and Inspection Office, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-1157, Fax: 82-43-719-1150
E-mail: 1004@korea.kr

kg으로, 캐나다(Canada)는 보리 외 147종에 3 mg/kg으로 설정되어 있다[5,6]. 국내의 경우 2016년 대두, 밀에 대해 각각 0.07, 0.1 mg/kg이 최초 잔류허용기준으로 고시(2016. 12. 29. 식품의약품안전처 고시 제154호)되었고, 옥수수에 대하여 2017년 잔류허용기준 신설이 예정되어있다.

벤조빈디플루피르의 잔류물의 정의는 농작물의 잔류시험연구에서 대사산물이 10% 이상 잔류하지 않는 것으로 확인되었고, 독성학적 중요성이 인정되지 않아 식품의약품안전처(식약처)에서는 미국, 유럽, 국제식품규격위원회와 동일하게 모화합물로 규정하였다[7].

벤조빈디플루피르의 농산물 중 잔류시험법에 관한 선행연구는 전 세계적으로 보고된 바가 없다. 그러나 농약이 살포되었을 때 물, 토양 등에 이동되어 잔류될 가능성이 있으므로, 환경매체에 대한 잔류물 분석에 관한 선행 연구를 조사한 결과, 관련 선행연구가 전무한 실정이었다. 따라서 본 연구에서는 벤조빈디플루피르에 대한 국내 기준 신설에 따라 물리화학적 특성 및 잔류물의 정의를 고려한 공정시험법을 개발하고자 하였다. 이에 따라 본 시험법은 현재 기준 신설 식품인 대두, 밀 및 옥수수 외에 향후 수입되는 식품에 사용이 확대될 가능성을 고려하여 모든 식품에서 분석이 가능하도록 식품공전에서 분류하고 있는 농산물 중 이를 대표할 수 있는 농산물 5종(감귤, 감자, 고추, 현미, 대두)에 적용하여 시험법을 개발하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

벤조빈디플루피르(99.4%)의 표준품은 Syngenta (Seoul, Korea)사에서 제공받아 사용하였고, 아세토니트릴(acetonitrile), 디클로로메탄(dichloromethane), 헥산(hexane) 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 염화나트륨은 Wako (Osaka, Japan)사로부터, 여과보조제 및 무수황산나트륨은 Merck (Darmstadt, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 검체는 식품공전 식물성 원료로 분류 된 대표농산물 5종 감귤(과일류), 감자(서류), 고추(채소류), 대두(두류), 현미(곡류) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 −50°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

벤조빈디플루피르 표준품 20.12 mg을 20 mL의 아세토니트릴에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였다. 이를 시료 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 액액분배

검체를 분쇄하여 균질화한 후 10 g(과일류, 채소류, 서류는 약 1 kg을 분쇄한 후 10 g, 곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 10 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고 아세토니트릴 50 mL을 가하여 진탕기에서 10분간 진탕하였다. 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기로 여과보조제 약 10 g을 이용해 흡인여과한 뒤 아세토니트릴 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내려 앞의 여액과 합친 뒤 이를 40°C 이하 수욕 상에서 감압농축하였다. 농축 후 잔류물에 증류수 100 mL를 가하여 녹인 후 500 mL 용량의 분액여두에 옮긴 후 포화식염수 20 mL를 더한 뒤 디클로로메탄 50 mL를 차례로 가하고 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 디클로로메탄 층을 무수황산나트륨에 통과시켜 농축플라스크에 받는 과정을 2회 반복하였다. 이를 40°C 이하의 수욕 상에서 감압농축 후, 잔류물에 아세톤/헥산 혼합용액(10/90, v/v) 10 mL를 가하여 최종부피를 10 mL가 되게하였다. 다만, 지방성 검체(대두, 현미)의 경우 잔류물에 헥산 30 mL를 잔류물에 가하여 녹인 후 250 mL 분량의 분액여두에 옮기고 아세토니트릴 30 mL로 2회 분배하여 추출하였다. 합친 아세토니트릴 층을 40°C에서 감압 농축한 후 잔류물에 아세톤/헥산 혼합용액(10/90, v/v)을 가하여 최종부피를 10 mL가 되게 하였다.

카트리지 정제

실리카(Silica) 카트리지에 헥산 10 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버린 후 고정상 상단이 노출되기 전에 추출액 중 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 유출시켜 씻어 버렸다. 아세톤/헥산 혼합용액(10/90, v/v)을 고정상 상단이 노출되기 전에 10 mL를 유출시켜 버린 뒤 아세톤/헥산 혼합용액(20/80, v/v) 15 mL를 용출시켜 받은 시험액을 감압농축플라스크에 취하였다. 이를 40°C 이하 수욕상에서 감압농축하고 아세토니트릴을 가하여 최종부피 5 mL가 되게 한 뒤 멤브레인 필터(nylon, 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

LC-MS/MS 분석조건

농산물 중 벤조빈디플루피르의 분석을 위해 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Spectrometer, LC-MS/MS)를 사용하였다. 분석용 칼럼은 역상칼럼으로 C_{18} 칼럼을 선택하였고, 기울기 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 수용액을 이동상으로 사용하였다. 대상성분의 이온화법으로는 electrospray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였다. LC-MS/MS의 분석조건은 Table 2와 같다.

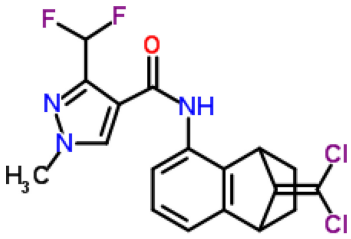
시험법의 검증

확립된 시험법의 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quiantification, LOQ), 회수율(recovery), 재현성(reproducibility)에 대한 유효성을 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003) 및 식약처 식품의 약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)을 토대로 검증하였다[8,9]. 직선성 확인을 위하여 벤조빈디플루피르를 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준 용액 0.005, 0.0025, 0.05, 0.25, 0.5, 1.25 그리고 2.5 ng/μL의 농도범위에 대한 각각의 피크 면적을 이용하여 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였고, 검량선의 결정계수(r^2)를 구하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 확인하기 위하여 무처리 시료에 벤조빈디플루피르의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 확인하였다. 회수율 실험의 처리 농도는 LOQ, 10 × LOQ, 50 × LOQ에 해당하는 농도로 수행하였으며, 각 농산물 검체의 처리구는 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(relative stndard deviation, RSD)를 계산하여 시험법의 정확성, 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한, 서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과와 실험실간 검증(inter-lab)을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

Result and Discussion

기기선정 및 분석조건 확립

벤조빈디플루피르의 화학식은 $C_{18}H_{15}Cl_2F_2N_3O$로 분자 내 플루오르(F) 2개, 염소(Cl) 2개를 포함하므로, 할로겐 화합물에 대한 선택적 검출기인 GC-ECD를 사용하여 분석할 수 있다(Fig. 1). 검출기 ECD는 원자 플루오르(F) 3개, 염소(Cl) 2개 이상일 때, 검출이 가능한 검출기로 벤조빈디플루피르 분자 내 염소(Cl)를 선택적으로 검출할 수 있고, 증기압이 3.2×10^{-9} Pa (25°C)로 고온에서 GC로 분석이 가능하다. 그러나 선택적인 검출기와 휘발성이 있는 화합물임에도 불구하고 분자 내에 존재하는 amide기는 열에 불안정한 특성으로 열분해가 일어날 수 있어 GC분석의 재현성이 떨어질 것으로 사료되어 GC분석보다 HPLC 분석이 더 적합할 것으로 판단하였다. 벤조빈디플루피르는 분자 내에 이중 결합이 conjugation 되어 있고, 방향족 화합물인 벤젠고리를 포함하고 있어 UV-Vis 영역에서 흡광도를 나타내며, 실제 비공유 전자쌍과 이중결합의 전자 전이에 의해 특정 파장대를 흡수하는 화합물로 확인되었다. 최적 흡광 파장을 확인하기 위하여 파장 210~360 nm에서 스캔한 결과 230 nm를 최적의 흡광 파장으로 확인하였다. 그러나 HPLC-UVD에서 확보한 정량한계는 0.02 mg/kg로 고감도의 정량한계를 확보할 수 없었다. 이에, 시료 중 미량의 농도를 분석하기 위한 정량한계 확보와 간섭물질에 영향을 받지 않아 선택성이 높은 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선택하였다[8]. 분석용 칼럼은 벤조빈디플루피르의 Log P_{ow}가 4.3으로 비극성인 특성을 고려하여 극성 물질에서 비극성 물질까지 폭넓게 분리가 가능한 C_{18} 칼럼을 선택하였고, 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 수용액을 이동상으로 사용하는 기울기 용리 방식으로 분석하였다. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 벤조빈디플루피르 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 각 대상성분의 이온화법으로는 electro-spray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였고 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 평균질량이 398.2 (exact mass: 397.05)인 벤조빈디플루피르 표준용액(0.1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 $[M+H]^+$형태인 398.4 mass 값을 확인하였다. 이때 cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 20 V에서 최대의 peak 강도가 나타남을 확인하였다. 최적화된 cone voltage상태에서 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였다. Collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 2에 나타내었다.



$C_{18}H_{15}Cl_2F_2N_3O$

M.W. 398.2

Fig. 1. Structure of benzovindiflupyr.

추출 및 분배조건 확립

벤조빈디플루피르는 산성 및 중성조건에서 지용성으로 존재하고 염기조건에서 수용성으로 존재하며 Log P_{ow} 값

Table 1. Analytical conditions for the determination of benzovindiflupyr

Condition	Content		
Instrument	LC/MS/MS		
Chromatographic separation			
Column	XBridge C_{18} (2.1 × 100 mm, 3.5 μm)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Oven temp.	40°C		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in acetonitrile B: 0.1% formic acid in water		
- Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	20	80
	1.0	20	80
	6.0	80	20
	8.0	80	20
	10.0	20	80
	13.0	20	80
MS/MS condition			
Capillary	0.91 kV		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	500°C		
Desolvation gas flow	996 L/hr		
Cone gas flow	147 L/hr		

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

Compound	Molecular weight	Exact mass	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1] (eV)
Benzovindiflupyr	397.2	397.05	398	343[2]	18
				378	14

[1]Collision Energy
[2]Quantification ion

이 4.3인 비극성 화합물이다. 그러나 시료는 수분을 함유하고 있어 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 사용할 경우 시료 내부의 침투성이 낮아 충분한 추출이 되지 않을 것으로 판단되었다. 따라서 수용성 유기용매를 선정하여 내부 침투를 용이하게 할 수 있도록 추출조건을 확립하였다. 대표적 수용성 유기용매인 아세톤은 비극성 간섭물질의 추출률이 비교적 아세토니트릴보다 높은 특성을 갖고, 농산물 시료인 현미, 대두 및 고추 등의 색소인 chlorophyll의 추출률이 높을 것으로 판단되어 다른 수용성 유기용매인 아세토니트릴을 추출용매로 선정하였다[10,11]. 추출액은 비극성 벤조빈디플루피르와 극성 간섭물질 분리를 위해 분배 용매를 선정하여 액-액 분배를 적용하였다. 분배용매 선정은 벤조빈디플루피르의 물리화학적 특성과 용매의 극성지수 및 용해도의 차이를 통해 선정할 수 있었다. 분배용매로 헥산과 디클로로메탄은 극성지수가 각각 0.1, 3.1로 비극성이며, 두 용매 모두 분배용매로 가능할 것으로 생각되었다[12]. 그러나 용매에 대한 용해도를 살펴봤을 때, 디클로로메탄(450 g/L)이 헥산(270 g/L)보다 용해도가 높아 분배효율이 높을 것으로 판단되어 디클로로메탄을 분배 용매로 선정하였다. 따라서 최종 추출 및 분배는 아세토니트릴로 추출 후, 시료 추출액의 수분층과 디클로로메탄층의 명확한 분리를 위해 포화식염수를 첨가하여 분배효율을 높인 뒤, 디클로로메탄을 이용하여 분배 하였다. 다만 곡류와 두류 등 유지함량이 높은 검체는 헥산/아세토니트릴 추가 분배법을 적용하여 유지 등 비극성 불순물을 제거하였다. 그 결과, 대표농산물 5종에 대하여 90% 이상의 높은 효율을 보였다(Table 3).

Table 3. Recovery of dichloromethane for benzovindiflupyr extract effciency

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery (%) Benzovindiflupyr
Mandarin	0.005	96.2
Potato	0.005	108.1
Green pepper	0.005	77.5
Soybean	0.005	107.1
Hulled rice	0.005	83.4

카트리지를 이용한 정제법 확립

분배 추출액은 이온성을 띄지 않는 벤조빈디플루피르의 손실을 최소화하고, 보다 우수한 정제효과를 얻으며 흡착제에 대한 친화도의 차이를 이용하는 흡착크로마토그래피에 의한 정제가 효율적일 것으로 판단되었다[11]. 흡착제로는 florisil, silica-gel, alumina, 활성탄 등이 사용되며, 보편적으로 florisil과 silica-gel이 사용되어진다[13,14]. Alumina와 활성탄은 흡착력이 매우 강하여 대상물질과 간섭물질을 분리하기에 적합하지 않다고 판단하여 florisil과 silica-gel을 이용하여 정제조건을 확립하였다.

벤조빈디플루피르의 극성도($LogP_{ow}$값 4.3)와 용매의 용해도를 고려하여 비교적 비극성 용매 조합인 에틸아세테이트/헥산과 아세톤/헥산 정제효율을 비교하였다. 두 정제용매조합에서 florisil과 silica 카트리지 모두 회수율이 낮아 정제용매로 사용할 수 없을 것으로 판단하였으나, 두 카트리지 중 silica가 조금 더 높은 회수율을 보여 silica 카트리지를 우선 적용하였다(Table 4).

용매 조합을 변경하여 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액으로 정제를 한 결과, 97.1%의 높은 회수율을 보였다. 그러나 용출구간을 살펴보았을 때, 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액(5/95, v/v) 구획과 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액(10/90, v/v)의 구획에서 용출이 되었다. 이는 위의 결과인 에틸아세테이트/헥산 혼합액의 용매조합과 비

Table 4. Comparisons of SPE cartridge for benzovindiflupyr

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	Benzovindiflupyr	
			Florisil (%)	Silica (%)
Ethyl acetate/ *n*-Hexane	100	1 (loading 5 mL)	-	-
	5/95	2 (10 mL)	-	-
	10/90	3 (10 mL)	-	-
	20/80	4 (10 mL)	69.2	-
	30/70	5 (10 mL)	7.0	14.6
	40/60	6 (10 mL)	-	69.1
Total			76.2	83.7
Acetone/ *n*-Hexane	100	1 (loading 5 mL)	-	-
	5/95	2 (10 mL)	-	-
	10/90	3 (10 mL)	70.2	-
	20/80	4 (10 mL)	2.1	78.2
	30/70	5 (10 mL)	-	-
	40/60	6 (10 mL)	-	-
Total			72.3	78.2

Table 5. Effects of silica cartridge for benzovindiflupyr elution efficiency

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fractions	Benzovindiflupyr
			Silica(%)
Ethyl acetate/ Dichloromethane	100	1 (loading 5 mL)	-
	5/95	2 (10 mL)	81.8
	10/90	3 (10 mL)	15.3
	20/80	4 (10 mL)	-
	30/70	5 (10 mL)	-
	40/60	6 (10 mL)	-
Total			97.1

교하였을 때, 벤조빈디플루피르는 헥산의 용출강도보다 디클로로메탄에서 용출강도가 상대적으로 높아 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액의 용매조합에서 빠르게 용출 된 것이라 판단하였다. 그리하여 분획을 세분화할 경우 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액(5/95, v/v)보다 높은 구획에서 용출될 가능성이 있어, 카트리지를 씻어버릴 용매 선택이 어려울 것으로 판단하였다(Table 5).

따라서, 회수율은 높이며 로딩 후 카트리지를 씻어버릴 용매와 용출시켜 받을 용매의 구획을 명확하게 하기 위해 용매 조합을 변경하기로 하였다. 위의 정제 실험의 혼합액 에틸아세테이트(4.4)/디클로로메탄(3.9)과 아세톤(5.1)/헥산(0.1)의 극성지수를 비교하였을 때, 아세톤/헥산의 혼합액이 비극성인 벤조빈디플루피르와 극성인 간섭물질을 분리해내기에 더 적절한 것으로 사료되었다. 하지만 벤조빈디플루피르의 용매에 대한 용해도 측면에서 볼 때, 아세톤/헥산 혼합액과 에틸아세테이트/디클로로메탄 혼합액의 정제용매를 각각 사용할 때, 분배 추출액을 재용해하는 헥산(270 g/L)은 디클로로메탄(350 g/L) 보다 용해도가 낮아 분배 추출액에서 벤조빈디플루피르가 재용해가 완벽히 되지 않았을 것이라 판단하였다. 따라서 분배 추출액의 재용해 용매를 헥산과, 상대적으로 극성인 용매를 소량 포함하더라도 용해도를 높일 수 있는 아세톤(350 g/L)을 혼합하여 재용해 한 뒤 정제 실험을 실시하였다(Table 6). 그 결과, 아세톤/헥산 혼합액(20/80, v/v) 분획에서 98.4%의 높은 회수율을 보여 아세톤/헥산 혼합액을 정제용매로 선정하였다. 이에 따라 분획을 세분화하고 용출용매를 늘려 세분화 한 결과 아세톤/헥산 혼합액(20/80, v/v) 15 mL에서 가장 높은 회수율을 보였다(Table 7). 벤조빈디플루피르의 최종 정제법은 아세톤/헥산 혼합액(10/90, v/v)으로 재용해한 추출액 5 mL를 카트리지에 유출시킨 후 아세톤/헥산 혼합액(10/90, v/v) 10 mL로 씻어 버리고 아세톤/헥산 혼합액(20/80, v/v) 15 mL로 용출시켜 받는 방법으로 확립하였다. 이 방법으로 간섭물질을 효과적으로 제거하고, 분석 대상 물질의 손실은 최소화 할 수 있었다.

Table 6. Effects of silica cartridge for benzovindiflupyr elution efficiency

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	Benzovindiflupyr
			Silica(%)
Acetone/ *n*-Hexane	10/90	1 (loading 5 mL)	-
	10/90	2 (10 mL)	-
	20/80	3 (10 mL)	98.4
	30/70	4 (10 mL)	-
	40/60	5 (10 mL)	-
Total			98.4

Table 7. Comparisons of elution solvent ratio on benzovindiflupyr elution efficiency

Compound	Fractions	Elution efficiency (%)			
		Solvent ratio (v/v)[1)]			
		10/90	20/80	30/70	40/60
Benzovindiflupyr	1 (5 mL)	-	-	79.6	94.3
	2 (5 mL)	-	87.8	16.4	-
	3 (5 mL)	-	9.8	-	-
	4 (5 mL)	-	-	-	-
Total		-	97.6	96.0	94.3

[1)]Solvent ratio of acetone/n-hexane

시험법의 검증

선택성 및 직선성

벤조빈디플루피르의 선택성(selectivity)은 표준용액, 무처

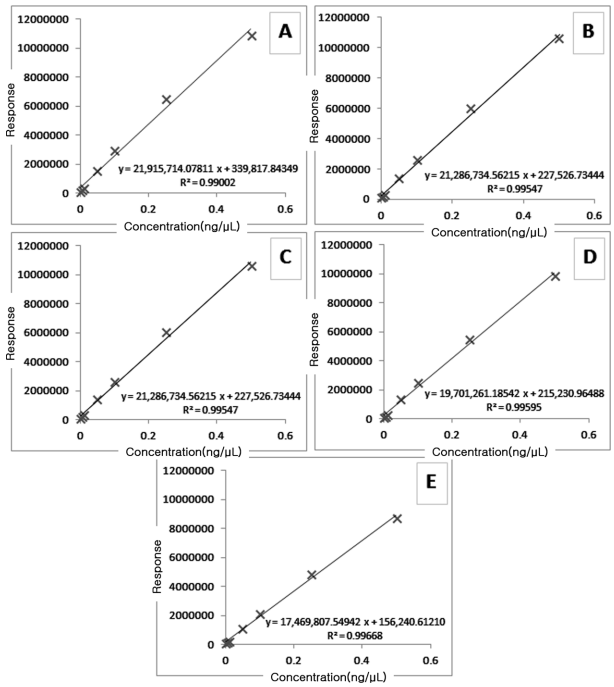


Fig. 2. Matrix-matched calibration curves of corresponding to: benzovindiflupy in mandarin (A), potato (B), green pepper (C), soybean (D) and hulled rice (E).

리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하였다. 무처리 시료 중 벤조빈디플루피르의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 간섭물질은 검출되지 않아 본 시험법은 대상물질을 분석하는 것에 있어 높은 분리능과 선택성을 확보하였다.

개발된 시험법의 직선성(linearity)을 확인하기 위해 표준원액을 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 그리고 0.5 μg/mL으로 제조한 후 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 모든 농산물 시료 표준용액에서 결정계수(r^2) 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 2).

검출한계와 정량한계

벤조빈디플루피르의 검출한계는 기기의 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 3이상으로 결정했다. 대표 농산물 5종에 대한 분석기기의 최소 검출량은 0.0025 ng으로 이에 따른 검출한계는 0.0005 mg/kg이었고, 정량한계는 신호 대 잡음비(S/N ratio) 10이상으로 계산할 경우 0.005 mg/kg이었다. 검출한계 및 정량한계는 아래에 나타낸 계산식에 따라 계산되었다.

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

$$= 0.0025(\text{ng}) \times \frac{1}{10(\text{g})} \times \frac{5(\text{mL})}{5(\mu\text{L})} \times 2 \quad = 0.0005$$

Table 8. Inter-laboratory validation results of analytical method for benzovindiflupyr residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD (%)		Recovery[3] (%)	CV[4] (%)	LOQ (mg/kg)
		Lab[1]	Lab[2]			
Mandarin	0.005	96.7 ± 2.3	87.6 ± 3.3	92.2	3.0	0.005
	0.05	109.5 ± 2.9	89.9 ± 3.1	99.7	3.0	
	0.25	109.0 ± 3.9	83.6 ± 1.0	96.3	2.5	
Potato	0.005	108.1 ± 6.2	92.6 ± 3.2	100.4	4.7	
	0.05	106.7 ± 5.4	105.5 ± 5.0	106.1	4.9	
	0.25	109.7 ± 2.1	104.9 ± 3.1	107.3	2.4	
Green pepper	0.005	79.3 ± 5.8	85.5 ± 8.0	82.4	8.4	
	0.05	90.3 ± 9.1	89.5 ± 7.0	89.9	9.0	
	0.25	99.1 ± 2.1	84.6 ± 1.8	91.9	2.1	
Soybean	0.005	110.0 ± 2.4	83.4 ± 5.1	96.7	3.9	
	0.05	108.8 ± 2.5	94.1 ± 3.1	101.5	2.8	
	0.25	100.4 ± 2.6	88.3 ± 5.1	94.4	4.1	
Hulled rice	0.005	86.0 ± 4.8	107.6 ± 6.9	96.8	6.0	
	0.05	100.7 ± 8.5	117.3 ± 8.2	109.0	7.7	
	0.25	91.1 ± 2.0	97.8 ± .6	94.5	4.6	

[1]Ministry of Food and Drug Safety
[2]Seoul Regional Food and Drug Administration
[3]Recovery average of inter-laboratory
[4]Coefficient of variation of inter-laboratory

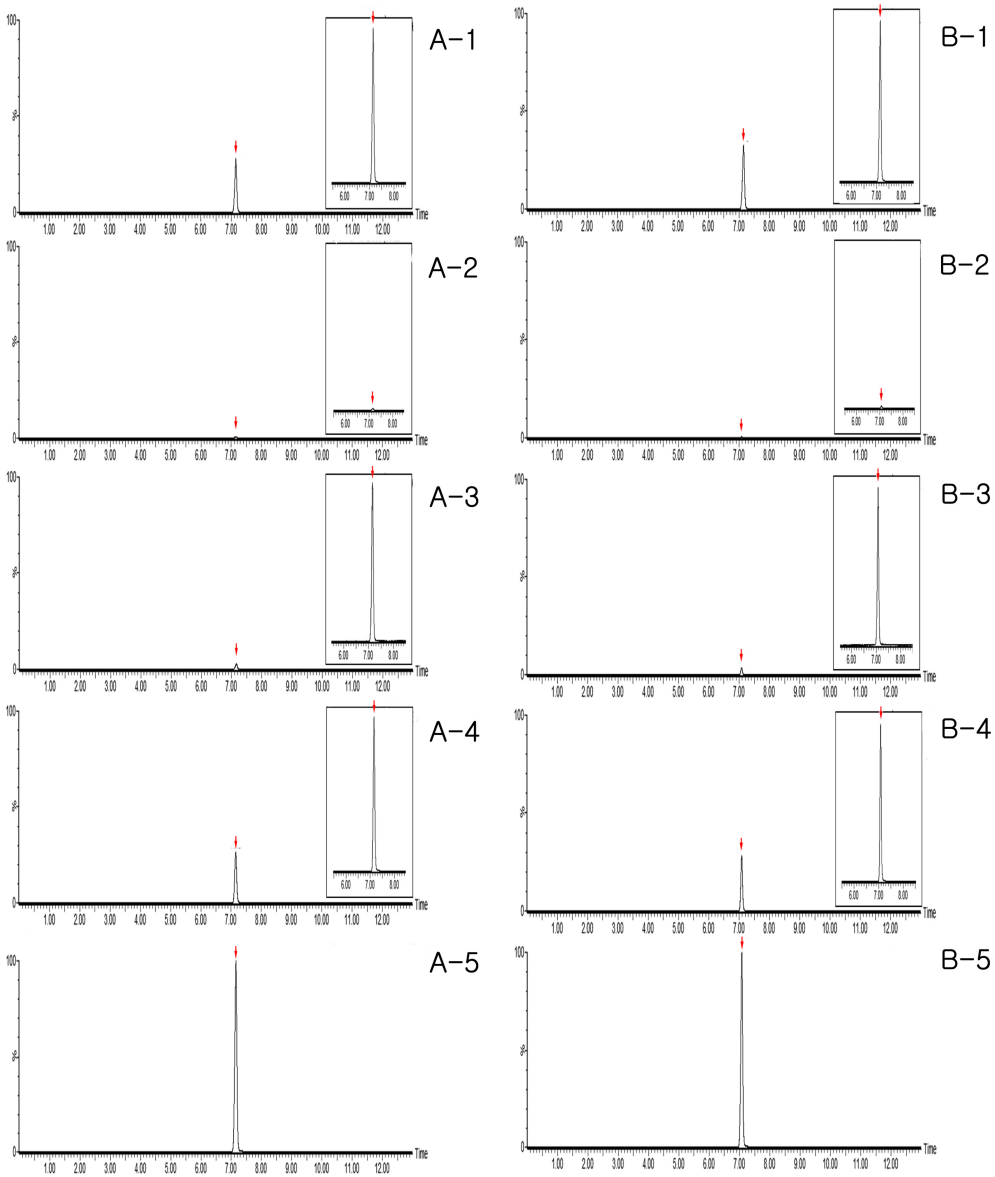


Fig. 3. Representative MRM(quantification ion) recovery chromatogram of Benzovindiflupyr corresponding to: green pepper (A), soybean (B), standard solution at 0.05 mg/kg (1), control (2), spiked at 0.005 mg/kg (3), spiked at 0.05 mg/kg (4) and spiked at 0.25 mg/kg (5).

정량한계(mg/kg)

$$= \text{최소검출량(ng)} \times \frac{1}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{최종희석부피 (mL)}}{\text{시료 주입량 (μL)}} \times \text{희석배수}^{*}$$

$$= 0.025\text{(ng)} \times \frac{1}{10\text{(g)}} \times \frac{5\text{(mL)}}{5\text{(μL)}} \times 2 = 0.005$$

*희석배수 = 희석부피(mL)/분취량(mL)

실험실 내 검증

시험법의 LOQ, 10 × LOQ, 50 × LOQ 농도(0.005, 0.05 및 0.25 mg/kg)로 5회 반복 회수율 실험을 통해 시험법의 정확성, 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 실험 결과 평균 회수율은 79.3~110.0%였으며, 상대표준편차가 9.1% 이하로 확인되었다. 상대표준편차 적합 기준은 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)의 처리농도 > 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg일 때 30%, > 0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 20%보다 낮고, 식약처 식품의약품안전평가원의 '식품등 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, ≤ 1000 μg/kg일 때, 회수율 범위 70~120%, CV값 18%로 가이드라인에 부합한 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구는 정확성, 정밀성 및 재현성에 대해 두 가이드라인에 부합하는 것으로 평가되었다(Table 8)[8,9]. LC-MS/MS를 이용하여 농산물 5종 중 고추와 지방

성 검체 대두에 대한 벤조빈디플루피르의 회수율 크로마토그램은 Fig. 3에 나타내었다.

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법은 서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과와 실험실간 검증을 수행하여 시험법의 유효성을 검증하였다. 개발한 시험법을 서울지방식품의약품안전청에 동일하게 제공하여 분석한 회수율 및 표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 회수율은 83.4~117.3%, 표준편차는 8.2% 이하였다. 두 실험실간의 평균 회수율은 82.4~109.0%이고, 변이계수(CV %)는 9.0% 이하로 확인하였다. 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, ≤ 1000 μg/kg의 25%에 만족하므로 모든 처리농도에서 부합한 것을 확인하였다(Table 8)[8,9]. 따라서 본 연구에서 확립한 시험법은 식품공전에 수록하여 공정시험법으로 적합할 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년도 식품의약품안전평가원 “2016년 농약 잔류허용기준 신규 설정 및 개정을 위한 안전관리 근거 마련 연구(16161위생안009)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

벤조빈디플루피르는 곡류, 두류 등 작물의 녹병(rust) 방제에 사용되는 pyrazole carboxamide계 신규 살균제로 국내에서는 2016년 대두와 밀에 대하여 잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)이 최초 신설되었다. 따라서 본 연구에서는 기준신설에 따른 농산물 중 이를 분석하기 위한 공정시험법을 개발하였다. 벤조빈디플루피르의 잔류물의 정의는 모화합물로, 벤조빈디플루피르의 물리화학적 특성을 고려하여 이를 검체에서 효율적으로 추출하기 위한 추출조건, 불순물을 효과적으로 정제하기 위한 액-액 분배조건과 정제조건을 확립하였다. 개발된 시험법의 검출한계, 정량한계, 선택성, 직선성, 및 회수율에 대한 검증을 통해 공정시험법으로 유효성을 입증하기 위해 실험실내 및 실험실간 검증을 수행 한 결과 회수율은 79.3~110.0%였고, 분석오차는 9.1% 이하이며, 실험실간 검증 결과는 83.4~117.3%, 변이계수(CV)는 9.0%로 나타났다. 본 연구 결과는 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)과 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)에 만족하는 것으로 확인되었으므로 농산물 중 벤조빈디플루피르의 잔류검사를 위한 공정시험법으로 사용되기에 적합할 것으로 판단된다.

Reference

1. Walter, H., Gribkov, D., Tobler, H.: Abstracts of Papers, 248th. ACS National Meeting & Exposition, San Francisco, CA, United States, 10-14 AGRO-621 (2014).
2. Walter, H., Guicherit, E., Rambach-Jankowski, O., Dale, S.: Abstracts of Papers, 248th. ACS National Meeting % Exposition, San Francisco, CA, United States, 10-14 AGRO-730 (2014).
3. CODEX, Pesticide Residue in Food and Feed. Available from http://www.fao.org/fao~sho~codexalimentarius/standards/pestres/pesticide/enAssessed (2015).
4. EPA, United states Environmental Protection Agency. Benzovindiflupyr; Pesticide Tolerances. Federal Register, 80, 59627-59634 (2015).
5. EU, European Commission. Amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for abamectin, acequinocyl, acetamiprid, benzovindiflupyr, bromoxynil fludioxonil, fluopicolide, fosetyl, mepiquat, proquinazid, propamocarb, prohexadione and tebuconazole in or on certain products. *Official Journal of the European Union*, **24**, 46-103 (2016).
6. Health Canada: Benzovindiflupyr. PMRL (Proposed Maximum Residue Limit), 1-3 (2015).
7. MFDS.: Ministry of Food an Drug Safety, Cheongju, Korea (2016).
8. CAC (Codex Alimentarius Commission). Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rome, Italy (2003).
9. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation: Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods. Cheongju, Korea (2016).
10. Pizzutti I.R., Kok A.D., Hiemstra M., Wickert C., and Prestes O.D.: Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-teandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*., **1216**, 4539-4552 (2009).
11. Kown C.H., Chang M.I., Im M.H., Choi H., Jung D.I., Lee S.C., Yu J.Y., Lee Y.D., Lee J.O., and Hong M.K.: Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *J. Anal. Sci. Technol*., **21**, 518-525 (2008).
13. Lee YD.: *Practical book of Korea Food Code pesticide residue analysis method*, 4th ed. MFDS, Cheongju, Korea, 78-79 (2013).
14. US FDA: Pesticide Analytical Manual, Multiresidue Methods, 3rd ed. US Food and Drug Administration, U.S.A. (1999).
15. AOAC: Pesticide and industrial chemical residues, In Official method of analysis, 17th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA. (2000).