농약과학회지 (Korean J. Pestic. Sci.)
Vol. 21, No. 2, pp. 139-149 (2017)
Open Access https://doi.org/10.7585/kjps.2017.21.2.139
ORIGINAL ARTICLES

Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살균제 Picarbutrazox와 대사산물(TZ-1E)의 동시시험법 개발 및 검증

박신민 · 도정아* · 임승희 · 박원민 · 윤지혜 · 이동석[1] · 장문익[2]*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,
[1]한국식품과학연구원, [2]식품의약품안전처 감사담당관실

Development of Simultaneous Analytical Method for Determination of Fungicide Picarbutrazox and its Metabolite (TZ-1E) residues in Agricultural Products Using LC-MS/MS

Shin-Min Park, Jung-Ah Do*, Seung-Hee Lim, Won-Min Pak, Ji Hye Yoon, Dong Seok Lee[1] and Moon-Ik Chang[2]*

Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
[1]Korea Advanced Food Research Institute, Uiwang 16001, Korea
[2]Audit and Inspection Office, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea

(Received on April 20, 2017. Revised on June 23, 2017. Accepted on June 26, 2017)

Abstract The aim of this study was to develop an analytical method for residues of picarbutrazox and metabolite (TZ-1E) in agricultural samples. Picarbutrazox and TZ-1E were extracted with acetonitrile and partitioned with dichloromethane to remove the interfering substances, followed by purification by silica SPE cartridge to clean up in sample. Subsequently, the picarbutrazox and TZ-1E residues were quantified and confirmed by liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). Matrix matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.001-0.25 mg/kg) into blank extract with r^2>0.98. Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.001 and 0.005 mg/kg, respectively. The inter-laboratory study recovery results of picarbutrazox and TZ-1E were range between 82.6 to 113.8% and 79.4 to 104.8% at different concentration levels (LOQ, 10LOQ, 50LOQ, n=5) with relative standard deviation (RSD) less than 10%. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL40, 2003) and MFDS guidelines. Therefore, the proposed analytical method with corroborated accuracy, reproducibility, and sensitivity for picarbutrazox and TZ-1E will be used to as an official analytical method in Korea.

Key words Analytical method, fungicide, LC-MS/MS, picarbutrazox, picarbutrazox metabolite

서 론

소비자들의 생활수준의 향상으로 소비자의 권리 증대에 따른 농산물의 안전성과 기능성에 대한 필요로 인해 잔류농약 등 식품안전문제가 이슈화되고 있다(Wang et al., 2017; Zentai et al., 2016). 다양한 농산물 위해요소 중 잔류농약으로 인한 문제는 농산물에 대한 신뢰, 안전 문제로 이어지기 때문에 높은 수준의 관리가 필요하다. 잔류농약은 농산물에 살포된 농약이 작물체내에 부착하여 물리적, 환경적 요인 등으로 인해 감소하면서 잔류하거나 화학적 변화에 의해 다른 물질로 변하는 것을 의미하는데, 농약 자체의 독성 및 분해산물의 유독성, 발암성 및 먹이사슬에 따른 생물농축 등으로 위험성을 나타낼 가능성이 있다(Hu et al., 2016;

*Corresponding author
E-mails: jado@korea.kr (J.-A. Do), 1004@korea.kr (M.-I. Chang)

Akoto et al., 2015; Regueiro et al., 2015). 따라서 국내외 유통 농산물의 안전성 확보에 따른 잔류농약을 관리하기 위한 방안으로 1988년 농산물에 대하여 16종 농약에 대한 잔류허용기준을 신설한 이후 2017년 3월 현재 총 462종의 농약에 대한 기준을 설정하여 관리하고 있다(MRLs for Pesticide in Foods, 2016).

Picarbutrazox는 carbamate 및 pyridine계열 살균제로 *Phytophthora*속 및 *Pythium*속에 속하는 병원균을 저해하며 과채류, 엽채류, 양파 등의 작물에서 발생하는 역병 및 노균병 방제에 효과가 있다. 또한 벼, 잔디에 주로 발생하는 *Pythium*속에 관련한 병해에 대해서도 실용적인 효과를 갖는 것으로 보고되어 있다(Nippon Soda Co., 2014). Picarbutrazox의 IUPAC 명은 *tert*-butyl(6-{[(Z)-(1-methyl-1*H*-5-tetrazolyl)(phenyl) methylene]aminooxymethyl}-2-pyridyl) carbamate이며, 화학식은 $C_{20}H_{23}N_7O_3$이고 분자량은 409.45, n-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 4.16인 화합물로 비극성화합물의 특성을 나타낸다. 해당농약은 식물표면에서 햇빛에 의해 이성화되어 TZ-1E로 변이되며 이는 식물체내에서 대사산물인 TY-1, TZ-5, TY-2, TZ-5-Glc등 4종으로 대사된다(Nippon Soda Co., 2014) (Fig. 1). 그 중 최초 대사산물인 TZ-1E는 타 대사산물에 비해 가장 높은 잔류량을 나타내며 오이에서 total radioactive residue (TRR) 10% 이상으로 보고되었다(Nippon Soda Co., 2014). 또한 picarbutrazox에 대한 랫드의 급성 경구투여 독성시험에서 모화합물과 대사산물의 LD_{50}는 300-2,000 mg/kg이거나 2,000 mg/kg 이상으로 확인되었다. 만성독성시험 결과 체중감소, 갑상샘 호르몬의 변화 및 조직병리학적 변화 등이 관찰되었고, 발암성 시험결과 갑상샘 소포세포샘종 등을 유발하며 60 ppm 수준의 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, 최대무독성용량)을 나타내며 표적장기로는 간, 갑상샘과 신장임이 확인되었다(Ministry of Food and Drug Safety, 2016). 하지만 생식독성 및 기형독성은 없는 것으로 평가되어 발암성시험에서 관찰된 NOAEL을 근거로 식품의약품안전처(식약처)에서는 ADI (Acceptable Daily Intake, 일일섭취허용량)를 0.0234 mg/kg b.w./day로 설정하였다(Ministry of Food and Drug Safety, 2016). 따라서 농산물 중 잔류량 및 TRR 수치와 독성결과를 고려하여 picarbutrazox 및 대사산물 TZ-1E를 잔류물로 정의하여 관리할 필요가 있다. Picarbutrazox에 대한 국외기준은 2014년 일본에 등록신청이 되어있을 뿐 Codex (Codex Alimentarius, 국제식품규격위원회), EFSA (European Food Safety Authority, 유럽식품안전청), EPA (Environmental Protection Agency, 미국환경보호청)등의 경우 설정되지 않았다. 또한 국내의 경우 2016년 12월 감자, 양파, 포도, 멜론 및 오이에 대한 잔류허용기준이 0.05-0.7 mg/kg으로 신설되었으나 이를 분석하기 위한 시험법은 문헌에 보고된바 없으므로 이에 대한 안전관리를 위해 공정시험법 개발이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 잔류물의 정의를 고려하여 국내 유통 농산물 중 잔류 할 수 있는 picarbutrazox 및 대사산물 TZ-1E에 대한 잔류허용기준 적부판정을 위한 동시시험법을 개발하고자 하였다.

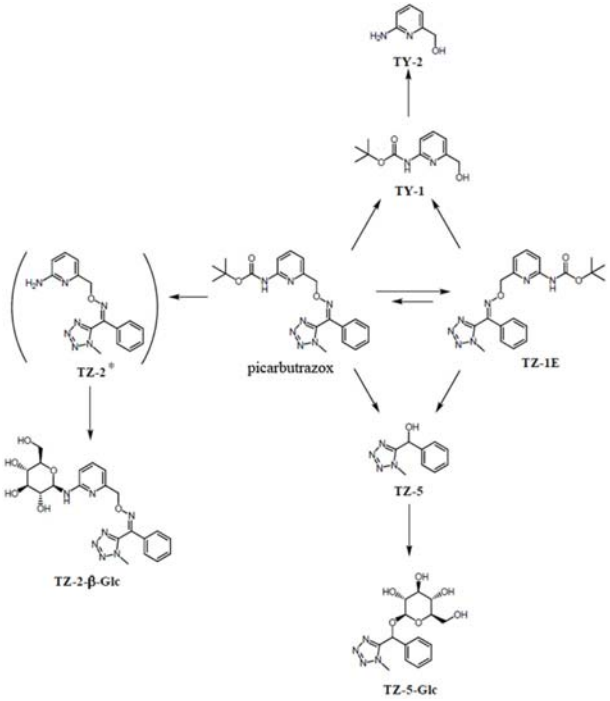

Fig. 1. Proposed metabolic pathways of picarbutrazox in plants.

재료 및 방법

시약 및 재료

Picarbutrazox (99.9%) 표준품은 Nisso chemical analysis (Japan)에서 제공받아 사용하였고, acetonitrile, dichloromethane, ethyl acetate, hexane 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 또한 sodium chloride는 Wako (Osaka, Japan), sodium sulfate는 Merck (Darmstadt, Germany), formic acid는 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였으며, SPE cartridge (1,000 mg, 6 cc)는 Waters (Milford, USA) 제품을 사용하였다. 농산물 시료는 식품의약품안전처에서 농산물 중 잔류농약 시험법 개발 시 규정하는 대표농산물 5종인 감귤, 감자, 고추, 대두, 현미를 사용하였다. 이는 국내에서 농약등록이 많은 품목으로 과일류(감귤), 서류(감자), 채소류(고추), 두류(대두), 곡류(현미)를 대표한 농산물로 선정된 것이며 해당 품목은 모두 무농약 농산물로 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -40°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

Picarbutrazox 및 대사산물 TZ-1E 표준품을 각각 20 mL의 acetonitrile에 용해하여 1,000 μg/mL의 표준원액을 조제하였고 각 표준품을 혼합하여 100 μg/mL 수준의 mixture 형태로 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 농산물 시료의 무처리 추출물 900 μL에 10 μg/mL 혼합된 표준용액 100 μL를 넣어 1.0 μg/mL의 matrix-matched 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 및 0.25 μg/mL의 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

균질화 된 시료 10 g을 칭량하여 균질기 용기에 넣고(곡류 및 콩류의 경우 증류수 20 mL를 넣어 30분간 습윤화) acetonitrile 50 mL를 가하여 진탕기에서 10분간 진탕하였다. 진탕 후 Whatman사의 No.2 filter paper와 부흐너깔때기를 이용해 흡인여과한 뒤 잔류물과 균질기 용기를 acetonitrile 20 mL로 씻어내려 앞의 여액과 합친 뒤 이를 40°C 이하 수욕상에서 감압 농축하였다. 농축된 추출물에 증류수 100 mL를 가하여 격하게 흔든 후 500 mL 용량의 separate funnel에 옮기고 sodium chloride 10 g을 더한 뒤 dichloromethane 30 mL를 가하고 진탕기에서 5분간 진탕하였다. 진탕한 뒤 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 dichloromethane 층을 sodium sulfate에 통과시켜 감압농축플라스크에 받는 과정을 2회 반복하였다. 이를 40°C 수욕 상에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 후, 잔류물에 dichloromethane 10 mL를 가하여 녹여 정제를 진행하였다. 또한 지방성 시료(현미, 대두)의 경우 잔류물에 acetonitrile을 포화시킨 *n*-hexane 30 mL를 잔류물에 가하여 녹인 후 250 mL 분량의 separate funnel에 옮기고 *n*-hexane을 포화시킨 acetonitrile 30 mL로 2회 분배하여 추출하였으며, 합친 acetonitile층을 40°C 수욕 상에서 감압 농축한 후 잔류물에 dichloromethane 10 mL를 가하여 녹여 정제를 진행하였다. 정제 cartridge인 silica cartridge (1000 mg, 6 cc)의 활성화를 위해 dichloromethane 10 mL를 초당 2~3 방울의 속도로 유출하여 버리고, 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정으로부터 얻은 추출액 중 5 mL를 cartridge 상단에 넣어 초당 1~2 방울의 속도로 유출시켜 씻어 버렸다. 그 후 고정상 상단이 노출되기 전 dichloromethane 10 mL를 유출시켜 버린 후 ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v) 혼합용액 5 mL를 유출시켜 감압농축플라스크에 받았다. 이를 40°C 수욕 상에서 감압농축 후 잔류물에 acetonitrile을 가하여 최종부피 5 mL가 되게 한 뒤 membrane filter (nylon, 0.2 μm)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

LC-MS/MS 분석조건

Picarbutrazox 및 TZ-1E의 동시잔류분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS, Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, Waters, USA)를 사용하였고, 역상칼럼(C_{18} column)을 선택하였으며 이동상으로 0.1% formic acid in acetonitrile과 0.1% formic acid in distilled water를 사용하여 최적화된 기울기 용리방식을 적용하였다. 대상성분의 이온화법은 ESI (electro-spray ionization)법의 positive-ion mode를 사용하였다(Table 1). 또한 확립된 기기분석조건으로 분석한 chromatogram의 signal to noise ratio (S/N ratio)에 근거하여 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification)를 설정하였다.

실험실내 및 실험실간 검증

확립된 picarbutrazox 및 TZ-1E 동시시험법의 선택성(selectivity)에 근거하여 정확성(accuracy), 직선성(linearity) 및 재현성(reproducibility)에 대해 유효성(efficacy)을 검증하였다. 선택성을 입증한 최적기기분석조건을 통해 직선성의 확인을 위하여 picarbutrazox 및 TZ-1E를 각 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준용액 0.001-0.25 μg/mL의 농도 범위에 대한 각각의 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of determination, r^2)를 구하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 각 시료의 무처리 시료에 picarbutrazox 및 TZ-1E 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 처리농도는 대표농산물 5종에 대하여 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도로 각 시료에 5반복으로 수행하였으며, 평균과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)를 계산하여 시험법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한 한국식품과학연구원에서 동일한 방법으로 본 시험법에 대한 실험실간 검증을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

결과 및 고찰

최적기기분석조건 확립

Picarbutrazox는 증기압이 1.2×10^{-7} Pa (50°C)으로 휘발성이 높아 최대 10^{-9} Pa의 휘발성 화합물까지 분석이 가능한 gas chromatograph (GC)를 이용해 잔류분석이 가능하였다. 하지만 GC가 통상 100~300°C의 온도조건에서 분석하는 기기임을 고려할 경우, picarbutrazox는 150°C 이상에서 분해되며 열에 불안정한 amino기를 갖는 분자구조적 특성으로 인해 GC분석이 어려웠던 것으로 판단되었다. 반면 picarbutrazox 및 TZ-1E의 화합물 구조에 비공유 전자쌍을 갖는 amide기가 포함되어 있고, 분자 내 이중결합이 conjugation

되어 있어 흡수강도가 증가하므로 HPLC-UVD를 이용한 분석이 용이하다고 판단되었다. 따라서 HPLC분석을 위해 PDA (Photodiode array) 검출기로 210 nm에서 360 nm까지 스캔한 결과 최대흡수 파장이 picarbutrazox는 222, 280 nm로, TZ-1E는 230, 280 nm임을 확인하였다. 그 중 222, 230 nm 파장의 경우 농산물 시료를 적용한 잔류분석 시 간섭물질의 영향을 크게 받을 것으로 추측되어 280 nm로 선정하였다. 하지만 picarbutrazox와 TZ-1E의 정량한계가 농산물에 대한 잔류허용기준 미설정으로 인해 0.05 mg/kg 수준으로 설정될 예정으로, HPLC-UVD로의 분석감도가 양호하지 않아 시험법의 선택성을 확보할 수 없었다. 따라서 picarbutrazox와 TZ-1E의 동시분석을 위해 양호한 분석 감도를 나타내며 시료의 간섭물질에 영향을 받지 않아 선택성이 높은 LC-MS/MS (Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry)를 분석기기로 선정하였다.

분석용 칼럼은 분석대상 물질의 Log P_{ow}가 4.16 (pH 6.7)로 중간극성을 띄는 점에 근거하여 극성물질에서 비극성물질까지 폭넓게 분리 가능한 C_{18} column을 이용하였고, 용리방식은 0.1% formic acid in acetonitrile과 0.1% formic acid in distilled water를 이동상으로 사용하는 기울기 용리방식으로 분석하였다. 이동상에 사용한 formic acid는 peak의 분리능 및 protonation enhancer로써 picarbutrazox 및 TZ-1E 분자의 dimethylamine기에서 protonation을 용이하게 하여 $[M+H]^+$ 이온생성에 용이하게 작용하였다(Rossmann, 2014). 각 대상성분의 이온화법으로는 ESI법의 positive-ion mode를 사용하였고 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. Picarbutrazox와 TZ-1E 혼합표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입하고 cone voltage의 변경(10-70 V)을 통해 exact mass가 409.18인 picarbutrazox의 경우 17 V, 동일한 관측질량인 TZ-1E의 경우 14 V에서 동일한 $[M+H]^+$ 형태인 410.1 mass의 이온 peak가 최대 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 최적화된 cone voltage에서 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(qualifi-

Table 1. Analytical conditions for the determination of picarbutrazox and TZ-1E

Instrument	LC:Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) MS/MS: US/Quattro Primier XE (Waters, Milford, MA, USA)		
UPLC conditions			
Column	XBridge® C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 μm)		
Column temp.	40°C		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in acetonitrile B: 0.1% formic acid in distilled water		
Gradient table	Time (min)	Mobile phase	
		A (%)	B (%)
	0.0	1	99
	1.0	1	99
	2.0	60	40
	6.0	65	35
	7.0	65	35
	9.0	35	65
	10.0	1	99
MS/MS conditions			
Ion mode	ESI positive mode		
Capillary voltage	3.0 kV		
Source temp.	120°C		
Desolvation temp.	300°C		
Desolvation gas flow	800 L/h		
Cone gas flow	150 L/h		

Table 2. Selected-ion of LC-MS/MS for picarbutrazox and TZ-1E

Compound	Retention time (min)	Molecular weight	Precursor ion (*m/z*)	Fragment monitored (*m/z*)	CE[a] (eV)
Picarbutrazox	6.70	409.2	410	107	28
				310[b]	13
TZ-1E	6.24	409.2	410	107	28
				310[b]	13

[a]Collision energy
[b]Quantitation ion

cation ion)으로 설정하여 확인하였다. 이에 따른 picarbutrazox 및 TZ-1E의 검출한계는 기기 chromatogram에서 S/N ratio 3 이상으로 결정하여 분석기기의 최소검출량 0.005 ng에 따른 검출한계는 0.001 mg/kg이었고, 정량한계는 S/N ratio 10 이상으로 설정하여 0.005 mg/kg로 확보되었다.

최종적으로 최적 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 2에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 시료 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 시료별 matrix-matched calibration curve를 산출하여 정량하였다.

추출 및 정제조건의 확립

Picarbutrazox 시험법은 문헌에 보고된 바 없으므로 물리화학적 특성을 고려하여 추출 및 정제조건을 확립하였다. 해당 농약은 Log P_{ow} 값이 4.16, pKa 값이 2.95인 화합물로 해리성이 크지 않고, pH 5-10 사이의 범주에서 비이온 상태로 존재하기 때문에 시료에 대해 별도의 pH 조절없이 유기용매를 이용해 비이온 상태로 추출 및 정제가 가능할 것으로 판단되었다(Fig. 2). 또한 Picarbutrazox의 이성체인 TZ-1E는 물리화학적 특성이 제시되지 않았으나 모화합물과 분자구조 및 분자식이 동일하므로 그 특성이 유사할 것으로 예상되어, 두 화합물을 용해도가 높은 수용성 유기용매로 동시추출 하고자 하였다. 추출 시 농산물 시료 내부로의 침투성을 용이하게 하고자 수용성 유기용매를 우선적으로 사용하는데 수용성 유기용매는 대표적으로 acetonitrile, acetone, methanol이 있다(Analytical methods of pesticide residues in foods, 4th, 2013). 먼저 acetonitrile을 이용하여 추출한 결과, 모화합물과 대사산물 모두 90% 이상의 높은 효율을 보였다. 또한 추출용매로 acetone과 methanol을 사용할 수도 있으나 acetonitrile에 비해 비극성 간섭물질에 대한 추출률이 높고, 과채류 및 서류 시료를 대상으로 추출비교한 결과 picarbutrazox, TZ-1E의 평균회수율이 acetone을 이용한 추출효율(90.0, 84.9%)보다 acetonitrile 추출 시(94.1, 96.3%) 더욱 효과적인 것으로 판단하여 추출용매로 사용하였다. 시료추출액 중 불순물 제거를 위해 수용성 용매 추출액에 섞이지 않는 비극성 용매인 dichloromethane을 이용한 liquid-

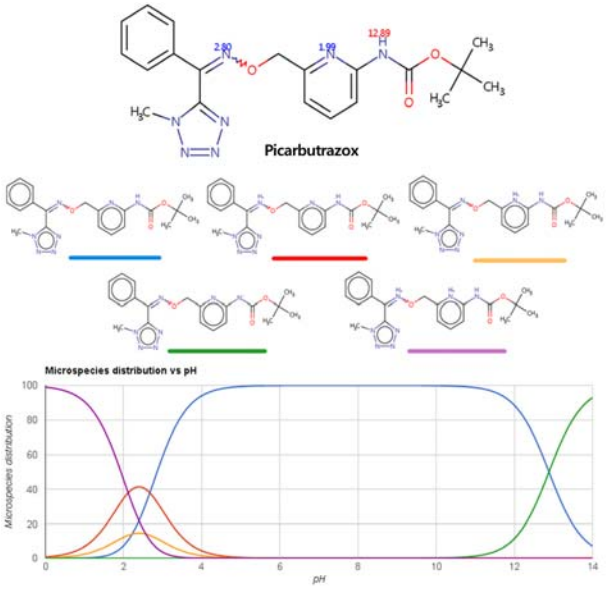

Fig. 2. Structure and pKa graph of picarbutrazox.

liquid partition extraction (LLE)을 적용하였다. 이는 Log P_{ow} 2 이상의 해리하지 않는 화합물에 적용하는 방법으로서 분석성분을 비극성 용매 쪽으로 분배시켜 극성이 높은 간섭물질을 제거하기 위함이다. 추가적으로 LLE시 sodium chloride 10 g을 첨가하여 salting-out 효과를 유도함으로서 수분층과 dichloromethane 층을 명확하게 분리하여 대상 물질의 분배효율은 높이고, 시료 내의 극성 불순물이 유기용매 층에 전이되는 것을 최소화 하였다. 그리고 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 시료에 대해서는 유지 성분이 분석하고자하는 화합물에 비해 상대적으로 비극성이라는 점에 착안하였고, 따라서 *n*-hexane/acetonitrile partition extraction을 이용하여 비극성 불순물을 추가적으로 제거하였다. 또한 분배 추출액 중에는 농산물 시료의 특성상 수분이 존재할 수 있는데, 이는 matrix effect를 최소화하기 위한 정제과정에 영향을 미칠 수 있으므로 sodium sulfate를 이용하여 탈수과정을 거쳤다.

시료 matrix effect를 최소화하여 분석물질의 선택성을 확보하기 위한 비극성 간섭물질의 정제는 흡착원리를 적용하여 hydroxyl기를 작용기로 갖는 florisil, silica cartridge

Table 3. Comparisons of SPE cartridge for picarbutrazox and TZ-1E analysis

Solvent ratio[a] (v/v)	Fraction	Florisil (%)		Silica (%)	
		P[b]	T[c]	P	T
100	1 (loading 10 mL)	-[d]	-	-	-
10/90	2 (10 mL)	79.3	3.1	67.8	26.0
20/80	3 (10 mL)	17.7	90.7	30.9	71.9
30/70	4 (10 mL)	-	-	-	-
40/60	5 (10 mL)	-	-	-	-
Total		97.0	93.8	98.7	97.9

[a]Solvent ratio of ethyl acetate/dichloromethane
[b]Picarbutrazox
[c]TZ-1E
[d] not detected

Table 4. Comparisons of elution solvents for picarbutrazox and TZ-1E analysis

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	Silica(%)	
			P[a]	T[b]
Ethyl acetate /n-Hexane	100 (*n*-Hexane)	1 (loading 10 mL)	-[c]	
	10/90	2 (10 mL)	-	
	20/80	3 (10 mL)	58.8	27.5
	30/70	4 (10 mL)	2.3	22.2
	40/60	5 (10 mL)	-	-
Total			61.1	49.7
Acetone/Dichloromethane	100 (Dichloromethane)	1 (loading 10 mL)	-	-
	10/90	2 (10 mL)	97.8	97.5
	20/80	3 (10 mL)	-	-
	30/70	4 (10 mL)	-	-
	40/60	5 (10 mL)	-	-
Total			97.8	97.5

[a]Picarbutrazox
[b]TZ-1E
[c] not detected

(1000 mg, 6 cc)를 이용하였다. 또한 정제용매는 두 cartridge 특성상 용매의 극성도 및 용출강도를 고려하여 그 조합을 달리하여야 중간극성과 비극성화합물의 정제가 가능하기 때문에 화합물에 대한 용해도 및 용매의 극성을 고려하여 상대적으로 극성, 비극성인 용매의 조합으로 정제를 진행하고자 하였다. 따라서 picarbutrazox에 대해 비교적 용해도가 높으며, 용출강도가 달라 분석하고자하는 화합물과 간섭물질간의 분리를 최대화 할 수 있도록 ethyl acetate (185 g/L, 0.58)와 dichloromethane (>250 g/L, 0.42)을 이용한 용매조합으로 정제효율을 비교하였다(Table 3). Picarbutrazox와 TZ-1E는 florisil cartridge의 ethyl acetate/dichloromethane (10/90, v/v)과 ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v) 분획에서 용출되었고 silica cartridge에서도 동일한 분획에서 용출되는 것을 확인하였으며 두 cartridge 모두 90% 이상의 높은 회수율(97.0, 93.8%와 98.7, 97.9%)을 확인하였다. 그 중 silica cartridge에서 보다 우수한 회수율을 나타내었는데, 이는 florisil cartridge에 비하여 화합물과의 흡착력이 약하므로 비극성 간섭물질을 효과적으로 제거함과 동시에 보다 높은 회수율을 나타낸 것으로 판단되었으며, 이를 정제 cartridge로 선정하였다. 또한 다른 용매조성과의 정제효율을 비교분석하기 위해 silica cartridge에 용매조성을 ethyl acetate/*n*-hexane, acetone/dichloromethane으로 달리 설정하여 모화합물과 대사산물의 회수율을 확인하였다(Table 4). Ethyl acetate/*n*-hexane 조성의 경우 20/80 (v/v), 30/70 (v/v)의 분획에서 용출되어 총회수율이 61.1, 49.7%로 확인되었고, acetone/dichloromethane 조성의 경우 10/90 (v/v)의 분획에서 각각 97.8, 97.5%로 회수율을 확인하였지만 기존 설정용매인 ethyl acetate/dichloromethane의 회수율(98.7, 97.9%)에 미치지 못한다는 점에 근거하여 ethyl acetate/dichloromethane를 정제용매로 선정하였다. 더욱 효과적인 정제를 위해 silica cartridge를 이용하여 ethyl acetate/dichloromethane의 분획을 세분화하고, 각 용매 조성에 대해 5 mL

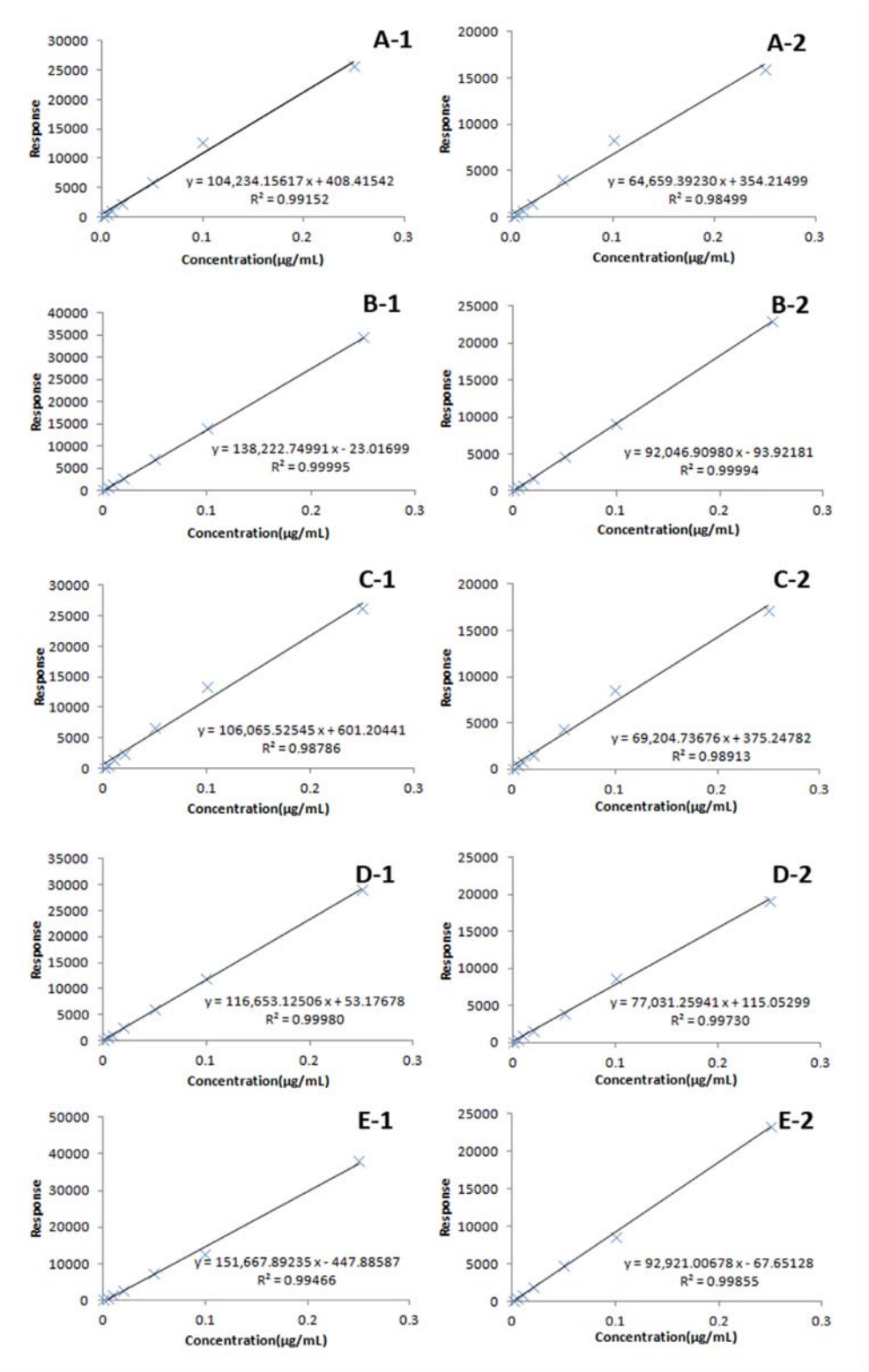

Fig. 3. Matrix matched calibration curves of (1) picarbutrazox and (2) TZ-1E in (A) mandarin, (B) potato, (C) green pepper, (D) soybean and (E) hulled rice.

씩 5개의 분획을 받아 정제 테스트를 진행하였다(Table 5). 그 결과, dichloromethane과 ethyl acetate/dichloromethane (2/98, v/v)으로 용출할 경우 picarbutrazox와 TZ-1E 모두 용출되지 않았고, 그 외의 용매조성에서는 두 화합물 모두 용출되었는데, ethyl acetate/dichloromethane (20/80, v/v)의 첫 번째 분획에서 각각 97.7, 99.5%로 가장 높은 회수율을

Table 5. Comparisons of solvent ratio on picarbutrazox and TZ-1E elution efficiency

Compound	Fraction	Elution efficiency (%)				
		Solvent ratio (v/v)[a]				
		100	2/98	5/95	10/90	20/80
Picarbutrazox	1 (5 mL)	-[b]	-	-	73.0	97.7
	2 (5 mL)	-	-	68.2	23.6	-
	3 (5 mL)	-	-	-	-	-
	4 (5 mL)	-	-	-	-	-
Total		-	-	68.2	96.6	97.7
TZ-1E	1 (5 mL)	-	-	-	-	99.5
	2 (5 mL)	-	-	35.5	40.5	-
	3 (5 mL)	-	-	38.0	54.6	-
	4 (5 mL)	-	-	2.7	-	-
Total		-	-	76.2	95.1	99.5

[a]Solvent ratio of ethyl acetate/dichloromethane
[b] not detected

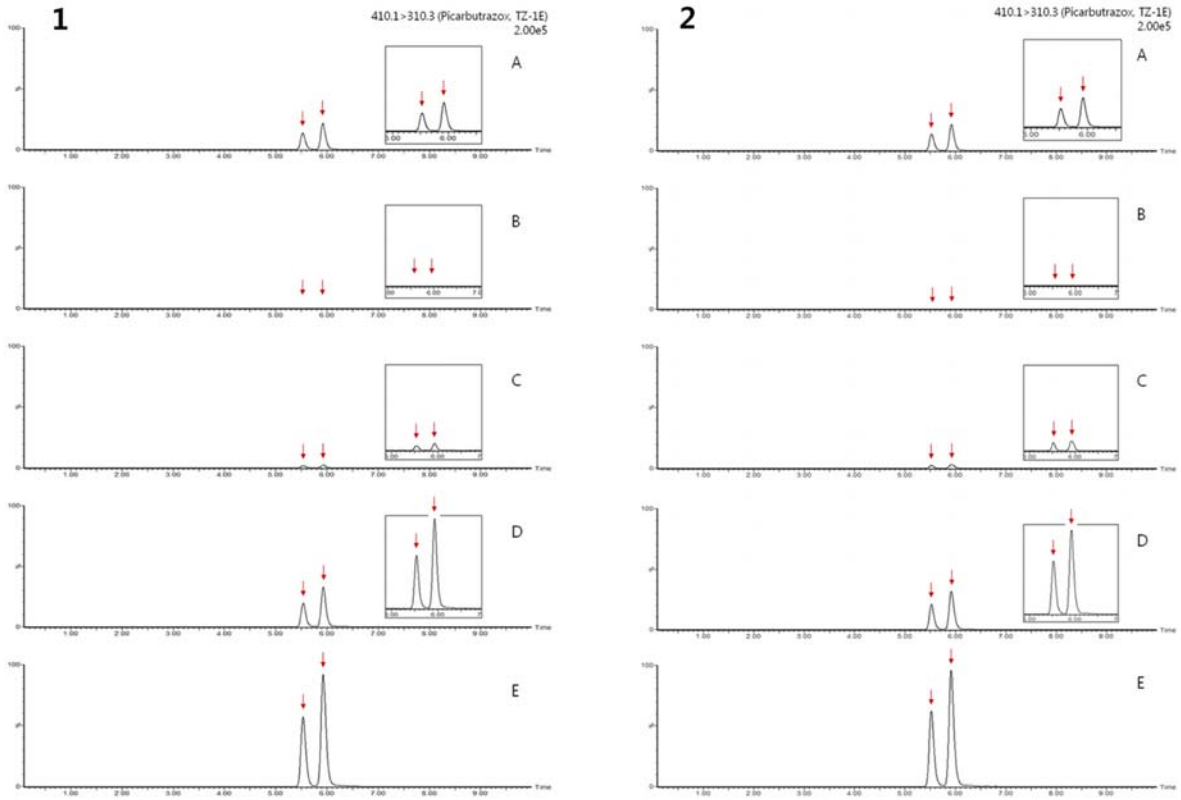

Fig. 4. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of picarbutrazox and TZ-1E corresponding to: 1 mandarin, 2 hulled rice, (A) standard solution at 0.05 mg/kg, (B) control, (C) spiked at 0.005 mg/kg, (D) spiked at 0.05 mg/kg and (E) spiked at 0.25 mg/kg.

보였다. 따라서 전체 회수율이 상대적으로 가장 높은 silica cartridge에 dichloromethane 10 mL으로 재용해한 추출액 5 mL을 cartridge에 용출시킨 후 dichloromethane 10 mL으로 세척한 뒤 dichloromethane/ethyl acetate (20/80, v/v) 5 mL를 용출시켜 받는 것으로 최종 정제방법을 확립하였다.

실험실내 검증

Picarbutrazox 및 TZ-1E의 선택성은 두 화합물의 혼합 표준품, 무처리 시료, 각 시료의 matrix-matched 혼합표준품 크로마토그램을 비교 평가하였다. 무처리 시료와 matrix-matched 혼합표준품을 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 무처리 시료 중 picarbutrazox와 TZ-1E의 머무름 시간과 질

량 대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 간섭물질도 검출되지 않아 본 시험법의 높은 선택성을 확인하였다. 또한, 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 표준원액을 각 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 및 0.25 μg/mL 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 결정계수(r^2)가 0.98 이상으로 높은 직선성을 보였다(Fig. 3).

시험법의 정확성을 평가하기 위하여 5종의 농산물 시료에 LOQ, LOQ의 10배, LOQ의 50배 수준인 0.005, 0.05와 0.25 mg/kg의 농도로 회수율 실험을 5회 반복하여 수행하였다. 시험 결과 각 농도에서 picarbutrazox의 평균 회수율은 85.1-108.6%이었고, TZ-1E의 평균 회수율은 77.4-110.0%이었다. 이때 상대표준편차는 9.8% 미만으로 분석되어 잔류물 분석에 관한 Codex 가이드라인(CAC/GL 40, 2003) 및 식약처 가이드라인(2016)을 참고한 잔류농약 분석 기준에서 상대표준편차가 처리농도 >0.001 mg/kg ≤0.01 mg/kg의 30%, >0.01 mg/kg ≤0.1 mg/kg의 20%, >0.1 mg/kg ≤1 mg/kg의 15% 이하로 분석되어 기준에 부합하므로 모든 분석물질에 대한 높은 정확성, 재현성, 효율성 확인 및 잔류농약 분석 기준에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 6). LC-MS/MS를 이용하여 분석한 picarbutrazox 및 TZ-1E의 회수율 크로마토그램을 Fig. 4에 제시하였다.

Table 6. Inter-laboratory validation results of analytical method for picarbutrazox and TZ-1E in samples

Pesticide	Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD (%)[a]		Average[d] (%)	CV[e] (%)
			MFDS[b]	KAFRI[c]		
Picarbutrazox	Mandarin	0.005	97.5 ± 7.6	101.4 ± 1.5	98.9	6.1
		0.05	108.6 ± 5.4	89.5 ± 2.8	101.4	10.8
		0.25	105.4 ± 9.3	85.3 ± 1.1	97.8	13.0
	Potato	0.005	99.4 ± 6.4	93.2 ± 1.6	97.1	6.0
		0.05	92.0 ± 4.7	110.1 ± 6.2	98.8	10.6
		0.25	95.8 ± 4.5	89.2 ± 1.6	93.3	5.1
	Green pepper	0.005	106.1 ± 3.9	94.0 ± 9.6	101.5	8.5
		0.05	100.1 ± 4.9	93.8 ± 0.7	97.8	5.1
		0.25	93.2 ± 2.0	86.7 ± 1.4	91.1	3.7
	Soybean	0.005	85.1 ± 8.0	105.8 ± 3.4	92.9	12.9
		0.05	91.7 ± 8.0	113.8 ± 4.9	100.0	13.0
		0.25	86.1 ± 9.8	98.1 ± 1.5	90.6	9.9
	Hulled rice	0.005	97.3 ± 9.6	83.3 ± 7.2	92.1	11.7
		0.05	99.0 ± 3.7	82.6 ± 3.5	92.8	9.8
		0.25	102.5 ± 3.7	96.1 ± 1.8	100.1	4.5
TZ-1E	Mandarin	0.005	100.9 ± 9.4	92.5 ± 2.0	97.8	8.6
		0.05	105.1 ± 5.1	85.3 ± 3.0	97.7	11.4
		0.25	110.2 ± 3.1	86.4 ± 1.3	101.2	12.4
	Potato	0.005	101.4 ± 4.5	79.4 ± 1.5	93.2	12.8
		0.05	90.8 ± 7.4	94.6 ± 6.5	92.2	7.0
		0.25	98.1 ± 4.1	85.3 ± 1.5	93.3	7.9
	Green pepper	0.005	92.2 ± 8.0	83.9 ± 8.6	89.1	9.4
		0.05	104.6 ± 4.2	91.1 ± 2.4	99.5	7.9
		0.25	99.0 ± 2.0	88.0 ± 1.2	94.9	6.3
	Soybean	0.005	77.4 ± 7.3	93.7 ± 2.6	83.5	11.4
		0.05	90.8 ± 8.5	104.8 ± 4.0	96.1	9.9
		0.25	87.1 ± 8.2	99.1 ± 1.1	91.6	9.0
	Hulled rice	0.005	82.4 ± 8.3	96.8 ± 9.2	87.8	11.7
		0.05	96.4 ± 1.8	99.4 ± 5.0	97.5	3.5
		0.25	103.3 ± 3.2	98.8 ± 2.7	101.6	3.6

[a]Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation
[b]Ministry of Food and Drug Safety
[c]Korea Advanced Food Research Institute
[d]Recovery average of inter-laboratory
[e]Coefficient of variation of inter-laboratory

실험실간 검증

시험법의 유효성 입증을 위해 개발한 시험법을 한국식품과학연구원에 제공하고 동일한 방법으로 분석을 수행한 후 회수율 및 표준편차를 비교함으로써 실험실간 검증을 진행하였다. 검증 결과 각 농도별 picarbutrazox의 평균 회수율은 82.6-113.8%이고 표준편차는 9.6% 미만으로 측정되었으며 TZ-1E의 평균 회수율은 79.4-104.8%이고 표준편차는 9.2% 미만으로 확인되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 picarbutrazox의 평균값은 90.6-101.5%, TZ-1E의 평균값은 83.5-101.6%로 변이계수(CV, %) 또한 모두 13% 미만으로 모든 처리구에서 Codex 가이드라인 및 식약처 가이드라인 에서 제시한 기준 처리농도 >1 μg/kg, ≤0.01 mg/kg의 45%, >0.01 mg/kg, ≤0.1 mg/kg의 32%를 모두 만족하여 시험법의 유효성을 입증하였다(Table 6).

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전처의 연구사업 “2016년 농약잔류허용기준 신규 설정 및 개정을 위한 안전관리 근거 마련 연구(16161위생안009)”의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Literature cited

Akoto, O., J. Oppong-Otoo and P. Osei-Fosu (2015) Carcinogenic and non-carcinogenic risk of organochlorine pesticide residues in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in Ghana. Chemosphere 132: 193-199.

CODEX Alimentarius Commission (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis.

Hu, Y., Y. H. Chiu, R. Hauser, J. Chavarro and Q. Sun (2016) Overall and class-specific scores of pesticide residues from fruits and vegetables as a tool to rank intake of pesticide residues in United States: A validation study. Environ. Int. 92:294-300.

Ministry of Food and Drug Safety (2013) Practical commentary Korean Food Standards Codex pesticide residues analysis method.

Ministry of Food and Drug Safety (2016) MRLs for Pesticide in Foods.

Ministry of Food and Drug Safety (2016) Picarbutrazox Safety Evaluation Report.

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2016) MFDS Guideline for standard operating procedure of Korean food analytical methods.

Nippon Soda Co., LTD (2014) Amended report.

Regueiro, J., O. López-Fernndez, R. Rial-Otero, B. Cancho-Grande and J. Simal-Gándara (2015) A review on the fermentation of foods and the residues of pesticides-biotransformation of pesticides and effects on fermentation and food quality. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 55(6):839-863.

Rossmann, J., S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel and W. Kirch (2014) Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC - MS/MS. J. Chromatogr. B. 969:162-170.

Wang, J., W. Chow, J. S. Chang and J. W. Wong (2017) Development and validation of a qualitative method for target screening of 448 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap based on data-independent acquisition and compound database. J. Agric. Food Chem. 65(2):473-493.

Zentai, A., I. J. Szabó, K. Kerekes and Á. Ambrus (2016) Risk assessment of the cumulative acute exposure of Hungarian population to organophosphorus pesticide residues with regard to consumers of plant based foods. Food Chem. Toxicol. 89:67-72.

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살균제 Picarbutrazox와 대사산물(TZ-1E)의 동시시험법 개발 및 검증

박신민 · 도정아* · 임승희 · 박원민 · 윤지혜 · 이동석[1] · 장문익[2]*

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,
[1]한국식품과학연구원, [2]식품의약품안전처 감사담당관실

요 약 본 연구는 농산물 중 2017년 기준신설예정농약 picarbutrazox에 대한 공정시험법을 개발하고자 수행하였다. Picarbutrazox 잔류물의 정의는 대사산물 TZ-1E를 포함하므로 이를 동시에 분석하기 위한 시험법을 개발하였고, 확립된 시험법은 실험실내 및 실험실간 검증을 통해 공정시험법으로의 유효성을 확인하였다. Picarbutrazox의 물리화학적 특성을 고려하여 대사산물 TZ-1E의 동시분석을 위해 LC-MS/MS를 분석기기로 사용하였으며, acetonitrile으로 추출 후 유기용매를 이용하여 액액분배조건 및 silica cartridge를 이용한 SPE 정제조건을 확립하여 시료의 불순물을 효과적으로 정제하는 시험법을 개발하였다. 개발된 picarbutrazox 및 대사산물 TZ-1E 동시시험법의 직선성은 결정계수(r^2)가 0.98 이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.001, 0.005 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 대표 농산물 5종(감귤, 감자, 고추, 대두, 현미)에 대한 시험법 검증결과 평균 회수율(5반복)은 picarbutrazox 및 TZ-1E 각각 85.1-108.6%, 77.4-110.2%였고, 분석오차는 picarbutrazox 및 TZ-1E 각각 9.8%, 9.4% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 외부기관인 한국식품과학연구원과의 실험실간 검증 결과에서 평균 회수율은 모화합물과 대사산물 각각 82.6-113.8%, 79.4-104.8%를 나타내어 모두 Codex 가이드라인 및 식약처 가이드라인의 기준에 부합하는 것으로 확인되었다. 따라서 개발된 시험법은 낮은 검출한계 및 정량한계, 우수한 직선성, 회수율 시험을 통한 양호한 정밀성 및 재현성 등이 입증되어 농산물 중 picarbutrazox 및 대사산물 TZ-1E의 동시분석을 위한 식품공전 공정시험법으로 활용되기에 적합한 것으로 판단된다.

색인어 시험법, 살균제, LC-MS/MS, picarbutrazox, picarbutrazox 대사산물