pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 6, pp. 373~384 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.6.373

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

농산물 중 살균제 Fluoxastrobin의 시험법 개발 및 유효성 검증

이소은[1] · 이수정[1] · 구선영[1] · 박채영[1] · 신혜선[1] · 강성은[1] · 이정미[1]* · 정윤미[2] · 장귀현[1] · 문귀임[1]
[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[2]식품의약품안전처 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Development and Validation of an Analytical Method for Fungicide Fluoxastrobin Determination in Agricultural Products

So Eun Lee[1], Su Jung Lee[1], Sun Young Gu[1], Chae Young Park[1], Hye-Sun Shin[1], Sung Eun Kang[1], Jung Mi Lee[1]*, Yun Mi Chung[2], Gui Hyun Jang[1], Guiim Moon[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]*Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju, Korea*

(Received August 29, 2022/Revised October 18, 2022/Accepted October 28, 2022)

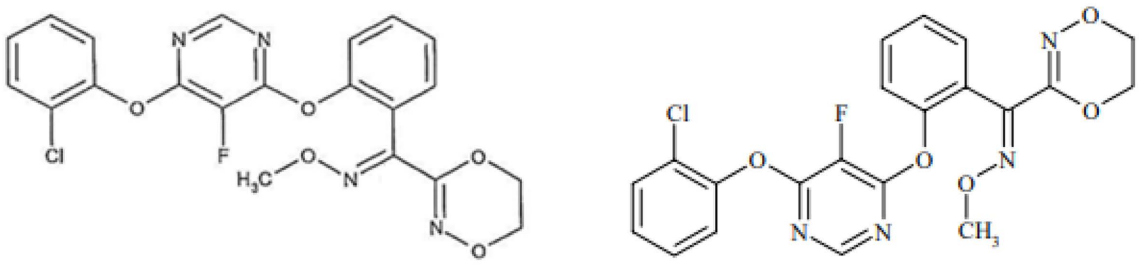
ABSTRACT - Fluoxastrobin a fungicide developed from *Strobilurus* species mushroom extracts, can be used as an effective pesticide to control fungal diseases. In this study, we optimized the extraction and purification of fluoxastrobin according to its physical and chemical properties using the QuEChERS method and developed an LC-MS/MS-based analysis method. For extraction, we used acetonitrile as the extraction solvent, along with $MgSO_4$ and PSA. The limit of quantitation of fluoxastrobin was 0.01 mg/kg. We used 0.01, 0.1, and 0.5 mg/kg of five representative agricultural products and treated them with fluoxastrobin. The coefficients of determination (R^2) of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer were > 0.998. The average recovery rates of fluoxastrobin (n=5) and fluoxastrobin Z isomer were 75.5–100.3% and 75.0–103.9%, respectively. The relative standard deviations (RSDs) were < 5.5% and < 4.3% for fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer, respectively. We also performed an interlaboratory validation at Gwangju Regional Food and Drug Administration and compared the recovery rates and RSDs obtained for fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer at the external lab with our results to validate our analysis method. In the external lab, the average recovery rates and RSDs of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer at each concentration were 79.5–100.5% and 78.8–104.7% and < 18.1% and < 10.2%, respectively. In all treatment groups, the concentrations were less than those described by the 'Codex Alimentarius Commission' and the 'Standard procedure for preparing test methods for food, etc.'. Therefore, fluoxastrobin is safe for use as a pesticide.

Key words: Fluoxastrobin, Fluoxastrobin Z isomer, LC-MS/MS, Fungicide, Agricultural Products

플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin)은 *Strobilurus* 속의 버섯에서 추출한 천연물을 기반으로 2005년 Bayer Crop Science 사에서 개발한 살균제로서 야채, 곡물 및 과일에 영향을 미치는 대부분의 곰팡이 질병으로부터 보호하기 위해[1,2] 2-chlorophenoxy-5-fluoropyridinyloxy 사이드체인 최적화와 약리작용단의 methoximino dihydro-dioxazinyl를 조합하여 개발하였다[3]. 국내에서는 이러한 특성을 가진 strobilurin계 살균제가 다양한 제형의 형태로 감귤, 오이, 딸기 등에 발생하는 다양한 식물병의 방제를 위하여 사용되고 있다[1]. 특히 플루옥사스트로빈은 진균이나 기타 진핵세포 내부의 미토콘드리아 막에 위치하는 시토크롬 *bc*1 복합체 Ⅲ에서 Qo-부위 기능에 영향을 미치어 생물의 호흡을 억제하는 작용기작[3-6]으로 주로 자낭균류 진균, 밀껍질마름병 등의 곰팡이성 질병에 우수한 살균 효과를 갖는다[3,7]. 또한 플

*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: mythlim@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.



Fluoxastrobin　　Fluoxastrobin Z isomer

Fig. 1. Molecular structures of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer.

루옥사스트로빈은 물리·화학적 특성으로 두 가지 이성질체가 포함되어 있으며 하나는 주요 살균 활성 역할을 수행하는 E 이성질체이고 다른 하나는 훨씬 낮은 수준(약 2%)으로 존재하는 Z 이성질체로[2,4] 두 이성질체 모두 주요 잔류물임을 확인하였으며[8,9], 분자 구조는 Fig. 1과 같다.

유럽(EC)[10], 미국(EPA)[11], 일본(JFCRF)[12]에서는 플루옥사스트로빈과 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 합으로 정의하고 있으며, 유럽에서는 감자 등 90품목에 대하여 0.01-0.5 mg/kg[10], 미국에서는 대두 등 19품목에 대하여 0.01-60 mg/kg[11], 일본에서는 감자 등 3품목에 대하여 0.01-2 mg/kg[12]의 잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)이 설정되어 있다. 코덱스(CODEX)와 국내에는 잔류허용기준이 설정되어 있지 않음에 따라 추후 국내·외 수입 및 재배 식품 중 플루옥사스트로빈에 대한 잔류허용기준 준수 여부 확인을 위한 시험법 마련이 필요한 실정이다.

플루옥사스트로빈 시험법에 관한 연구로는 Sun 등[9]이 양배추와 오이, 포도 등 8품목의 농산물을 QuChERS법을 이용하여 추출, 정제 후 UHPLC-DAD를 이용하여 분석한 연구가 보고되고 있다. 또한 Wang 등[13]이 오이와 토양 중 플루옥사스트로빈, 플루옥사스트로빈 Z 이성질체 및 테부코나졸을 물-아세토니트릴로 추출하여 C_{18} 카트리지로 정제한 후 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tamdem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)를 이용하여 동시 분석한 연구 보고가 있다.

하지만 이들의 연구는 5 mg/kg 이하의 정량한계 수준으로 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)[14]과 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[15]에 만족하는 분석법이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 수입 농산물과 국내 유통 농산물의 잔류농약 검사를 위하여 두류(대두), 곡류(현미), 서류(감자), 과일류(감귤), 채소류(고추)를 대상으로 한 공정시험법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

플루옥사스트로빈(99.7%) 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체(98.1%) 표준품은 JRF America에서 제공받아 사용하였다. 아세토니트릴(acetonitrile)은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 염화나트륨은 Wako (Osaka, Japan), 무수황산나트륨은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, 포름산은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. PSA (Primary Secondary Amine)는 Agilent Technologies (CA, Santa Clara, USA)에서 구입하였고, GCB (Graphitized Carbon Black)와 C_{18} (Oxtadecyl)은 Waters (Leinster, Ireland)에서 구입하였다. PTFE 멤브레인 필터(0.2 μm × 13 mm)는 GVS (Aola Predosa, Italy)에서 구입하였으며, 시료는 식품공전에서 규정하는 대표 농산물 5품목 현미(곡류), 대두(두류), 감자(서류), 감귤(과일류), 고추(채소류) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체 표준품을 각각 20.06 mg, 20.38 mg씩 칭량하여 20 mL의 아세토니트릴에 용해하여 1,000 mg/L의 표준원액을 조제하였다. 각 표준원액 1,000 mg/L을 혼합하여 100 mg/L의 혼합표준용액이 되게 희석하였다. Matrix-matched calibration을 위해 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025 mg/L의 농도가 되도록 시료의 무처리 추출물로 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다 (Table 1). 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류 및 두류 등 건조 시료의 경우 물 5 mL를 넣고 30분간 방치) 아세토니트릴 20 mL를 넣어 10분간 강하게

Table 1. Scheme for preparing matrix-matched calibration standards

Calibration levels		Matrix-matched calibration standards (mg/L)					
		0.001	0.0025	0.005	0.01	0.025	0.05
Sample extract		900 μL	900 μL	900 μL	900 μL	900 μL	900 μL
MMS[1] (mg/L)	0.5	-	-	-	-	-	100 μL
	0.25	-	-	-	-	100 μL	-
	0.1	-	-	-	100 μL	-	-
	0.05	-	-	100 μL	-	-	-
	0.025	-	100 μL	-	-	-	-
	0.01	100 μL	-	-	-	-	-
Total volume		1,000 μL	1,000 μL	1,000 μL	1,000 μL	1,000 μL	1,000 μL

[1] Matrix-matched standard solution

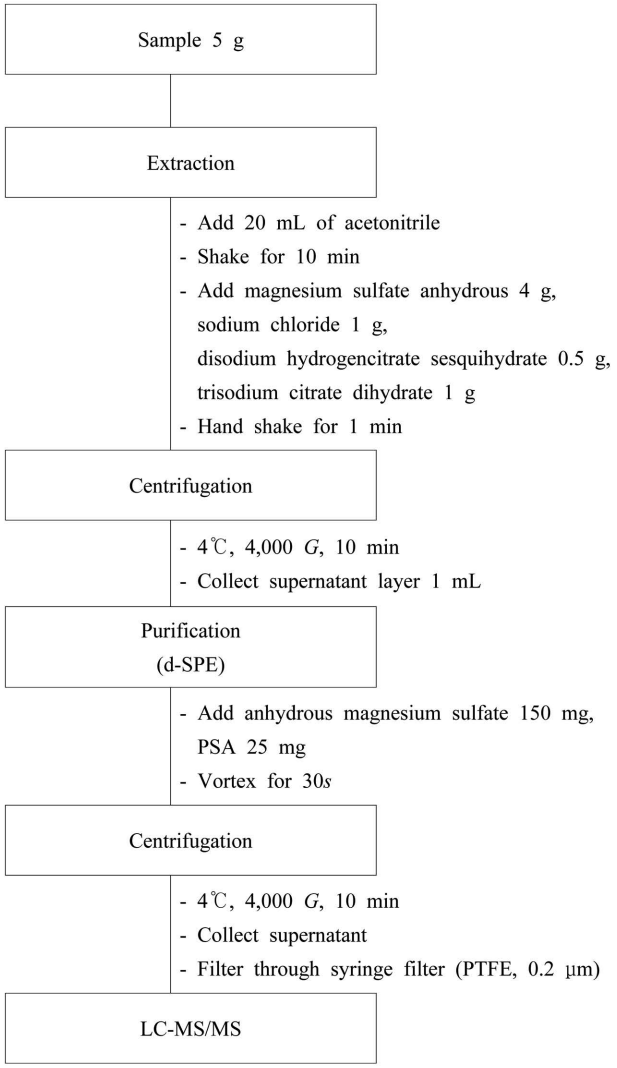


Fig. 2. Flow chart for fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer analysis.

흔들어 추출한다. 추출물에 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g을 넣어 1분간 흔들고 4°C, 4,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상층액 1 mL를 취한다. 무수황산마그네슘 150 mg과 1차 2차 아민 25 mg이 미리 담겨져 있는 2 mL 원심분리관에 상층액 1 mL를 넣고 30초간 와류교반기 등을 이용하여 충분히 혼합한 후 이를 4°C, 4,000 ×g에서 10분간 원심분리 한 후 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과하여 시험용액으로 한다(Fig. 2).

LC-MS/MS 분석조건

플루옥사스트로빈과 플루옥사스트로빈 Z 이성질체를 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 사용하였다. 분석용 컬럼은 ACQUITY UPLC®BEH-C_{18} (2.1 mm I.D. × 100 mm L, 1.7 μm)을 선택하였으며 컬럼 온도는 40°C를 유지하였다. 이동상으로는 0.1% 포름산 함유 물과 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴을 사용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 electrospray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하여 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 선택한 후 정량이온(quantification ion) 및 정성이온(qualification ion)을 선택하여 multiple reaction monitoring (MRM) 조건을 확립하였다. LC-MS/MS 분석조건은 Table 2, 3과 같다.

시험법 유효성 검증

본 연구에서는 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)[14]과 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[15]에 근거하여 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery), 정확성(accuracy), 반복성(repeatability), 재현성(reproducibility)에 대해 유효성을 검증하였다. 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 혼합표준원액을 0.001-0.05 mg/L 농도가 되도록 검체의 무처리 추출액으로 희석하였다. 각 농도 범위에 대한 peak의 면적을 이용하여 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였고, 검량선의 결정

계수(coefficient of correlation, R^2)를 구하였다. 검출한계는 기기의 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 3 이상, 정량한계는 10 이상되는 최소검출농도를 구하고 시험법의 회석배수를 고려하여 계산한 검출한계와 정량한계의 산출식은 아래와 같다.

검출한계 (mg/kg) = 최소기기검출농도 (mg/L, S/N ≥ 3) × 회석배수[1] = 0.00075 mg/kg × (20 mL/5 g) = 0.003 mg/kg (1)

정량한계 (mg/kg) = 최소검출농도 (mg/L, S/N ≥ 10) × 회석배수[1] = 0.0025 (mg/L) × (20 mL × 5 g) = 0.01 mg/kg (2)

[1]회석배수 = 회석부피(mL)/분취량(mL)

시험법의 정확성 및 정밀성을 검증하기 위해 무처리 시료에 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체 혼합표준용액을 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배에 해당하는 농도로 처리하였으며 각각의 처리수준에 대하여 5반복으로 실험을 수행하여 평균 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 평가하였다. 시험법의 재현성은 광주지방식품의약품안전청과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 진행하여 시험법의 유효성을 확인할 수 있었다.

Table 2. Analytical conditions for the determination of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer

Condition	Content		
Instrument	LC : Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) MS/MS : Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA)		
Chromatographic separation			
Column	ACQUITY UPLC®BEH-C_{18} (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.7 μm)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	2 μL		
Column 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	50	50
	1.0	50	50
	5.0	60	40
	7.0	100	0
	8.0	100	0
	8.5	50	50
	10.0	50	50
MS/MS condition			
Capillary voltage	1.0 kV		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	500°C		
Desolvation gas flow	650 L/h		
Cone gas flow	150 L/h		

Results and Discussion

최적기기분석조건 확립

플루옥사스트로빈은 두 이성질체의 Log P_{ow} 값이 2.85로 동일하며 극성-중간극성을 띄는 화합물로 비교적 선택성이 높다. 낮은 농도 수준에서도 높은 분석 감도를 확보하며 정량한계(LOQ) 0.01 mg/kg 수준을 확보할 수 있는 LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였다. 분석용 컬럼은 극성물질과 비극성 물질 모두 분리가 가능한 C_{18} 역상컬럼을 선택하였고(Fig. 3),

0.1% 포름산 함유 수용액과 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다(Table 2). 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 플루옥사스트로빈 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 대상성분의 이온화법으로는 electro-

Table 3. MRM (multiple reaction monitoring) conditions of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer for analysis in ESI positive mode

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1] (eV)
Fluoxastrobin	5.33	458.8	458.1	459	427[2]	15
	5.33	458.8	458.1	459	188	33
	5.33	458.8	458.1	459	102	57
Fluoxastrobin Z isomer	6.35	458.8	458.1	459	427[2]	15
	6.35	458.8	458.1	459	188	33
	6.35	458.8	458.1	459	102	57

[1] Collision energy.
[2] Quantification ion.

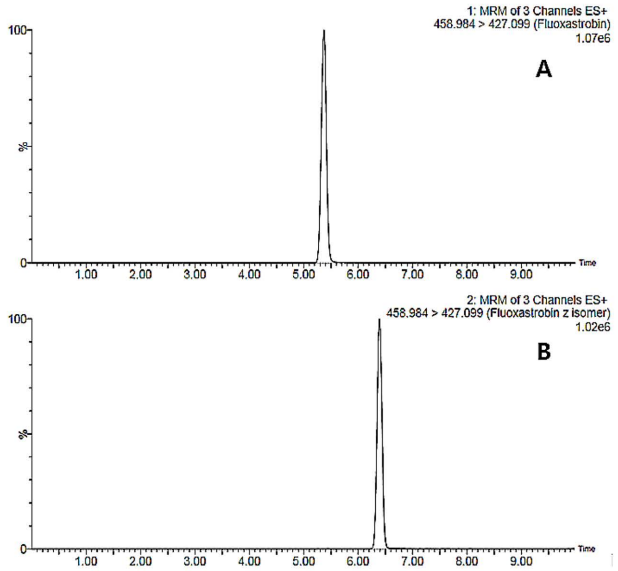


Fig. 3. LC-MS/MS chromatograms of fluoxastrobin (A, 5.3 min) and fluoxastrobin Z isomer (B, 6.3 min) standards.

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. 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 관측질량은 458.1 g/mol이며 질량검출기로 확인한 결과 최적의 precursor 이온으로 459 m/z를 선정하였고 427 m/z, 188 m/z, 102 m/z 값의 이온질량을 확인하였다. 이 때 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion은 정성확인을 높이기 위해 두 개의 값을 정성이온으로 설정하여 확인하였다. 분석조건에서 선정된 특성이온과 최적의 collision energy (CE)값은 Table 3에 나타내었다.

추출 및 정제조건 확립

최근 국내·외에서는 잔류농약 연구에서 비교적 적은 용매 사용량과 시간 소모가 적고 간편한 장점이 있는 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)법을 이용하여 시료 전처리 및 모니터링을 하고 있다[9,16,17]. 따라서 본 연구에서는 수용성 유기용매와 고상흡착제를 첨가하여 무기물과 불필요한 불순물을 제거하고 분석 화합물의 손실을 최소화할 수 있는 QuEChERS법을 검토하였다. QuEChERS법에는 추출 용매에 따라 Original, AOAC, EN 15662 방법으로 나뉘며 시료의 종류에 따라 여러 종류의 흡착제를 다양한 조합으로 사용하여 당, 유기산 등 극성 간섭물질을 제거하고, 지방과 같은 비극성 간섭물질과 클로르필 등의 색소제거에 효과적인 분산상 SPE 방법(dispersive-solid phase extraction; d-SPE)을 정제방법으로 한다. Sun 등[9]과 Wang 등[13]에 따르면 수용성 유기용매인 아세토니트릴을 추출용매로 하여 81.1-126.7%의 우수한 평균 회수율 결과를 보였다. 이를 바탕으로 극성-중간 극성 화합물인 플루옥사스트로빈은 추출 용매로 수용성 유기용매인 아세토니트릴을 사용하여 시료 내부로의 침투성을 용이하게 하였다.

Table 4. The recovery results of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer in mandarin samples

Sample	Recovery±RSD[1] (%)					
	Fluoxastrobin			Fluoxastrobin Z isomer		
Sample	Original	AOAC	EN 15662	Original	AOAC	EN 15662
Soybean	76.74±2.21	86.92±0.43	80.65±0.07	76.88±3.27	87.12±1.95	82.67±0.45
Mandarin	89.81±0.59	88.24±5.94	87.19±0.54	85.04±1.1	89.66±5.51	88.82±2.27

[1] Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

Table 5. Comparisons of matrix effect between QuEChERS extractions for the determination of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer in samples

Sample	Matrix effect(%)[1]					
	Fluoxastrobin			Fluoxastrobin Z isomer		
	Original	AOAC	EN 15662	Original	AOAC	EN 15662
Hulled rice	-19.44	-23.05	-24.40	-25.04	-31.13	-30.61
Potato	-3.33	-8.57	-5.80	-3.63	-7.40	-5.64
Soybean	-81.54	-81.78	-82.04	-79.10	-79.76	-78.60
Mandarin	-84.91	-84.10	-85.76	-77.66	-77.29	-79.46
Green pepper	-13.03	-15.63	-15.67	-14.01	-2.30	-1.82

[1] Matrix effect (%) = {(Peak area of standard in matrix-peak area of standard in solvent)/peak area of standard in solvent}×100.

Table 6. The recovery results of d-SPE for the determination of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer

Sorbent	Sample	Recovery±RSD[1] (%)	
		Fluoxastrobin	Fluoxastrobin Z isomer
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg	Mandarin	93.8±1.3	88.5±1.6
	Soybean	95.0±0.7	91.5±2.5
$MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 25 mg	Mandarin	97.6±1.8	96.4±0.7
	Soybean	87.9±1.2	92.8±1.4
$MgSO_4$ 150 mg, GCB 2.5 mg	Mandarin	102.2±1.5	91.4±1.3
	Soybean	85.3±0.9	92.3±0.8
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg, C_{18} 25 mg	Mandarin	92.3±1.3	92.9±0.1
	Soybean	91.6±2.1	88.3±3.0
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg, GCB 2.5 mg	Mandarin	90.6±0.9	92.3±1.7
	Soybean	94.9±0.8	104.0±4.7
$MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 25 mg, GCB 2.5 mg	Mandarin	95.6±2.9	94.1±1.4
	Soybean	73.2±1.2	71.0±1.2
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 50 mg, C_{18} 50 mg, GCB 7.5 mg	Mandarin	94.5±0.4	95.7±0.8
	Soybean	89.4±1.4	82.3±1.6

[1] Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

농산물 5품목 중 대표 시료로 습한 시료는 감귤, 건조 시료는 대두를 선택하여 LOQ 10배의 처리농도로 3반복 실험을 수행하였으며 추출효율을 확인한 결과, Original법으로 추출한 대두(76.74±2.21%)의 경우를 제외하고 모두 80.65-89.81%의 우수한 평균 회수율을 보였으며(Table 4), 농산물 5품목의 matrix effect 결과는 Table 5에 나타내었다. 또한 d-SPE 정제조건 확립을 위해 $MgSO_4$와 PSA (primary secondary amine), C_{18} (octadecysilane), GCB (graphitized carbon black)를 각각 혼합한 조건으로 감귤 및 대두 시료에서 정제 효율을 비교한 결과 전체 평균 회수율은 90.49-105.11%로 7가지 조건 모두에서 우수하였다(Table 6). 따라서 본 연구에서는 우수한 평균 회수율을 보이면서 낮은 표준편차 값을 보인 EN 15662법을 추출로, 정제는 $MgSO_4$ 150 mg 및 PSA 25 mg을 이용하여 최종 시험법으로 확립하였다.

시험법 유효성 검증

플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 혼합표준용액을 아세토니트릴로 희석하여 0.001-0.05 mg/L의 농도로 calibration curve를 그려 확인한 결과 결정계수(R^2)가 0.997 이상으로 높은 직선성(linearity)을 나타내었으며(Fig. 4), 선택성은 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 혼합표준용액, 무처리시료, 혼합표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 선택성(selectivity)을 확인하였다. 무처리 시료 중 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 머무름 시간과 질량 대 전하비(m/z)가 동일한 간섭물질이 검출되지 않았으므로 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을

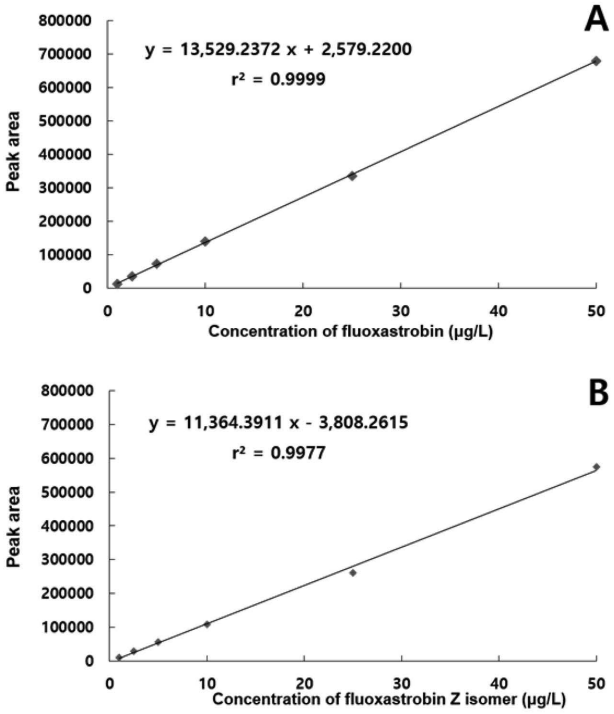


Fig. 4. Standard calibration curves of fluoxastrobin (A) and fluoxastrobin Z isomer (B) (concentration : 0.001-0.05 ppm).

가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 5-9). 혼합표준용액을 무처리 시험용액으로 희석하여 0.001-0.05 mg/L 농도로 제조한 후 2 μL씩 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과, 모든 농산물 시료의 표준용액에서 결정계수(R^2)가 0.998 이상으

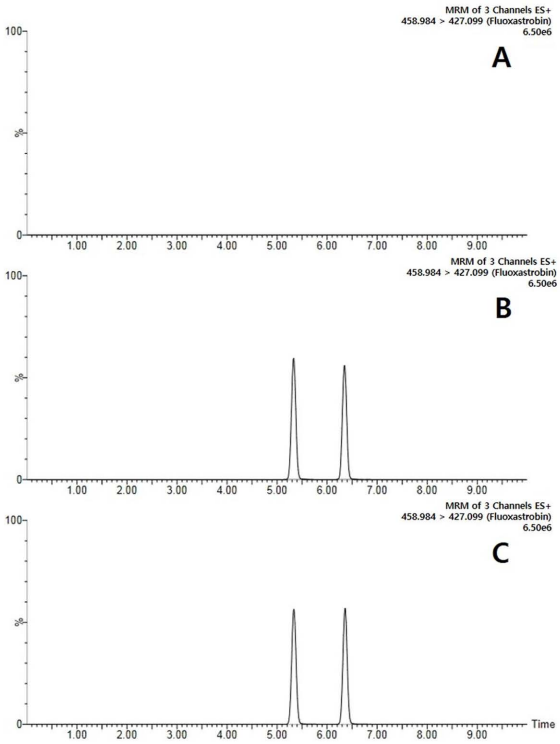


Fig. 5. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of fluoxastrobin (5.3 min) and fluoxastrobin Z isomer (6.3 min) in hulled rice corresponding to : (A) control sample, (B) matrix-matched standard at 0.025 mg/L, and (C) 0.025 mg/L (10×LOQ) recovery.

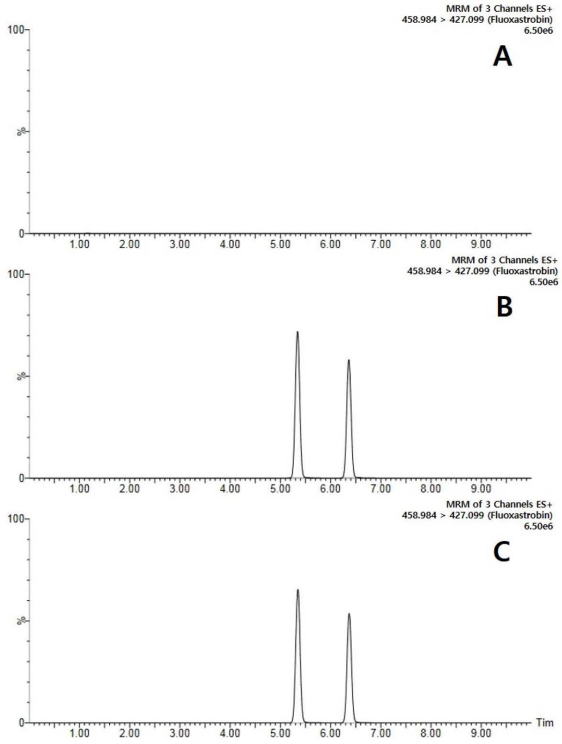


Fig. 7. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of fluoxastrobin (5.3 min) and fluoxastrobin Z isomer (6.3 min) in soybean corresponding to : (A) control sample, (B) matrix-matched standard at 0.025 mg/L, and (C) 0.025 mg/L(10×LOQ) recovery.

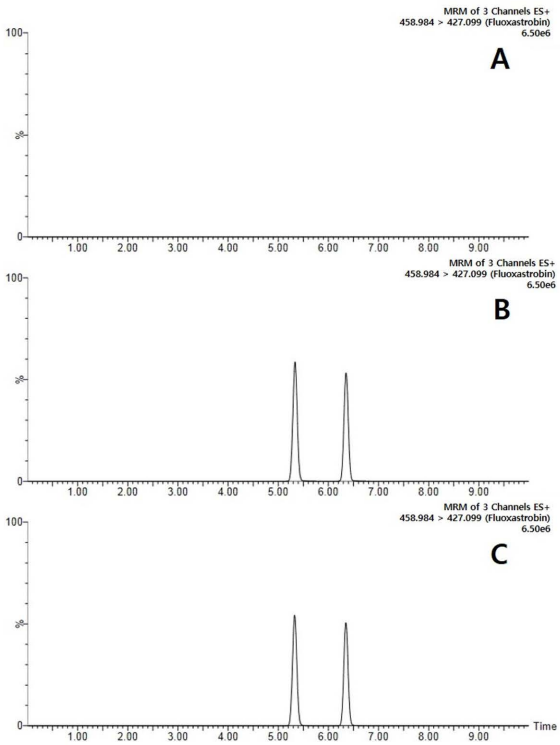


Fig. 6. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of fluoxastrobin (5.3min) and fluoxastrobin Z isomer (6.3 min) in potato corresponding to : (A) control sample, (B) matrix-matched standard at 0.025 mg/L, and (C) 0.025 mg/L (10×LOQ) recovery.

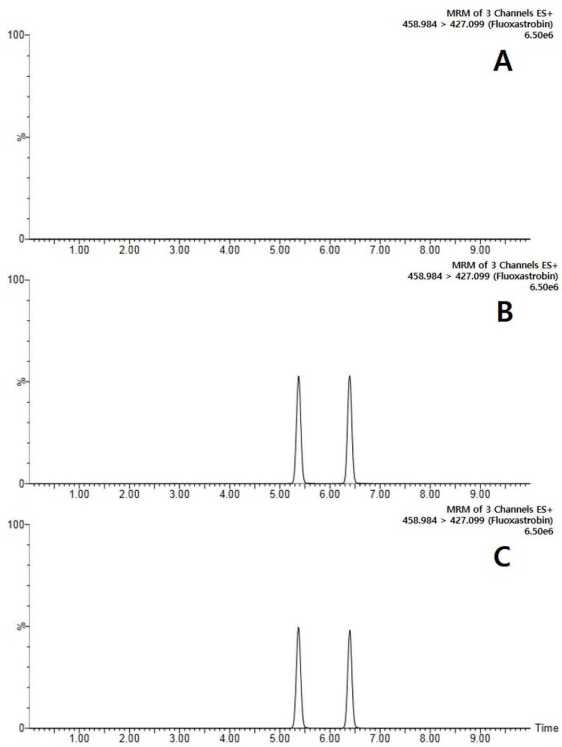


Fig. 8. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of fluoxastrobin (5.3 min) and fluoxastrobin Z isomer (6.3 min) in mandarin corresponding to : (A) control sample, (B) matrix-matched standard at 0.025 mg/L, and (C) 0.025 mg/L (10×LOQ) recovery.

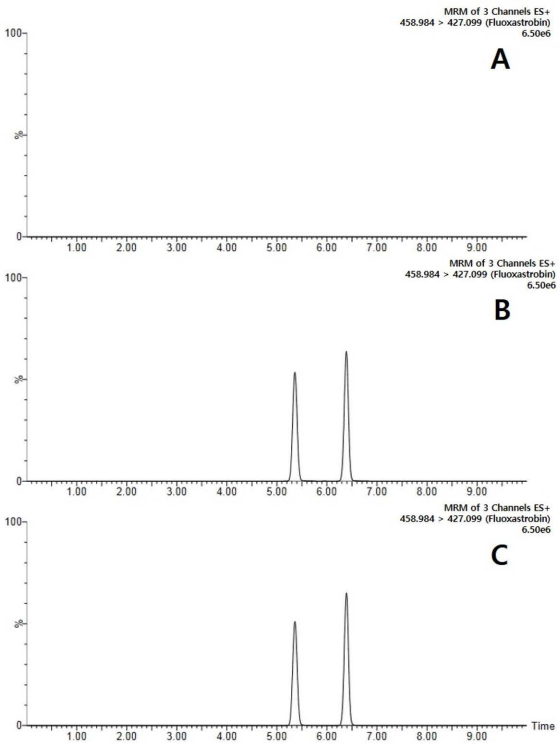


Fig. 9. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of fluoxastrobin (5.3 min) and fluoxastrobin Z isomer (6.3 min) in green pepper corresponding to : (A) control sample, (B) matrix-matched standard at 0.025 mg/L, and (C) 0.025 mg/L (10×LOQ) recovery.

로 높은 직선성을 확인하였으며(Fig. 10-11) 시험법의 검출한계는 0.003 mg/kg, 정량한계는 0.01 mg/kg이었다.

시험법의 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배 수준인 0.01과 0.1, 0.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수율 실험을 통하여 시험법의 정확성, 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 개발된 시험법의 결과, 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 각 농도별 평균 회수율은 75.5-100.3%와 75.0-103.9%이었고, 상대표준편차는 각각 5.5%와 4.3% 이하로 확인되었다(Table 7). 따라서 본 연구 결과는 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)[14] 및 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[15]에 적합함을 확인하였다.

실험실간 시험법 검증

본 연구에서 개발한 시험법의 유효성을 확인하기 위해 외부 실험기관인 광주지방식품의약품안전청과의 실험실간 검증을 수행하여 회수율 및 상대표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 평균 회수율은 플루옥사스트로빈은 79.5-100.5%, 플루옥사스트로빈 Z 이성질체는 78.8-104.7%이었고 상대표준편차는 각각 18.1%, 10.2% 이하로 확인되었다(Table 7-9). 두 실험실간의 회수율 결과에 따른 평균값은 플루옥사스트로빈의 경우 77.7-99.3%, 플루옥사스트로빈 Z 이성질체는 76.9-104.3%이었고, 상대표준편차는 모두 10.0% 이하로 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)[14] 식

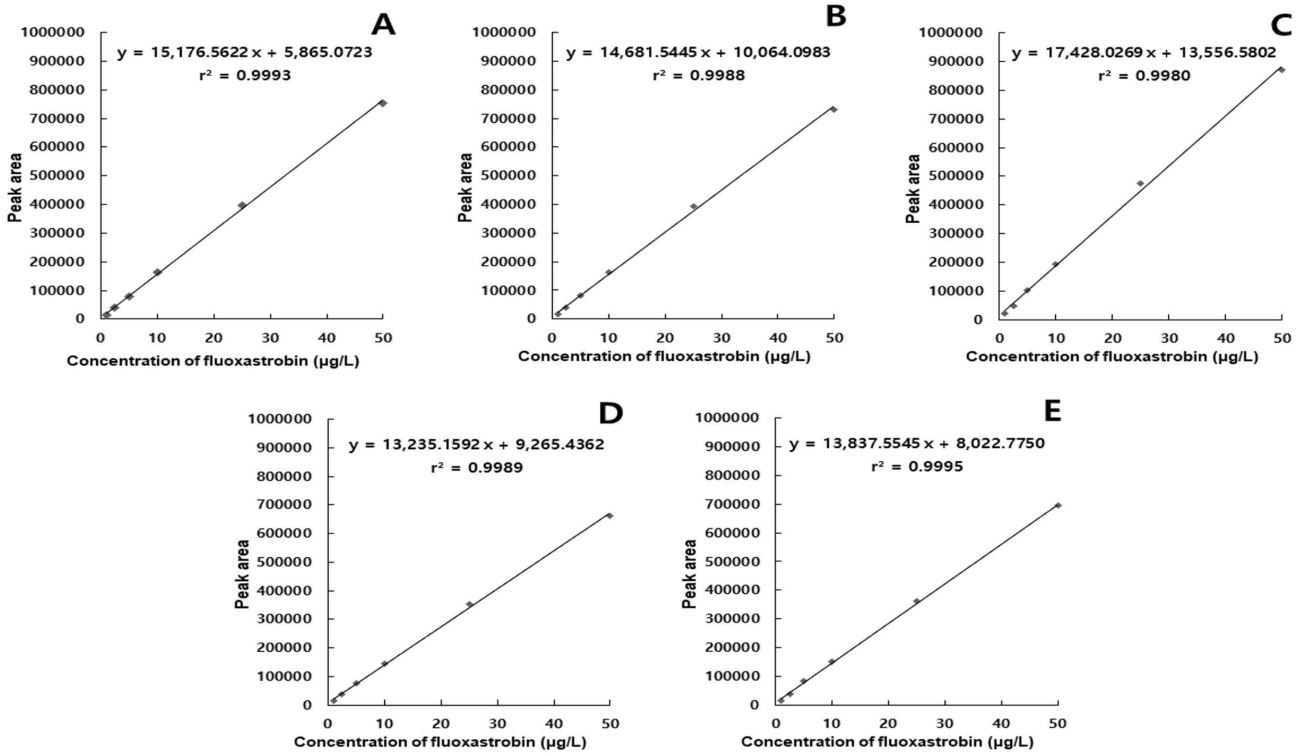


Fig. 10. Matrix-matched calibration curves of fluoxastrobin (concentration : 0.001-0.05 ppm) in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

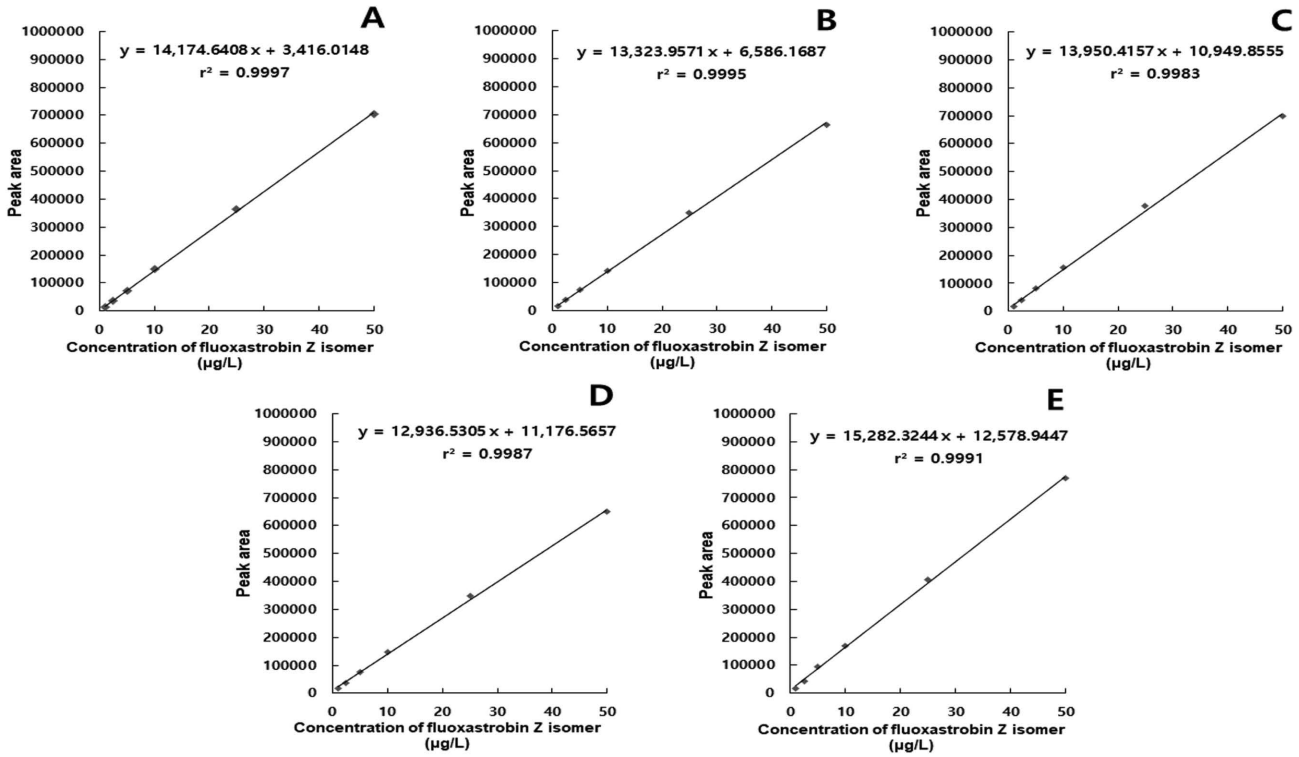


Fig. 11. Matrix-matched calibration curves of fluoxastrobin Z isomer (concentration : 0.001-0.05 ppm) in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

Table 7. Validation results of analytical method for the determination of fluoxastrobin and fluoxastrobin Z isomer residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[1)] (%)		LOQ (mg/kg)
		Fluoxastrobin	Fluoxastrobin Z isomer	
Hulled rice	0.01	88.3±3.2	97.6±2.8	0.01
	0.1	96.6±1.0	101.4±1.1	0.01
	0.5	98.9±0.9	101.9±0.9	0.01
Potato	0.01	75.5±1.7	83.0±1.4	0.01
	0.1	95.2±1.1	95.5±0.8	0.01
	0.5	99.6±1.6	100.0±1.8	0.01
Soybean	0.01	77.2±2.2	75.0±3.1	0.01
	0.1	95.4±1.5	100.1±1.0	0.01
	0.5	82.3±5.5	86.2±4.3	0.01
Mandarin	0.01	79.6±0.9	77.5±0.8	0.01
	0.1	93.2±1.7	91.5±2.1	0.01
	0.5	100.3±1.8	97.0±1.9	0.01
Green pepper	0.01	76.3±1.9	80.9±2.1	0.01
	0.1	98.0±2.6	103.9±1.8	0.01
	0.5	95.7±1.6	100.1±1.1	0.01

[1)] Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation

품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[15)]에 만족하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물 중 잔류하는 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체를 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다.

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

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[1] (%)		Ave.[4] (%)	RSD (%)
		Lab.1[2]	Lab.2[3]		
Hulled rice	0.01	88.3±3.2	86.4±0.7	87.6	2.7
	0.1	96.6±1.0	89.9±0.8	94.1	3.8
	0.5	98.9±0.9	82.1±1.5	92.6	9.5
Potato	0.01	75.5±1.7	86.8±1.0	79.8	7.5
	0.1	95.2±1.1	97.3±0.9	96.0	1.5
	0.5	99.6±1.6	80.5±2.1	92.5	10.8
Soybean	0.01	77.2±2.2	83.4±1.4	79.5	4.4
	0.1	95.4±1.5	87.7±3.3	92.5	4.8
	0.5	82.3±5.5	87.8±0.3	84.4	5.3
Mandarin	0.01	79.6±0.9	94.5±2.8	85.2	9.3
	0.1	93.2±1.7	94.8±2.4	93.8	1.9
	0.5	100.3±1.8	87.9±0.6	95.6	6.9
Green pepper	0.01	76.3±1.9	107.0±0.9	87.8	18.1
	0.1	98.0±2.6	104.8±1.2	100.5	4.0
	0.5	95.7±1.6	88.5±0.9	93.0	4.2

[1] Mean values of 5 (Lab.1) or 3 (Lab.2) times repetitions with relative standard deviation.
[2] National Institute of Food and Drug Satety Evaluation.
[3] Gwangju Regional Food and Drug Administration.
[4] Recovery average of inter-laboratory.

Table 9. Inlet-laboratory validation results of analytical method for fluoxastrobin Z isomer in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[1] (%)		Ave.[4] (%)	RSD (%)
		Lab.1[2]	Lab.2[3]		
Hulled rice	0.01	97.6±2.8	92.3±5.6	95.6	4.6
	0.1	101.4±1.1	88.9±1.1	96.7	6.8
	0.5	101.9±0.9	90.2±6.3	97.5	7.0
Potato	0.01	83.0±1.4	93.0±2.5	91.44	6.2
	0.1	95.5±0.8	103.2±1.8	98.4	4.2
	0.5	100.0±1.8	85.8±3.4	94.7	8.0
Soybean	0.01	75.0±3.1	85.3±2.4	78.8	7.2
	0.1	100.1±1.0	83.2±4.6	93.8	9.6
	0.5	86.2±4.3	81.0±1.8	84.2	4.7
Mandarin	0.01	77.5±0.8	89.6±2.8	82.0	7.9
	0.1	91.5±2.1	93.9±1.8	92.4	2.3
	0.5	97.0±1.9	80.6±1.8	90.8	9.5
Green pepper	0.01	80.9±2.1	97.9±1.2	87.3	10.2
	0.1	103.9±1.8	106.1±2.0	104.7	2.1
	0.5	100.1±1.1	90.2±0.7	96.4	5.4

[1] Mean values of 5 (Lab.1) or 3 (Lab.2) times repetitions with relative standard deviation.
[2] National Institute of Food and Drug Satety Evaluation.
[3] Gwangju Regional Food and Drug Administration.
[4] Recovery average of inter-laboratory.

Acknowledgement

본 연구는 2022년도 식품의약품안전평가원 "2022년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(22191농축산316)"의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

플루옥사스트로빈은 *Strobilurus* 속의 버섯에서 추출한 천연물을 기반으로 개발된 살균제로서 곰팡이성 질병 방제에 효과적이다. 잔류물의 정의는 유럽(EU), 미국(EPA), 일본(JFCRF)에서는 플루옥사스트로빈과 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 합으로 정의하고 있으며, 감자, 대두 등 90품목에 대하여 0.01-60 mg/kg으로 잔류허용기준이 설정되어 있다. 코덱스(CODEX)와 국내에는 잔류허용기준이 설정되어 있지 않음에 따라 본 연구에서는 추후 국내·외 수입 및 재배 농산물 중 플루옥사스트로빈에 대한 잔류허용기준 준수 여부 확인을 위한 시험법을 개발하고자 하였다. 전처리 과정은 플루옥사스트로빈의 물리·화학적 특성을 고려하여 QuEChERS법을 이용한 추출 및 정제방법으로 최적화하였으며, LC-MS/MS를 이용하여 시험법을 개발하였다. 추출용매는 아세토니트릴로 하고, $MgSO_4$ 및 PSA를 이용하여 정제과정을 확립하였다. 대표 농산물 5종에 대해 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 실험을 진행한 결과, 플루옥사스트로빈 및 플루옥사스트로빈 Z 이성질체의 결정계수(R^2)는 0.998 이상이고 플루옥사스트로빈의 평균 회수율(n=5)은 75.5-100.3%, 플루옥사스트로빈 Z 이성질체는 75.0-103.9%이었다. 상대표준편차는 플루옥사스트로빈이 5.5% 이하, 플루옥사스트로빈 Z 이성질체가 4.3% 이하로 확인되었다. 또한 시험법의 유효성을 확인하기 위해 외부 실험기관인 광주지방식품의약품안전청과의 실험실간 검증을 진행하였으며, 검증 결과 두 실험실간의 회수율은 플루옥사스트로빈의 경우 80.3-101.4%, 플루옥사스트로빈 Z 이성질체는 80.2-105.0%이었고, 상대표준편차는 모두 18.1% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구 결과는 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003) 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(MFDS, 2016)에 만족함에 따라 공정시험법으로 활용 가능할 것이다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

So Eun Lee https://orcid.org/0000-0002-8670-1582
Su Jung Lee https://orcid.org/0000-0002-5325-8342
Sun Young Gu https://orcid.org/0000-0002-0070-2462
Chae young Park https://orcid.org/0000-0001-7161-3478
Hye-Sun Shin https://orcid.org/0000-0001-7364-3902
Sungeun Kang https://orcid.org/0000-0002-2660-1301
Jung Mi Lee https://orcid.org/0000-0003-2840-5010
Yun Mi Chung https://orcid.org/0000-0001-5118-5197
Gui Hyun Jang http://orcid.org/0000-0002-4974-3097
Guiim Moon http://orcid.org/0000-0002-3726-6748

References

1. Kim, A.H., Kim, S.B., Han, K.D., Kim, H.T., Monitoring for the resistance of strobilurin fungicide against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease. *Korean J. Pestic. Sci.*, **18**(3), 161-167 (2014).
2. Reiner, H., Klempner, A., Koster, J., Behaviour of fluoxastrobin (HEC 5725) in plants and animals. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer (Engl. Ed)*, **57**, 391-414 (2004).
3. HAN, S.B., The design pattern of environment-friendly agrochemicals by using the halogen substituents. *Korean J. Pesticide Sci.*, **14**(3), 289-302 (2010).
4. Liang, Y., Chen, X., Hu, J., Terminal residue and dietary intake risk assessment of prothioconazole-desthio and fluoxastrobin in wheat field ecosystem. *J. Sci. Food Agric.*, **101**(12), 4900-4906 (2021).
5. Grasso, V., Sierotzki, H., Garibaldi, A., Gisi, U., Characterization of the cytochrome b gene fragment of *Puccinia* species responsible for the binding site of QoI fungicides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **84**(2), 72-82 (2006).
6. Fisher, N., Meunier, B., Molecular basis of resistance to cytochrome bc 1 inhibitors. *FEMS Yeast Res.*, **8**(2), 183-192 (2008).
7. Heinemann, U., Benet-Buchholz, J., Etzel, W., Schindler, M., Fluoxastrobin (HEC 5725)-the new dimension in strobilurin fungicides. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer (Engl. Ed)*, **57**, 299-318 (2004).
8. European Food Safety Authority (EFSA), Brancato, A., Brocca, D., Cabrera, L.C., Lentdecker, C.D., Erdos, Z., Ferreira, L., Greco, L., Jarrah, S., Kardassi, D., Leuschner, R., Lythgo, C., Medina, P., Miron, I., Molnar, T., Pedersen, R., Reich, H., Riemenschneider, C., Sacchi, A., Santos, M., Stanek, A., Modification of the existing maximum residue levels for fluoxastrobin in oilseeds. *EFSA J.*, **16**(8), e05381 (2018).
9. Sun, Q., Wang, W., Li, Y., Wen, G., Tang, H., Song, W., Dong, M., A novel approach for simultaneous determination of E/Z-fluoxastrobins in vegetables and fruits by UHPLC-DAD. *Food Con.*, **78**, 7-13 (2017).
10. European Commission, (2021). EU Pesticides database. Retrieved from https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=details&pest_res_ids=310&product_ids=&v=1&e=search.pr
11. United States Environmental Protection Agency(US EPA),

(2021). https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-180/subpart-C/section-180.609
12. The Japan Food Chemical Research Foundation (JFCRF), (2021). Maximum Residue Limits(MRLs) list of Agricultural chemicals in foods. https://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=62120
13. Wang, W., Sun, Q., Li, Y., Wen, G., Fan, J., Song, W., Zhao, Z., Dong, M., Simultaneous determination of fluoxastrobin and tebuconazole in cucumber and soil based on solid-phase extraction and LC-MS/MS Method. *Food Anal. methods*, **11**(3), 750-758 (2018).
14. CAC (Codex Alimentarius Commission). Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rome, Italy (2003).
15. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation: Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods. Cheongju, Korea (2016).
16. Qi, P., Wang, J., Liu, Z., Wang, Z., Xu, H., Di, S., Zhao, H., Wang, X., Integrated QuEChERS strategy for high-throughput multi-pesticide residues analysis of vegetables. *J. Chromatogr. A*, **1659**, 462589 (2021).
17. Stachniuk, A., Fornal, E., Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. *Food Anal. Methods*, **9**(6), 1654-1665 (2016).