



액체크로마토그래피를 이용한 농산물중 pyribencarb와 대사물 KIE-9749의 잔류 분석법

권혜영* · 홍수명 · 김택겸 · 김형진 · 문병철 · 경기성¹

농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, ¹충북대학교 환경생명화학과

Determination of Pyribencarb and Its Metabolite KIE-9749 in Agricultural Commodities by High-Performance Liquid Chromatography

Hyeyoung Kwon*, Su-Myeong Hong, Taek-Kyum Kim, Hyung-Jin Kim, Byeong-Chul Moon and Kee-Sung Kyung¹

Chemical Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk 55365, Republic of Korea

¹Department of Environmental and Biological Chemistry, College of Agricultural Life and Environmental Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

(Received on April 18, 2016. Revised on August 26, 2016. Accepted on September 28, 2016)

Abstract The aim of this study was to develop an analytical method for the determination of pyribencarb and its metabolite KIE-9749 in agricultural commodities. The experiment was performed with a range of concentrations 0.05~2.5 µg/g in apple, green pepper, potato, hulled rice, soybean, pear, peach, grape and cucumber. Each samples were extracted with acetone and cleaned by dichloromethane/saline water partition and purified with Florisil solid phase extraction (SPE) cartridge and aminopropyl SPE cartridge. Pyribencarb and KIE-9749 were separated and quantified by HPLC/UV at 265nm using acetonitrile and water as mobile phase. The recoveries of pyribencarb and KIE-9749 were within 78.3~108.4% and 73.9~113.7% with RSD below 12.2% and 15.0%, respectively. The limits of quantification (LOQ) were both 0.05 µg/g. LC/ESI-MS/MS was optimized for confirmation of residue identity.

Key words Analytical method, KIE-9749, pyribencarb, residue.

서 론

신종 병해충잡초의 발생 및 유입, 기존 약제에 대한 저항성 발생, 효율적인 방제등의 사유로 새로운 성분의 농약은 지속적으로 개발되고 있다. 새로 개발된 농약은 인축 및 환경생물에 대한 독성 평가, 농작물이나 환경에 대한 잔류성 평가 등을 거쳐 각 나라의 등록 시스템에 맞춰 등록되어 관리된다. 국내에서는 농촌진흥청의 농약관리법에 따라 평가되어 등록이 허가된 품목은 2016년 4월 현재 1870품목에

달한다(Rural development administration, 2016). 국가에 등록된 새로운 농약의 농산물에 대한 안전성 평가 및 지속적인 관리를 위해서 농약이 등록됨과 동시에 잔류 분석법이 마련되어야 한다.

Pyribencarb, methyl {2-chloro-5-[(E)-1-(6-methyl-2-pyridylmethoxyimino) ethyl]benzyl} carbamate는 Kumiai 화학공업 주식회사와 Ihara 화학공업주식회사에 의해 개발된 benzylcarbamate 유형의 살균제로 일본에는 2012년에 등록되었다(농촌진흥청, 2014). 이 약제는 광범위한 범위의 식물 병해에 활성이 있는데, 특히 잣빛곰팡이병균에 의한 잣빛곰팡이병과 균핵병균에 의한 줄기썩음병에 활성이 강하다(Kataoka et al, 2010; Takagaki et al, 2014).

*Corresponding author
E-mail: kwonhy91@korea.kr

Pyribencarb은 2015년 2월에 우리나라에 처음 등록되어 잣빛곰팡이병, 흰가루병, 탄저병, 노균병, 역병외 다수의 곰팡이 유래 병 방제용 농약으로 허가되어 있다(한국작물보호협회 농약사용지침서, 2015). 일일섭취허용량은 0.039 µg/g bw/day이며 2016년 4월 현재 배, 사과, 포도, 복숭아, 오이에 대하여 잔류허용기준(MRLs, Maximum Residue Limits)이 설정되어 있다(Ministry of food and drug administration, 2016).

이 화합물은 kresoxim-methyl, azoxystrobin과 같은 strobilurin 계열 살균제와 유사한 구조를 갖지만 벤젠고리의 카보닐 작용기의 치환된 구조가 다르다(Kataoka et al, 2010). Pyribencarb의 구조식과 이화학적 특성(Tomlin, 2012)은 Table 1에 나타내었다. 현재 kresoxim-methyl과 azoxystrobin에 대하여 국내외에 다양한 분석법이 보고되어 있으며(Abreu et al., 2006; Grimalt et al., 2016) 식품공전에는 kresoxim-methyl의 경우 GC/NPD로 azoxystrobin의 경우 HPLC/UVD로 분석하도록 되어있다(Ministry of food and drug administration, 2016).

따라서 본 연구에서는 다양한 농산물 시료로부터 pyribencarb와 잔류분 정의에 포함되어 있는 대사물인 KIE-9749 (Rural development administration, 2015)를 분석하기 위한 보편적인 분석법을 개발하기 위하여 5대 작물군의 대표작물인 대두, 사과, 고추, 감자, 현미와 잔류허용기준이 설정된 배, 복숭아, 오이, 포도를 대상으로 효율적인 전처리 방법과 기기분석법을 확립하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

정제과정에 사용된 용매는 잔류농약 분석용을 사용하였으며 florisl SPE cartridge (1 g, 6 mL)과 aminopropyl SPE

cartridge (1 g, 6 mL)은 Agilent technologies사로부터 구입하여 사용하였다. 시료 전처리를 위한 분쇄기는 BLIXER 5 Plus (Robot coupe, USA)를 이용하였으며 균질기는 Ultraturax T-25 (IKA, USA)를 이용하였다. Pyribencarb (99.9%)와 그 대사물은 KIE-9749 (98.9%) 표준품은 동방아그로(주)로부터 분양받았으며 acetonitrile을 이용하여 1000 mg/L로 만들고 적당한 농도로 희석하여 시험에 이용하였다.

농산물 시료

분석대상 농산물은 다양한 농산물에 분석이 적용될 수 있도록 작물 분류표(Ministry of food and drug administration, 2016)에서 사과, 고추, 감자, 현미, 대두 등 5작물을 선정하였으며, 여기에 덧붙여 등록이 추진되어 잔류허용기준이 설정된 작물인 포도, 오이, 배, 복숭아도 분석법 개발용 시료에 포함시켰다. 시료는 대형마트에서 구입하여 식품공전의 잔류농약 분석을 위한 농산물 검체 전처리 방법에 따라 처리하여(사과 및 배: 심과 양쪽 오목한 부분 제거, 고추 및 포도: 꼭지 제거, 복숭아: 꼭지 및 씨 제거, 쌀 및 대두: 깍지 제거) -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 이용하였다.

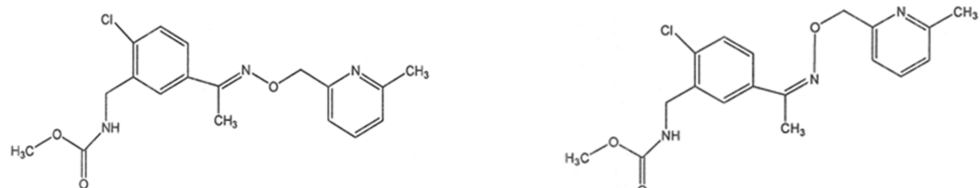
추출

농산물중 pyribencarb 및 KIE-9749의 분석을 위해 시료 20 g을 정밀히 달아 500 mL 톨비커에 넣고 현미와 대두는 물 20 mL를 더 넣고 30분간 방치했다. 여기에 acetone 100 mL를 넣은 후 균질기로 2~3분간 균질화 한 후 이를 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기로 감압여과했다. 잔류물을 acetone 40 mL로 씻어 내려 상기 여액과 합친 후 1 L 분액 깔때기로 옮기고 dichloromethane 50 mL, 포화염화나트륨 용액 50 mL 및 물 450 mL를 가한 후 10분간 격렬하게 진탕하고 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 후 dichloro-

Table 1. Chemical structure and properties of pyribencarb and KIE-9749

Common name	Pyribencarb	KIE-9749
Formula	C ₁₈ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	C ₁₈ H ₂₀ ClN ₃ O ₃
Molecular weight	361.82	361.82
Kow logP	2.64 (pH 4.0) 3.77 (pH 6.9) 3.74 (pH 8.9) (25°C)	-
Vapor pressure	< 1.0×10 ⁻⁵ Pa (20°C)	-
Solubility	water: 0.00676, n-hexane: 0.262 toluene: 48.0, dichlorometane: > 250, acetone: 140, metanol: 172, ethyl acetate: 97.3 (all g/L, 20°C)	-

Structure



methane층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수시켰다. 여기에 dichloromethane 50 mL를 다시 가하여 진탕하고 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 후 dichloromethane층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수시켜 앞의 액과 합하였다. 이액을 40°C 이하에서 감압농축하여 건조시킨 후 잔류물을 *n*-hexane 10 mL에 용해하였다. 곡류, 두류 등 지방성 검체의 경우 상기 건고물을 acetonitrile로 포화된 *n*-hexane 40 mL로 녹이고 500 mL 분액깔때기로 옮기고 *n*-hexane로 포화된 acetonitrile 40 mL로 2회 분배추출하여 acetonitrile 층을 40°C 이하에서 감압농축하여 건조시키고 *n*-hexane 10 mL에 용해했다.

Solid-phase extraction (SPE) cartridge 정제

n-Hexane 10 mL로 활성화한 Florisil SPE cartridge (1 g, 6 mL)에 *n*-hexane 10 mL로 용해한 위의 용액 10 mL를 가했다. 여기에 *n*-hexane/acetone (97.5/2.5, v/v) 10 mL를 가하여 씻어서 버리고 *n*-hexane/acetone (85/15, v/v) 10 mL를 가하여 받아 이 용리액을 40°C 이하에서 농축하여 *n*-hexane 10 mL에 용해했다. *n*-Hexane 10 mL로 활성화한 aminopropyl SPE cartridge (1 g, 6 mL)에 앞의 *n*-hexane 10 mL로 용해한 용액을 전량 가하고 여기에 *n*-hexane/acetone (95/5, v/v) 10 mL를 가하여 씻어서 버리고 *n*-hexane/acetone (85/15, v/v) 10 mL를 가하여 받은 후 이 용리액을 40°C 이하에서 농축하여 acetonitrile 2 mL로 용해하여 기기분석에 이용했다.

기기분석

HPLC는 Agilent 1100 series (USA)를 사용하였으며 검출기는 UVD를 사용하였으며 파장은 265 nm를 사용하였다. 컬럼은 NUCLEODUR C18 Gravity (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm, 영진바이오크롬)를 사용하였고 이동상은 acetonitrile/water (1/1, v/v) 용액을 분당 1.0 mL의 유속으로 흘렸다. 컬럼온도는 40°C로 하였으며 주입량은 40 μL였다. 잔류분의 재확인을 위해 사용된 LC-MS/MS는 ABSciex 3200Qtrap (USA)이었으며 분석 컬럼은 Prodigy 3 μm ODS 100A (100 mm × 2 mm ID, 3 μm, Phenomenex)를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile/water (1/1, v/v)를 분당 0.2 mL로 사용하였고 컬럼온도는 25°C였으며 주입량은 5 μL였다. 이온화 소스의 조건은 ESI positive-ion mode를 사용하였으며 Ionspray

voltage는 5500 v, drying gas 온도는 450°C, curtain gas는 10 psi를 사용하였다.

분석법 검증

본 연구에서 확립된 전처리법과 기기분석법을 검증하기 위해서 농약이 처리되지 않은 각 농산물 분쇄시료에 3수준 (0.05, 0.5, 2.5 μg/g)으로 농약을 첨가하고 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 구하였고 이를 근거로 분석법의 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 구하였다.

결과 및 고찰

시료 추출 및 분배과정 확립

일반적으로 중간극성에서 비극성의 농약을 농산물로부터 추출하기 위해서 acetone, acetonitrile, ethylacetate 등이 주로 사용된다(Anastassiades et al., 2003). Pyribencarb와 대사의 추출용매를 선정하기 위해 동일한 strobilurine계열이면서 비슷한 구조를 가진 kresoxim-methyl과 azoxystrobin의 추출에 이미 사용되었으며(Li et al., 2006; Chonan, 2001) 용매에 대한 용해도가 높은(140 g/L, 20°C) acetone (Tomlin, 2012)을 사용하였다.

Pyribencarb의 log P값은 3.77 (pH 6.9, 25°C)로 극성도가 약하여 수용성 추출 용매를 농축하지 않고 물로 희석하여 비극성 유기용매를 첨가하여 분리할 경우 유기용매층으로 전이될 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 acetone 추출액에 포화염화나트륨 용액 50 mL와 물 450 mL를 가한 후 액-액 분배 용매 선정을 위해 *n*-hexane, *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v), dichloromethane에 대하여 분배효율을 시험하였고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 세 가지 용매조건에서 pyribencarb와 KIE-9749 모두 *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v) 2회 분배와 dichloromethane 2회 분배 조건에서 회수율이 100% 정도로 양호하였으나 *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v)의 경우 2차 분배를 실시할 경우 유기용매층이 상단부에 위치하여 실험 조작이 번거로우므로 dichloromethane 2회 분배 조건을 분배용매로 선정하였다. 현미의 경우 약 2%, 대두의 경우 약 18%의 지질을 함유하고 있고(Rural development administration, 2011) 이는 액-

Table 2. Recoveries of pyribencarb and KIE-9749 from water-solvent partition

Solvent	Pyribencarb			KIE-9749		
	Partition ^{a)} 1	Partition 2	Total	Partition 1	Partition 2	Total
<i>n</i> -Hexane 100 mL	68	26	94	47	27	74
<i>n</i> -Hexane/Dichloromethane (8/2, v/v) 100 mL	87	16	103	90	14	104
Dichloromethane 50 mL	98	1	99	93	9	102

Table 3. Recoveries of pyribencarb and KIE-9749 from acetonitrile/*n*-hexane partition for hulled rice and soybean

Solvent	Recovery (%)	
	Pyribencarb	KIE-9749
Acetonitrile	98	99

Table 4. Recovery of pyribencarb and KIE-9749 from Florisil SPE by *n*-hexane/acetone mixture

Solvent (10 mL)	Recovery (%)	
	Pyribencarb	KIE-9749
<i>n</i> -Hexane/acetone (100/0, v/v)	0	0
<i>n</i> -Hexane/acetone (97.2/2.5, v/v)	0	0
<i>n</i> -Hexane/acetone (95/5, v/v)	2	3
<i>n</i> -Hexane/acetone (90/10, v/v)	22	3
<i>n</i> -Hexane/acetone (85/15, v/v)	74	93
<i>n</i> -Hexane/acetone (80/20, v/v)	0	0
Total	98	99

Table 5. Recovery of pyribencarb and KIE-9749 from aminopropyl SPE by *n*-hexane/acetone mixture

Solvent (10 mL)	Recovery (%)	
	Pyribencarb	KIE-9749
<i>n</i> -Hexane/acetone (100/0, v/v)	0	0
<i>n</i> -Hexane/acetone (97.2/2.5, v/v)	0	0
<i>n</i> -Hexane/acetone (95/5, v/v)	0	0
<i>n</i> -Hexane/acetone (90/10, v/v)	23	15
<i>n</i> -Hexane/acetone (85/15, v/v)	76	84
<i>n</i> -Hexane/acetone (80/20, v/v)	0	0
Total	99	99

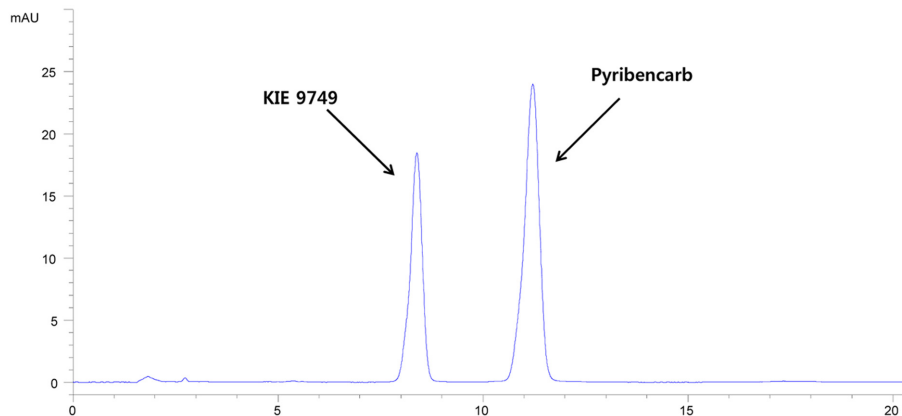
액분배 과정 이후에도 남아 있으므로 *n*-hexane으로 포화된 50 mL의 acetonitrile과 acetonitrile로 포화된 50 mL의 *n*-hexane 분배 과정을 추가하여 지질을 제거하였다(Table 3).

Solid-phase extraction (SPE) cartridge 정제

액-액 분배 과정을 거친 후에도 남아있는 불순물을 제거하기 위해 색소와 유지제거를 위해 잔류농약 분석에서 많이 쓰이는 Florisil SPE cartridge (1 g, 6 mL)을 추가하였다. 비극성 용매인 *n*-hexane에 극성 용매인 acetone의 양을 점차 늘려 혼합액의 극성을 높여가면서 세척과 용출 조건을 선정한 결과를 Table 4에 나타내었다. *n*-Hexane/acetone (97.2/2.5, v/v)용액을 흘려주었을 때 농약 성분이 검출되지 않았으며 *n*-hexane/acetone (85/15, v/v) 용액을 흘려주었을 때 pyribencarb가 74%, KIE-9749가 93%의 회수율을 보였으므로 두 혼합액을 세척과 용출용매로 선정하였다. Florisil SPE cartridge (1 g, 6 mL) 정제 이후에도 HPLC 크로마토그램에서 방해성분이 관찰되어 aminopropyl SPE cartridge (1 g, 6 mL)를 이용하여 추가로 정제했다. Aminopropyl SPE cartridge의 정제 조건을 확립하기 위해 *n*-hexane과 acetone 혼합액을 이용하여 실험한 결과 *n*-hexane/acetone (90/10, v/v) 10 mL를 이용하여 세척하고 *n*-hexane/acetone (85/15, v/v) 10 mL로 용리하는 조건으로 분석할 때 99%의 양호한 회수율을 보였다(Table 5).

기기분석조건 확립

Pyribencarb의 경우 가열하면 기화하기 전에 변성하는 특성이 있어(농촌진흥청, 2015) GC분석에 적합하지 않고 pyribencarb와 KIE-9749의 구조상 UV발색단으로 알려진 불포화 유기작용기들과 조색단인 비공유전자쌍을 함유한 작용기를 많이 함유하고 있어 HPLC/UVD에 분석이 가능할 것으로 판단되었다. UVD의 파장은 265nm에서 최적의 감도를 보였으며 HPLC의 이동상은 물과 acetonitrile을 1:1로 흘렸을 때 pyribencarb 8.4분, KIE-9749 11.3분으로 머무름

**Fig. 1.** HPLC chromatogram of standard solution (KIE-9749: 8.4 min, Pyribencarb: 11.3 min).

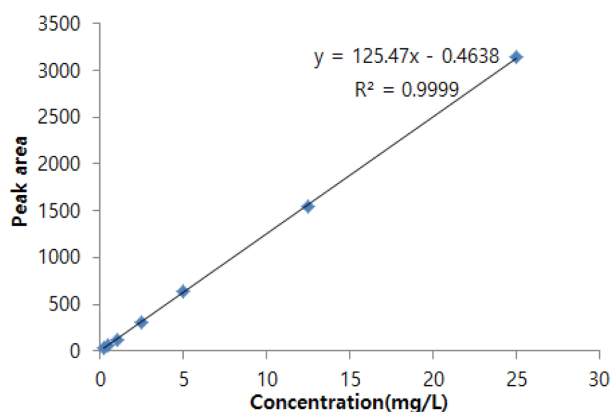


Fig. 2. Calibration curve of pyribencarb.

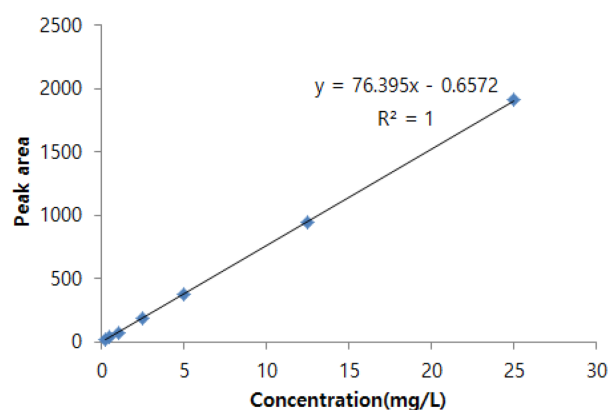


Fig. 3. Calibration curve of KIE-9749.

Table 6. Recoveries, RSDs(relative standard deviation) and LOQs (limit of quantification) of pyribencarb in agricultural commodities

Sample	Spiked level ($\mu\text{g/g}$)	Analyst A		Analyst B		LOQ ($\mu\text{g/g}$)
		Recovery (%) \pm SD	RSD (%)	Recovery (%) \pm SD	RSD (%)	
Apple	0.05	88.1 \pm 3.3		87.5 \pm 0.4		0.05
	0.5	94.9 \pm 0.5	4.8	93.1 \pm 1.2	3.4	
	2.5	97.8 \pm 2.1		93.9 \pm 2.2		
Pepper	0.05	82.0 \pm 13.2		97.3 \pm 4.4		0.05
	0.5	89.9 \pm 0.9	8.3	91.1 \pm 1.5	4.3	
	2.5	88.8 \pm 2.3		89.8 \pm 1.4		
Hulled rice	0.05	93.4 \pm 5.1		91.7 \pm 3.0		0.05
	0.5	94.5 \pm 1.6	3.8	95.4 \pm 3.1	2.8	
	2.5	89.8 \pm 2.7		92.7 \pm 0.6		
Potato	0.05	91.4 \pm 4.0		90.5 \pm 0.9		0.05
	0.5	88.5 \pm 1.2	2.7	83.1 \pm 10.5	7.2	
	2.5	90.2 \pm 1.2		92.2 \pm 0.4		
Soybean	0.05	94.4 \pm 3.5		90.9 \pm 6.7		0.05
	0.5	83.5 \pm 3.8	7.4	84.4 \pm 2.8	8.3	
	2.5	81.0 \pm 2.6		78.7 \pm 7.5		
Grape	0.05	92.2 \pm 6.0		99.1 \pm 5.8		0.05
	0.5	93.6 \pm 5.5	6.8	82.5 \pm 1.4	10.9	
	2.5	83.9 \pm 4.5		78.3 \pm 1.1		
Cucumber	0.05	98.2 \pm 1.7		108.4 \pm 1.3		0.05
	0.5	89.8 \pm 0.9	4.1	90.5 \pm 0.5	9.3	
	2.5	90.9 \pm 0.6		88.9 \pm 1.5		
Pear	0.05	94.5 \pm 1.3		96.3 \pm 0.9		0.05
	0.5	82.2 \pm 5.1	7.4	85.6 \pm 12.1	10.3	
	2.5	82.0 \pm 1.6		79.9 \pm 3.4		
Peach	0.05	104.3 \pm 7.7		108.3 \pm 9.3		0.05
	0.5	92.0 \pm 0.7	7.3	96.1 \pm 12.2	12.2	
	2.5	91.4 \pm 1.2		85.5 \pm 0.1		

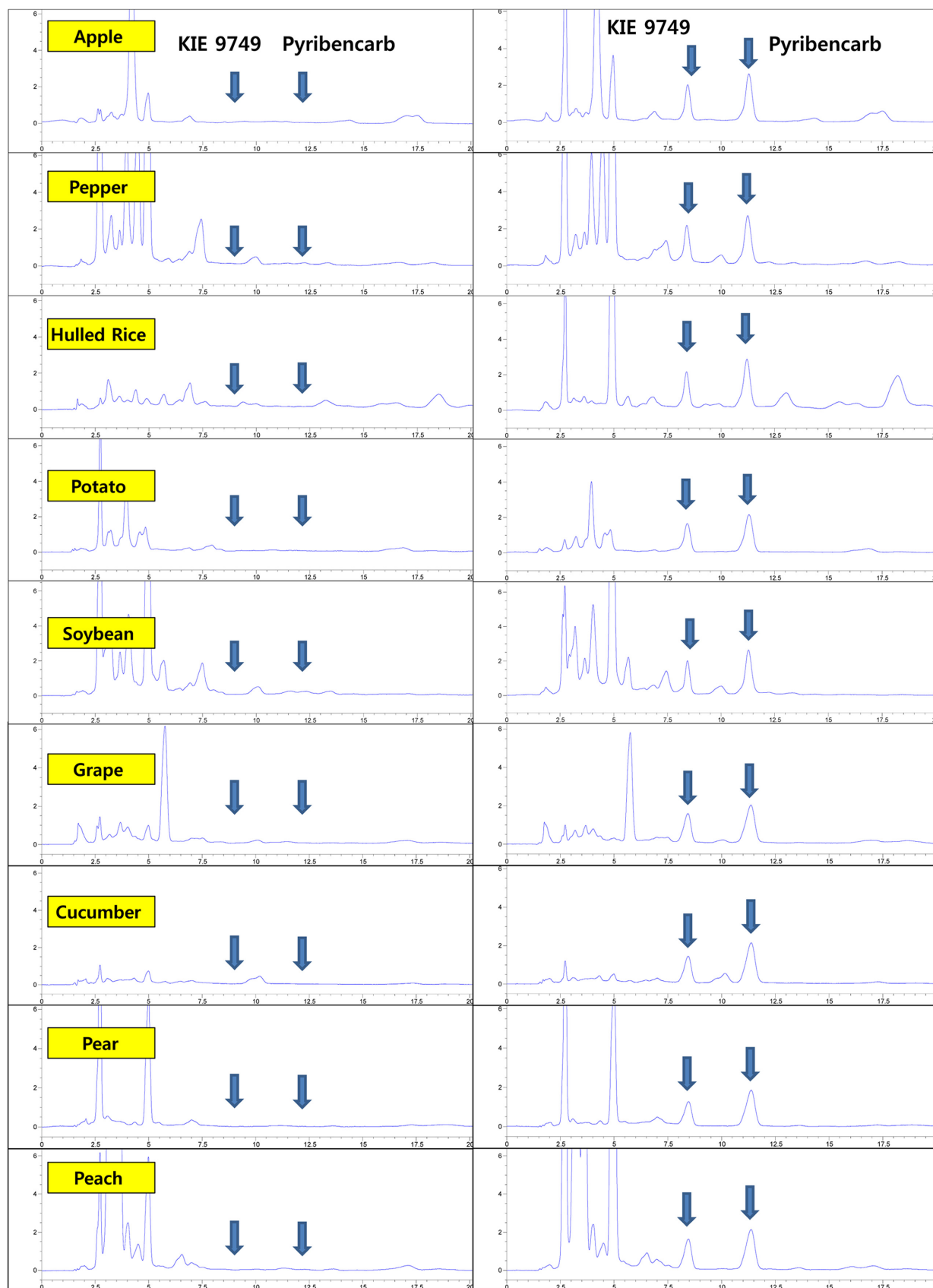


Fig. 4. Chromatograms of agricultural commodities extract obtained by sample preparation and HPLC analysis for pyribencarb and KIE-9749; blank (left) and spiked at 0.05 µg/g (right).

시간이 적합하여(Fig. 1) 이동상 조건으로 선정하였다. Pyri-bencarb와 대사물인 KIE-9749 표준용액의 직선성을 조사한 결과 0.25~25 µg/g의 농도 범위에서 상관계수는(R^2)는 0.9999 이상으로 양호하였다(Fig. 2와 3).

회수율 및 정량한계

본 연구에서 확립된 전처리법을 이용하여 농약이 처리되지 않은 대두, 사과, 고추, 감자, 현미, 배, 복숭아, 오이, 포도에 대하여 3수준으로 농약을 첨가하고 확립된 분석법을 이용하여 분석자를 달리하여 각각 회수율 시험을 실시하였으며 농산물별 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. Pyri-bencarb의 회수율과 RSD값은 분석자 A의 경우 82~104%와

2.7~7.4%였으며 분석자 B의 경우 78~108%와 2.8~12.2%였다. KIE-9749의 회수율과 RSD값은 분석자 A의 경우 74~104%와 3.1~8.5%였으며 분석자 B의 경우 77~114%와 1.7~15.0%를 보였다(Table 6와 7). 작물별로 두 분석자의 회수율의 유의성 검정을 위해 엑셀프로그램을 사용하여 F-검정과 독립표본 T-검정을 실시하였으며 계산된 T값을 Tale 8에 나타내었다. 계산된 T값은 95% 신뢰수준에서 T분포값보다 모두 작아 두 분석자의 회수율이 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 한편 T검정 외에 동일한 실험실에서 다른 날, 다른 분석자에 의해 실험된 결과의 정밀도는 intermediate precision으로 명명되며 전체 결과값에 대한 RSD값으로 표현될 수 있다(Tuzimski, 2015). 본 실험에서 intermediate

Table 7. Recoveries, RSDs (relative standard deviation) and LOQs (limit of quantification) of KIE-9749 in agricultural commodities

Sample	Spiked level (µg/g)	Analyst A		Analyst B		LOQ (µg/g)
		Recovery (%) ± SD	RSD (%)	Recovery (%) ± SD	RSD (%)	
Apple	0.05	87.0 ± 3.7		88.8 ± 1.0		0.05
	0.5	93.5 ± 1.2	4.8	91.9 ± 2.0	2.9	
	2.5	96.3 ± 2.3		91.2 ± 4.2		
Pepper	0.05	81.0 ± 1.6		92.2 ± 1.6		0.05
	0.5	91.7 ± 1.4	5.6	91.1 ± 1.0	1.7	
	2.5	89.6 ± 2.8		89.5 ± 1.1		
Hulled rice	0.05	87.2 ± 2.8		85.1 ± 1.2		0.05
	0.5	88.6 ± 3.0	3.1	89.1 ± 2.6	2.8	
	2.5	91.5 ± 1.5		89.5 ± 0.8		
Potato	0.05	91.2 ± 5.2		82.0 ± 3.6		0.05
	0.5	89.4 ± 1.7	3.1	85.1 ± 11.1	7.9	
	2.5	90.4 ± 1.5		91.3 ± 1.9		
Soybean	0.05	87.6 ± 6.0		84.5 ± 3.4		0.05
	0.5	80.4 ± 3.4	6.2	80.4 ± 2.0	5.6	
	2.5	79.0 ± 2.1		77.4 ± 6.1		
Grape	0.05	87.4 ± 4.3		104.5 ± 3.4		0.05
	0.5	88.2 ± 5.4	5.2	81.6 ± 4.6	14.3	
	2.5	82.9 ± 4.3		79.4 ± 1.2		
Cucumber	0.05	102.0 ± 1.0		113.7 ± 2.6		0.05
	0.5	88.7 ± 1.8	6.6	90.5 ± 0.8	12.0	
	2.5	89.5 ± 1.1		87.9 ± 2.0		
Pear	0.05	88.2 ± 0.8		106.4 ± 5.9		0.05
	0.5	73.9 ± 2.2	8.5	84.4 ± 11.7	15.0	
	2.5	76.5 ± 5.3		79.1 ± 4.4		
Peach	0.05	103.9 ± 0.7		80.1 ± 1.5		0.05
	0.5	91.6 ± 0.9	6.5	88.4 ± 0.7	4.1	
	2.5	90.2 ± 1.2		84.6 ± 0.5		

precision은 모든 농산물에 대하여 RSD값이 13.2% 이하로 양호하였다. 전체 9작물 두 성분의 18가지 경우 중 잔류농약 분석 경험이 6개월 미만이었다는 분석자 B의 RSD값이 5가지 경우에서 10%~15%에 분포한 경우를 제외한 모든 경우에서 국내기준(식품의약품안전처, 2013) 및 국제식품규격위원회(Codex)의 잔류분석법 기준(CAC/GL 40-1993)을 만

족하였다. 분석법상의 정량한계(LOQ)는 pyribencarb와 KIE-9749 모두 EU 가이드라인(SANTE 11945/2015)에 따라 잔류분석법 기준이 만족(회수율: 70~120%, RSD: $\leq 20\%$)되는 가장 낮은 첨가농도인 0.05 $\mu\text{g/g}$ 로 선정하였는데 이는 국제식품규격위원회(Codex) 및 국내에서 권장하는 기준인 잔류허용기준의 1/2 또는 0.05 $\mu\text{g/g}$ 이하의 정량한계에도 부합하였다.

Table 8. The comparison of the critical values of the t-distribution at 95% confidence level and the test statistics from independent two sample t-test with the results from two analysts

Sample	Pyribencarb		KIE-9749	
	t Stat ^{a)}	t Critical ^{b)}	t Stat	t Critical
Apple	1.086	2.120	0.890	2.120
Pepper	1.372	2.120	1.078	2.120
Hulled rice	-0.450	2.120	0.907	2.120
Potato	0.591	2.228	1.608	2.120
Soybean	0.486	2.120	0.643	2.120
Grape	0.706	2.131	-0.373	2.131
Cucumber	-0.866	2.201	-0.848	2.120
Pear	-0.264	2.120	-1.949	2.120
Peach	-0.781	2.201	0.790	2.120

^{a)} t Stat: test statistics.

^{b)} t Critical: critical values of t-distribution.

검출성분의 재확인

본 연구에서는 HPLC/UV/D로 검출된 농약의 잔류분을 재확인하기 위하여 LC/MS/MS 분석 조건을 확립하였으며 (Table 9) 표준용액의 크로마토그램은 Fig. 5에 나타내었다. Pyribencarb와 KIE-9749는 분자내에 amine기를 가지고 있기 때문에 ESI-positive 모드에서 분석법을 확립하였으며 Multiple reaction monitoring (MRM) mode를 사용하여 EU 가이드라인(SANTE 11945/2015)에서 권고하는 바에 따라 모분자가 protonated된 이온인 362.1을 precursor ion으로 하여 감도가 좋은 3개의 product ion을 정량 및 정성 이온쌍으로 선정하였다. 확립된 LC-MS/MS 조건을 이용하여 첨가농도 0.05 $\mu\text{g/g}$ 수준에서의 회수율 시험에 따른 농산물 추출물을 분석한 결과 크로마토그램에서 pyribencarb와 KIE-9749에 대한 방해피크는 나타나지 않았고 표준용액에서의 MRM 쌍들의 피크 면적 비율과 일치하였다(Fig. 5과 6).

Table 9. Ions and retention time (t_R) of pyribencarb and KIE-9749 for LC-MS/MS analysis

Analyte	t_R (min)	Precursor ion (m/z)	Quantification product ion (m/z)	Confirmation product ion (m/z)	Confirmation product ion (m/z)
Pyribencarb	6.3	362.1	207.1	239.0	122.0
KIE-9749	4.7	362.1	122.0	207.1	239.0

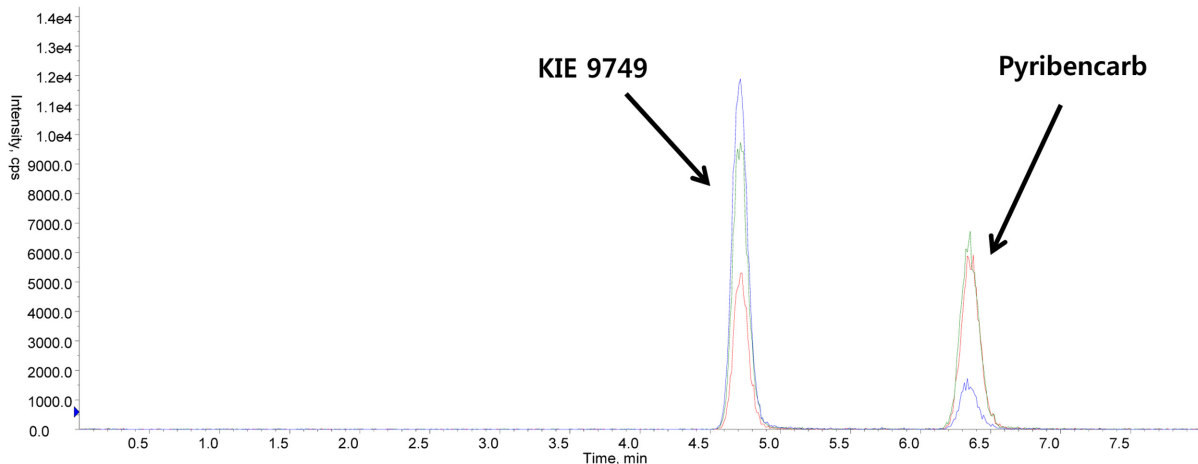


Fig. 5. LC-MS/MS chromatogram of standard solution (KIE-9749: 4.7 min, Pyribencarb: 6.3 min). Note: lines indicate MRM transitions (blue: m/z 362.1 \rightarrow 207.1; green: m/z 362.1 \rightarrow 239; red: m/z 362.1 \rightarrow 122.0).

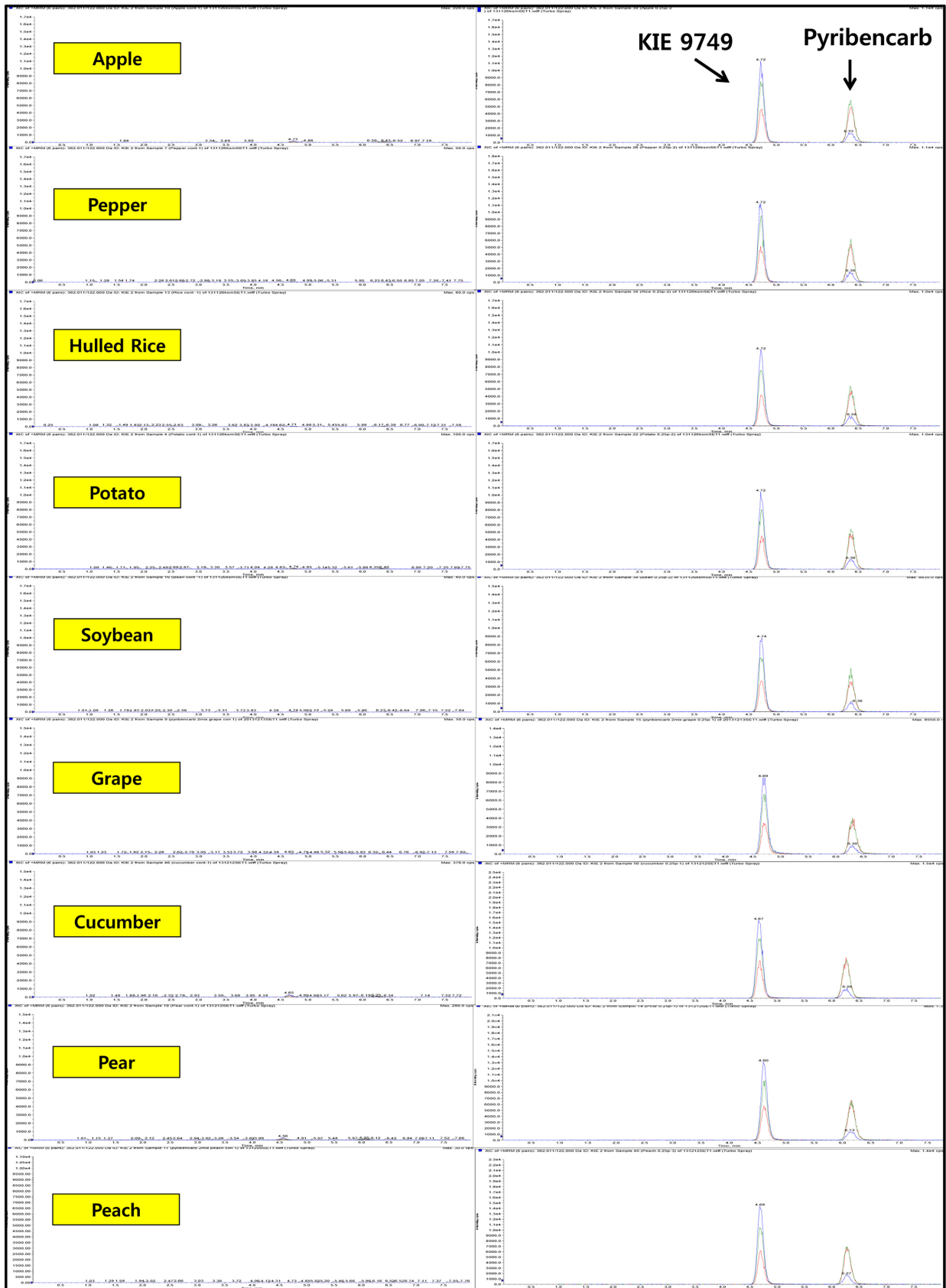


Fig. 6. Chromatograms of agricultural commodities extract obtained by sample preparation and LC/ESI-MS/MS analysis for confirmation; blank (left) and spiked at 0.05 $\mu\text{g/g}$ (right).

결 론

농산물의 안전성 확보를 위하여 pyribencarb와 그 대사물 KIE-9749에 대하여 5대 작물군의 대표작물인 사과, 고추, 감자, 현미, 대두와 잔류허용기준이 설정된 배, 복숭아, 오이, 포도를 이용하여 잔류농약 분석법을 개발하였다. 두 분석자가 실시한 분석법의 검증결과 pyribencarb의 회수율과 RSD 값은 78~108%, 2.7~12.2%였으며, KIE-9749의 회수율과 RSD값은 74~114%와 1.7~15.0%를 보였으며 LC-MS/MS에서 재확인이 가능하였다. 따라서 개발된 분석법은 농산물의 안전성 검사를 위한 공정분석법으로 사용하기에 타당한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호 : PJ011312)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Literature Cited

- Abreu, S. M., P. Caboni, P. Cabras, V. L. Garau and A. Alves (2006) Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine, *Analytica Chimica Acta* 573:291-297.
- Anastassiades, M., S. Lehotay, D. Štajnbaher and F. Schenck (2003) Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *AOAC International* 86(2):412-431.
- CAC/GL 40-1993 Revised Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, Rev.1-2003, http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg_040e.pdf
- Chonan, T. (2001) Determination of azoxystrobin in tea by HPLC, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42(4):249-251.
- Grimalt, S. and P. Dehouck (2016) Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes, *Journal of Chromatography A* 1433:1-23.
- Kataoka, S., M. Takagaki, K. Kaku and T. Shimizu (2010) Mechanism of action and selectivity of a novel fungicide, pyribencarb, *Journal of Pesticide Science* 35(2):99-106.
- Korea Crop Protection Association (2015) *Agrochemicals Use Guide Book*, pp. 86, 197, 390, Korea Crop Protection Association. Samjeong Publisher, Seoul, Korea.
- Li, J. Z., X. Wu and J. Y. Hu (2006) Determination of fungicide kresoxim-methyl residues in cucumber and soil by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Journal of Environmental Science and Health Part B* 41(4): 427-436.
- Ministry of Food and Drug Safety (2016) *Korea Food Code*, Republic of Korea.
- Ministry of Food and Drug Safety (2013) *Pesticide Analytical Residues Manual in Food Code (4th ed)*, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Republic of Korea.
- Rural development administration (2011) *Food composition table (8th revision)*, National Institute of Agricultural Sciences, Republic of Korea.
- Rural development administration Government 3.0 open information board http://rda.go.kr/board/board.do?prgId=opp_openinfoboard Accessed at 15 April 2016.
- Rural development administration (2014) Toxicity assessment and safety standard for pyribencarb, National Institute of Agricultural Sciences, Republic of Korea.
- Rural development administration (2015) Residue definition of pesticides for agricultural products, National Institute of Agricultural Sciences, Republic of Korea.
- SANTE/11945/2015 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf
- Takagaki, M., M. Ozaki, S. Fujimoto and S. Fukumoto (2014) Development of a novel fungicide, pyribencarb, *Journal of Pesticide Science* 39(3):177-178.
- Tomlin, C.D.S. (2012) *The pesticide manual*, 16th ed, British Crop Protection Council, UK.
- Tuzimski, T. and J. Sherma (2015) *High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis*, CRC Press, USA.

액체크로마토그래피를 이용한 농산물중 pyribencarb와 대사물 KIE-9749의 잔류 분석법

권혜영* · 홍수명 · 김택겸 · 김형진 · 문병철 · 경기성¹

농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, ¹충북대학교 환경생명화학과

요 약 농산물중 pyribencarb와 그 대사물 KIE-9749의 잔류분석법을 개발하였다. 분석법 개발에 사용된 농산물은 5대 작물군의 대표작물인 사과, 고추, 감자, 현미, 대두와 잔류허용기준이 설정된 배, 복숭아, 오이, 포도였다. 각 농산물은 아세톤으로 추출하였으며 액-액분배를 이용하여 1차 정제하고 Florisil solid phase extraction (SPE) cartridge와 aminopropyl SPE cartridge를 이용하여 2차 정제를 실시하는 조건을 확립하였다. 기기분석 조건은 HPLC/UVD 265 nm 파장에서 acetonitrile과 물을 이동상으로 사용하여 확립하였다. 확립된 분석법을 분석자를 달리하여 검증한 결과 pyribencarb의 회수율과 RSD값은 78~108%, 2.7~12.2%였으며, KIE-9749의 회수율과 RSD값은 74~114%와 1.7~15.0%를 보였다. 분석법의 정량한계(LOQ)는 두 성분 모두 0.05 µg/g이었으며 LC/ESI-MS/MS를 사용하여 확립된 정성조건에서 방해 피크는 발견되지 않았다. 확립된 분석법은 pyribencarb와 그 대사물 KIE-9749에 대한 농산물의 안전성 검사를 위해 사용될 수 있을 것이다.

색인어 분석법, 대사체 KIE-9749, 피리벤카브, 잔류