

Development and validation of an analytical method for fungicide fenpyrazamine determination in agricultural products by HPLC-UVD

Hyejin Park¹, Jung-Ah Do¹, Ji-Eun Kwon¹, Ji-Young Lee¹, Yoon-Jae Cho¹, Heejung Kim¹,
Jae-Ho Oh², Kyu-Sik Rhee¹, Sang-Jae Lee³ and Moon-Ik Chang^{1,★}

¹Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk, 363-700, Korea

²Food Safety Risk Assessment Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk, 363-700, Korea

³Department of Food Safety Evaluation, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk, 363-700, Korea

(Received September 30, 2013; Revised May 29, 2014; Accepted May 29, 2014)

HPLC-UVD를 이용한 살균제 fenpyrazamine의 시험법 개발 및 검증

박혜진¹ · 도정아¹ · 권지은¹ · 이지영¹ · 조윤제¹ · 김희정¹ ·
오재호² · 이규식¹ · 이상재³ · 장문익^{1,★}

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 잔류물질과,
²식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가과,
³식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부
(2013. 9. 30. 접수, 2014. 5. 29. 수정, 2014. 5. 29. 승인)

Abstract: Fenpyrazamine which is a pyrazole fungicide class for controlling gray mold, sclerotinia rot, and Monilinia in grapevines, stone fruit trees, and vegetables has been registered in republic of Korea in 2013 and the maximum residue limits of fenpyrazamine is set to grape, peach, and mandarin as 5.0, 2.0, and 2.0 mg/kg, respectively. Very reliable and sensitive analytical method for determination of fenpyrazamine residues is required for ensuring the food safety in agricultural products. Fenpyrazamine residues in samples were extracted with acetonitrile, partitioned with dichloromethane, and then purified with silica-SPE cartridge and eluted with hexane and acetone mixture. The purified samples were determined by HPLC-UVD and confirmed with LC-MS and quantified using external standard method. Linear range of fenpyrazamine was between 0.1~5.0 µg/mL with the correlation coefficient (r) 0.999. The average recovery ranged from 71.8 to 102.7% at the spiked level of 0.05, 0.5, and 5.0 mg/kg, while the relative standard deviation was between 0.1 and 7.3%. In addition, limit of detection and limit of quantitation were 0.01 and 0.05 mg/L, respectively. The results revealed that the developed and validated analytical method is possible for fenpyrazamine determination in agricultural product samples and will be used as an official analytical method.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-5305 Fax : +82-(0)43-719-5300

E-mail : jado@korea.kr

요 약: Pyrazole계 살균제 fenpyrazamine은 복숭아 (2.0 mg/kg), 포도 (5.0 mg/kg) 및 감귤 (2.0 mg/kg)에 잔류허용기준이 설정된 신규농약으로 농산물 중 fenpyrazamine 잔류량을 측정하기 위해 고성능 액체크로마토그래프를 이용한 정확하고 신뢰성 있는 효율적인 공정 시험법을 확립하고자 하였다. 추출용매는 acetonitrile로 선정하였으며, 액-액 분배 단계에서 dichloromethane과 물의 분배로 극성불순물을 제거하였고, 정제단계에서는 silica cartridge를 이용하여 hexane/acetone 용매 조성으로 다양한 매트릭스 간섭 물질로부터 fenpyrazamine을 효과적으로 정제할 수 있었다. 확립된 시험법으로 7종의 대표농산물[과일류 (복숭아, 포도, 감귤), 채소류 (고추), 서류 (감자), 콩류 (대두), 곡류 (현미)]에 처리농도 0.05, 0.5, 5.0 mg/kg으로 각각 5 반복의 회수를 실험을 시행한 결과 회수율 범위가 71.8~102.7%이었고, 분석오차가 10% 미만으로 시험법의 정확성을 확인하였으며, LC-MS를 통한 재확인 과정을 수행함으로써 시험법의 신뢰성과 선택성을 확보할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물에 잔류하는 fenpyrazamine을 분석하기 위한 공정 시험법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

Key words: fenpyrazamine, pyrazole fungicide, HPLC-UVD, LC-MS

1. 서 론

잣빛곰팡이병은 전세계적으로 널리 분포하며 시설 재배를 하는 토마토, 오이, 딸기 등의 과채류뿐만 아니라, 노지에서 재배하는 포도, 감귤 등의 과수에서 발병하며, 부생적 성질이 강하므로 작물의 생육시기에 수확부위가 주요 피해대상이 되고 또한 2차적으로 저장, 운송, 판매중의 열매와 채소류에 발병하여 막대한 경제적 손실이 큰 주요 병해이다.¹ Fenpyrazamine은 일본 Sumitomo Chemical에서 개발한 pyrazole계 살균제로 2000년부터 Sumitomo Chemical에서의 각종 잔류 및 독성평가를 실시하였으며, 작물에 빠르게 침투하여 곰팡이의 발아관과 균사체 신장을 억제하는 작용기작으로 채소류 등의 잣빛곰팡이병 등에 대해 높은 방제효과를 나타내고, 작물, 비표적 생물, 포유동물에 고도의 안전성과 낮은 환경지속성으로 수확 전까지 다양한 작물에 사용이 가능하다. 더욱이 2005년부터는 일본식물방역협회를 통한 약효약해시험을 진행하였으며, 지금까지 토마토, 가지, 오이 잣빛곰팡이병, 균핵병, 포도, 감귤, 딸기 잣빛곰팡이병에 대하여 높은 실용성이 확인되었다.²⁻⁴

Fenpyrazamine의 외국 등록 및 잔류허용기준 설정 현황을 살펴보면, 유럽의 경우 유럽연합 (European Union, EU)에서 2009년에 50% 과립수화제로 등록 (Regulation (EC) No 1107/2009) 되었고, 아몬드 (0.01 ppm), 딸기 (3.0 ppm), 복숭아, 살구 등 (4.0 ppm) 등의 잔류허용기준이 설정되어 있다 (Regulation (EC) No 396/2005).⁵ 미국에서는 미국 환경보호청 (US Environmental Protection Agency)에서 2013년에 미국

연방 살충제, 살균제, 살서제법 (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, FIFRA)에 따라 아몬드와 피스타치오 (0.02 ppm), 인삼 (0.7 ppm), 잎상추 (2.0 ppm), 산딸기류 열매 (5.0 ppm) 등의 잔류허용기준을 설정했다 (78 Fed. Reg. 14,461).⁶ 국내에서는 fenpyrazamine의 잣빛곰팡이병 및 잣빛무늬병에 대한 농약품목등록시험, 약효약해시험, 제품독성시험, 잔류시험 등을 거쳐 2013년에 사용 등록을 신청하였다. 국내·외 독성평가결과, 장기적으로 노출되더라도 인체에 대한 안전성이 높은 것으로 나타났고, 식물체내 대사시험, 작물잔류시험에서는 약제 성분이 식물체에서 빠르게 분해되어 작물 잔류 정도가 낮으며 동물의 체내에서도 빠르게 대사, 배설됨을 확인하였다.⁷ 현재 fenpyrazamine에 대한 국내 일일섭취허용량 (Acceptable daily intake, ADI)은 식품의약품안전처에서 2013년에 0.053 mg/kg b.w./day로 설정하였다.⁸ 2013년에 복숭아 (2.0 mg/kg), 포도 (5.0 mg/kg) 및 감귤 (2.0 mg/kg)에 잔류허용기준을 설정한 신규농약으로, 이에 따라 본 연구에서는 국내 생산 및 향후 수입되는 다양한 농산물 중 잔류할 수 있는 fenpyrazamine에 대한 안전성을 확보하기 위해 잔류량을 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 효율적인 공정 시험법을 확립하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 재료

Fenpyrazamine (99.3%) 표준품은 Sumitomo Chemical에서 제공받아 20.14 mg을 methanol 20 mL에 용해하

여 1,000 µg/mL (1,000 ppm)의 표준원액을 조제하고, 이를 60% methanol로 희석하여 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 µg/mL의 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4 °C에 보관하여 실험에 사용하였다.

Acetonitrile, dichloromethane, acetone, n-hexane 등은 HPLC grade로써 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. Sodium chloride와 sodium sulfate anhydrous는 Wako (Osaka, Japan)로부터, formic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 실리카 (silica) SPE 카트리지는 Waters (Milford, MA, USA)로부터 구입하였다. 검체는 국내 사용기준 설정을 위한 복숭아, 포도와 그 외의 농산물인 현미, 대두, 감자, 감귤, 고추 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50 °C에 보관하고 실험에 사용하였다.

2.2. 추출 및 정제

검체를 분쇄하여 균질화한 후 20 g (곡류 및 콩류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 µm를 통과하도록 분쇄한 20 g, 과일류, 채소류, 서류는 약 1 kg을 분쇄한 20 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고(곡류 및 콩류의 경우 물 30 mL를 넣어 2 시간 방치) acetonitrile 100 mL를 가하여 진탕기에서 5 분간 진탕하였다. 이를 여과지가 깔려있는 부호너깔때기로 흡인여과하였고, acetonitrile 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내어 앞의 여액과 합한 후 40 °C 이하의 수욕상에서 감압농축을 실시하였다. 이를 물 50 mL로 씻어서 500 mL 분액깔대기에 옮기고 포화식염수 20 mL 및 dichloromethane 100 mL를 차례로 가한 후 세게 흔들고 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 후 dichloromethane층을 sodium sulfate anhydrous에 통과시켜 감압농축플라스크에 받는 과정을 2 회 반복하였다. 이를 40 °C 이하 수욕상에서 감압농축한 후 잔류물을 n-hexane 4 mL로 재용해하고 실리카 카트리지에 n-hexane 10 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버렸다. 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출과정으로부터 얻은 n-hexane 4 mL에 녹인 액을 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출시켜 씻어 버리고 고정상 상단이 노출되기 전에 hexane/acetone(95/5, v/v) 10 mL를 유출시켜 버리고 hexane/acetone(85/15, v/v) 10 mL를 유출시켜 받은 시험액을 감압농축플라스크에 취하였다. 이를 40 °C 이하 수욕상에서 감압농축하고 60% methanol 2 mL에 녹여 0.2

Table 1. Analytical conditions for the determination of fenpyrazamine residues

| Instrument | HPLC-UV (Waters 2695) |
|--------------------|--|
| Column | Kinetex C ₁₈ (5 µm, 4.6 mm I.D. × 250 mm, Phenomenex) |
| Column temperature | 25 °C |
| Mobile phase | H ₂ O / Methanol (40/60, v/v) |
| Flow | 1.0 mL/min |
| Detection | Absorption (243 nm) |
| Injection volume | 20 µL |

Table 2. Confirmative conditions for identifying fenpyrazamine

| Instrument | LC-MS (Quattro Premier XE, Waters, USA) |
|--------------------|--|
| Column | UG 120 C ₁₈ (3 µm, 2.0 mm I.D. × 150 mm, Shiseido, Japan) |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Mobile phase | 0.1% formic acid in water/0.1% formic acid in methanol (40/60, v/v) |
| Column temperature | 30 °C |
| Ionization mode | ESI positive-ion mode |
| Cone voltage | 30 V |
| Injection volume | 5 µL |

µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

2.3. 기기분석

Fenpyrazamine 분석을 위해 HPLC-UV (High performance Liquid Chromatograph-ultraviolet detector)를 사용하였으며, Table 1에 기기분석 조건을 나타내었다. 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer)을 이용하여 Table 2에 나타난 기기분석 조건에서 재확인 과정을 수행하였다.

2.4. 시험법 검증

본 연구에서 확립된 추출 및 정제 방법과 기기분석법을 검증하기 위해서 농약을 처리되지 않은 농산물 시료에 처리농도 3 수준(0.05, 0.5, 5.0 mg/kg)으로 fenpyrazamine을 첨가하여 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 구하였고 이를 근거로 분석법의 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 기기선정과 HPLC 분석조건 확인

Fenpyrazamine은 분자량 (331.4)이 크고 증기압이

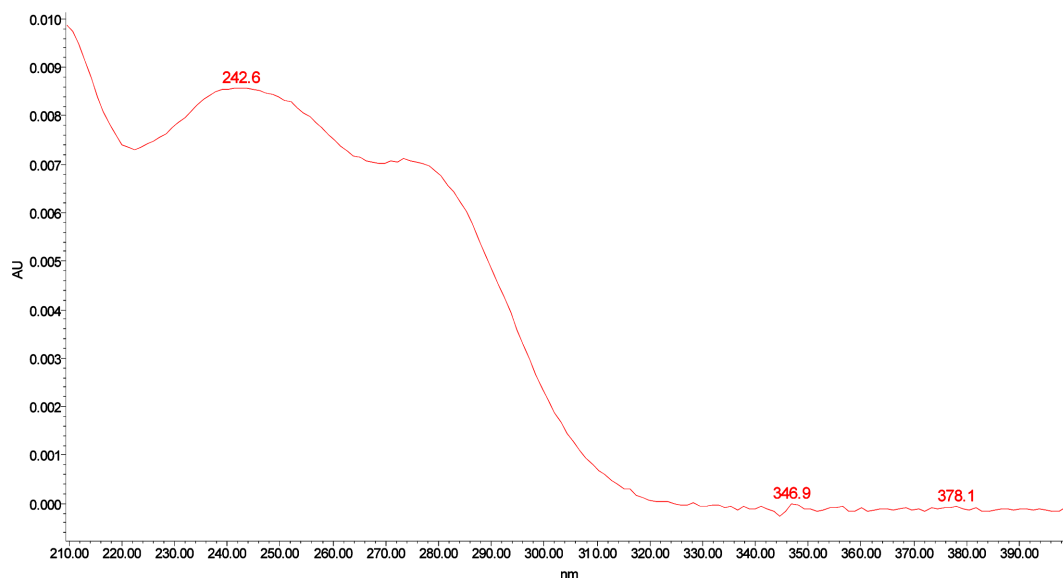


Fig. 1. HPLC-UV-Vis spectrum of fenpyrazamine.

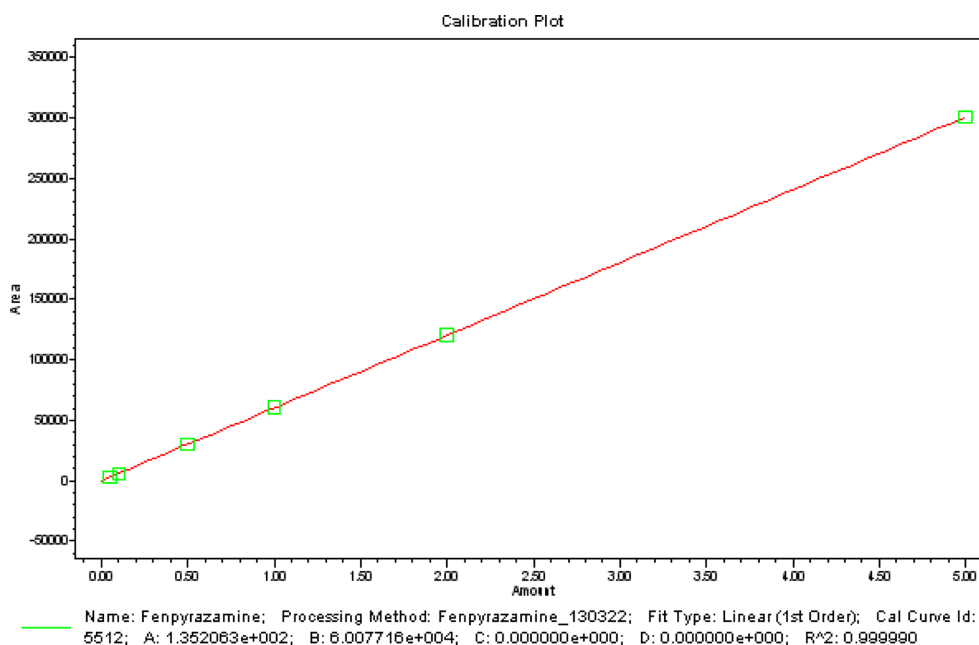


Fig. 2. Calibration curve of fenpyrazamine standard solution.

2.89×10^{-8} Pa (25 °C)로 휘발성이 낮고 Log P_{ow} 가 3.52로 중간 비극성인 화합물로 분자 구조상 pyrazole 구조가 있어 특정 UV에서 파장대에서 강한 흡광성을 나타낼 것으로 판단하여 fenpyrazamine 분석을 위해 HPLC를 분석기로 선정하였다. 또한 칼럼은 fenpyrazamine이 비극성에 가까운 중간극성의 특징을

가지고 있는 것을 고려하여 HPLC에서 여러 종류의 시료에 범용적으로 사용할 수 있는 비극성 칼럼인 C_{18} 을 사용하였다. 이에 HPLC-PDA 검출기를 이용하여 fenpyrazamine 표준용액 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 210에서 400 nm 범위에서 스캔한 결과, 243 nm를 최적흡수파장으로 확인하였으며(Fig. 1) 이를 분석을 위한 파장으로

선택하였다. 이동상으로는 distilled water와 methanol을 사용하였으며 isocratic 조건에서 이동상 비율을 조절하여 측정된 결과, distilled water/methanol 40/60 (v/v) 비율에서 가장 우수한 효율을 보였다.

확립된 기기분석 조건에서 fenpyrazamine의 직선성(linearity)을 구하기 위하여 methanol로 희석하여 제조한 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 그리고 5.0 µg/mL의 표준용액 20 µL를 HPLC-UVD에 주입하여 위에서 확립된 기기분석 방법으로 분석한 결과, 상관계수 (r) 0.9999 이상으로써 우수한 직선성을 보여주었다(Fig. 2).

3.2. 추출, 분배 및 정제과정 확립

Fenpyrazamine의 최적 추출 용매 선정에 위해 비극성의 잔류농약 추출에서 많이 사용되어지는 acetone, acetonitrile, methanol을 가지고 추출 효율을 비교하였다. 세 용매 모두 추출 효율이 95% 이상으로 효과적이나 methanol의 경우 감압여과시 용매의 점성으로 인해 시간이 많이 소요되고 농축시에 bumping이 매우 심하다는 단점을 가지고 있고 acetone의 경우도 농축시 약간의 bumping이 있고 지방이나 색소 등의 공추출물이 많아 간섭물질 제거에 어려움이 있었다. 따라서 이 실험에서는 공추출물이 적고 추출 효율도 가장 높은 acetonitrile을 추출 용매로 선정하였다.

첫 번째 정제과정에서는 액-액 분배법으로 극성추출액을 비극성 용매인 dichloromethane을 사용하여 극성이 높은 각종 간섭물질을 제거하였는데, dichloromethane 100 mL 씩 2 회 분배할 때 높은 분배효율과 회수율을 얻을 수 있었다. 두 번째 정제과정에서는 SPE 카트리지를 이용하여 약한 강도의 용매로 fenpyrazamine은 충전물에 흡착시키고 그 이외의 비극성 간섭물질은 통과시키고, 이어서 용매 강도를 증가시켜 fenpyrazamine은 충전물을 통과시켜 더 극성의 불순물은 충전물에 머무르게 하여 간섭물질을 제거하는 흡착방법을 사용하였다. Fenpyrazamine은 중간 비극성 농약으로 흡착 원리에 의한 머무름으로 불순물과의 분리를 위해 hydroxyl기를 작용기로 가진 흡착 카트리지가인 florisil과 silica를 이용해 효율을 비교하였고, 이동상은 용출강도가 용매의 극성이 커지는 방향인 순상으로 hexane/acetone의 용매 조성을 사용하여 정제 효율을 비교해 본 결과, silica 카트리지보다 florisil 카트리지보다 높은 회수율을 보였다(Table 3). 이는 florisil 카트리지의 경우 극성물질에 대한 강한 흡착성을 띄고 있어서 fenpyrazamine과의 흡착이 silica 카트리지 보다 강하게 나타났다고 판단되었다. 보다 효과적인 정제 효율을 알아보기 위해

Table 3. Comparisons of SPE cartridge and elution solvents for fenpyrazamine analysis

| | | Fraction | Florisil (%) | Silica (%) |
|-----------|---------|----------|--------------|------------|
| Hexane | 100 | 1 (5 mL) | - | - |
| | | 2 (5 mL) | - | - |
| | | 3 (5 mL) | - | - |
| | | 4 (5 mL) | - | - |
| Total | | | - | - |
| Hex / Ace | 95 / 5 | 1 (5 mL) | - | - |
| | | 2 (5 mL) | - | - |
| | | 3 (5 mL) | - | - |
| | | 4 (5 mL) | 10.5 | 34.6 |
| Total | | | 10.5 | 34.6 |
| Hex / Ace | 90 / 10 | 1 (5 mL) | 53.3 | 4.6 |
| | | 2 (5 mL) | 11.6 | 53.5 |
| | | 3 (5 mL) | - | 21.3 |
| | | 4 (5 mL) | - | - |
| Total | | | 64.9 | 79.3 |
| Hex / Ace | 85 / 15 | 1 (5 mL) | 13.7 | 27.3 |
| | | 2 (5 mL) | 76.2 | 81.6 |
| | | 3 (5 mL) | - | - |
| | | 4 (5 mL) | - | - |
| Total | | | 89.9 | 108.9 |
| Hex / Ace | 80 / 20 | 1 (5 mL) | 77.2 | 92.5 |
| | | 2 (5 mL) | 10.3 | 12.6 |
| | | 3 (5 mL) | - | - |
| | | 4 (5 mL) | - | - |
| Total | | | 87.5 | 105.1 |
| Hex / Ace | 70 / 30 | 1 (5 mL) | 85.7 | 90.8 |
| | | 2 (5 mL) | - | - |
| | | 3 (5 mL) | - | - |
| | | 4 (5 mL) | - | - |
| Total | | | 85.7 | 90.8 |

용매 조성을 세분화하여 각 용매 조성에 대해 5 mL 씩 4 개의 fraction을 받아 정제 테스트를 진행한 결과 hexane/acetone (85/15, v/v) 10 mL에서 가장 높은 회수율을 보였다. 따라서 hexane/acetone (95/5, v/v) 10 mL로 카트리지를 세척한 다음 hexane/acetone (85/15, v/v) 10 mL로 용출해 주었을 때 다양한 매트릭스 간섭 물질로부터 fenpyrazamine을 효과적으로 정제할 수 있었다.

3.3. 실험실내 시험법 검증

회수율 측정은 분석법의 정확성, 재현성 및 효율성 등을 판단하기 위한 과정이다.

Table 4. Validation results of analytical method for the determination of fenpyrazamine residues in samples

| Sample | Fortification (mg/kg) | Recovery±RSD* (%) | LOQ (mg/kg) |
|-------------|-----------------------|-------------------|-------------|
| Peach | 0.05 | 94.2±5.1 | 0.05 |
| | 0.5 | 102.5±2.1 | |
| | 5.0 | 98.5±1.2 | |
| Grape | 0.05 | 81.9±3.5 | |
| | 0.5 | 92.6±7.4 | |
| | 5.0 | 99.0±0.1 | |
| Mandarin | 0.05 | 81.9±4.0 | |
| | 0.5 | 80.5±8.4 | |
| | 5.0 | 102.7±3.1 | |
| Potato | 0.05 | 86.1±4.0 | |
| | 0.5 | 71.8±3.2 | |
| | 5.0 | 94.2±1.9 | |
| Pepper | 0.05 | 90.5±4.9 | |
| | 0.5 | 87.1±6.2 | |
| | 5.0 | 98.2±1.3 | |
| Soybean | 0.05 | 95.0±2.9 | |
| | 0.5 | 92.9±1.4 | |
| | 5.0 | 93.9±1.5 | |
| Hulled rice | 0.05 | 84.8±6.8 | |
| | 0.5 | 94.5±1.0 | |
| | 5.0 | 94.0±1.1 | |

*Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation.

Fenpyrazamine 시험법의 정확성을 평가하기 위하여 복숭아, 포도, 감귤을 포함하여 대표농산물 시료인 곡류 중 현미, 서류 중 감자, 채소 중 고추 및 콩류 중 대두 무처리군과 3 수준의 처리 농도(0.05, 0.5, 5.0 mg/kg)에 대해 회수를 실험을 5 반복으로 수행한 결과 평균 회수율은 71.8~102.7%이었고, 이때 상대표준편차는 10% 미만으로 조사되어(Table 4) 국내 기준⁹ 및 국제식품규격위원회(Codex)의 잔류분석법 기준¹⁰을 만족하였다. Fenpyrazamine의 선택성(selectivity)은 표준용액과 포도, 복숭아, 감귤, 고추, 대두, 현미의 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교함으로써 평가할 수 있었다. 무처리 시료와 회수율 시료는 확립된 시험방법에 따라 시험용액을 준비한 후 HPLC로 분석하였다. 무처리 시료 중 fenpyrazamine과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않음으로 검체 중 fenpyrazamine을 분석하기 위해 본 시험법이 우수한 분리능과 선택성을 가지는 것으로 판단되며, 따라서 확립된 추출 및 정제

조건의 높은 효율성과 적합성을 확인할 수 있었다. Fig. 3에는 포도, 복숭아, 감귤, 고추, 감자, 대두, 현미의 크로마토그램을 무처리군 및 농도별로 나타내었다.

3.4. 검출한계 및 정량한계

본 연구에서 확립한 시험용액 조제 및 기기분석법을 이용하여 검체 중 fenpyrazamine의 분석기기의 검출한계(LOD, Limit of Detection)와 정량한계(LOQ, Limit of Quantitation)를 구하였다. 검출한계는 최소 검출량이 2.0 ng (S, signal/N, Noise=3)이었고 아래의 계산식에 따라 0.01 mg/kg으로 나타났으며, 정량한계는 최소 검출량이 10 ng (S/N=10)으로 아래의 계산식에 따라 0.05 mg/kg으로 나타났다.

$$\text{LOD 및 LOQ (mg/kg)} = \frac{1}{\text{최소검출량 (ng)}} \times \frac{\text{최종회석부피 (mL)}}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{시료 주입량 (\mu\text{L})}}{\text{시료 주입량 (\mu\text{L})}}$$

분석법상의 정량한계(LOQ)는 EU 가이드라인(SANCO/10684/2009)¹¹에 따라 잔류분석법 기준이 만족(회수율: 70 ~ 120%, RSD: ≤ 20%)되는 가장 낮은 첨가농도인 0.05 mg/kg으로 선정하였으며, 이는 국내⁹ 및 국제식품규격위원회(Codex)¹⁰에서 권장하는 기준인 잔류허용기준의 1/2 또는 0.05 mg/kg 이하의 정량한계에도 부합하여 이를 통해 본 분석법의 적합성을 확인할 수 있었다.

3.5. LC-MS를 이용한 분석법 재확인

본 연구에서 확립된 시험법을 이용하여 분석된 잔류분의 신뢰성을 확보하기 위해 재확인 과정을 수행하였다. LC 분석법을 통한 회수율은 머무름 시간대의 peak 면적으로 측정되기 때문에 분석대상 물질에 대한 선택성을 확보하기에 어려움이 있다. 따라서 fenpyrazamine 분석을 위해 개발된 시험법에 대한 신뢰성을 확보하고 물질에 대한 선택성과 정확성을 검증하기 위해 LC-MS(Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer)를 이용한 분석법 재확인 필요하며 이러한 LC-MS 분석은 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 정확한 정성확인을 가능하게 한다.^{12,13}

검체 분석의 재확인을 위한 LC-MS에서 이온화는 fenpyrazamine 분자내에 ion pair를 갖고 있는 질소 원자가 다수 존재하므로 protonation이 용이하여 이온화법으로 electrospray ionization법을 사용하였고 위의 분석조건에서 얻은 total ion chromatogram (TIC)과

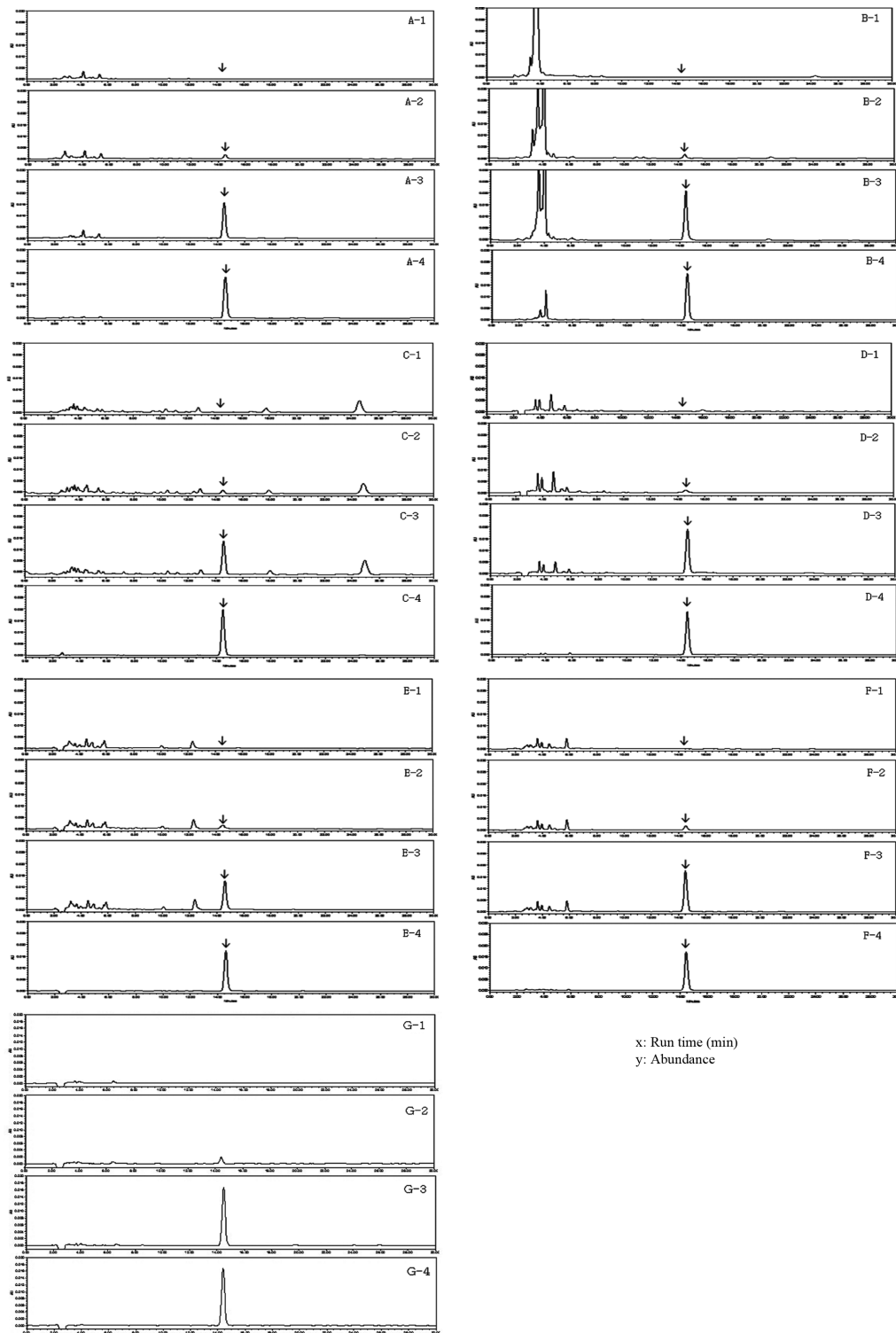


Fig. 3. HPLC-UVD chromatograms corresponding to grape (A); peach (B); mandarin (C); pepper (D); potato (E); soybean (F), and hulled rice (G): 1, control; 2, spiked at 0.05 mg/kg; 3, spiked at 0.5 mg/kg, and 4, spiked at 5.0 mg/kg.

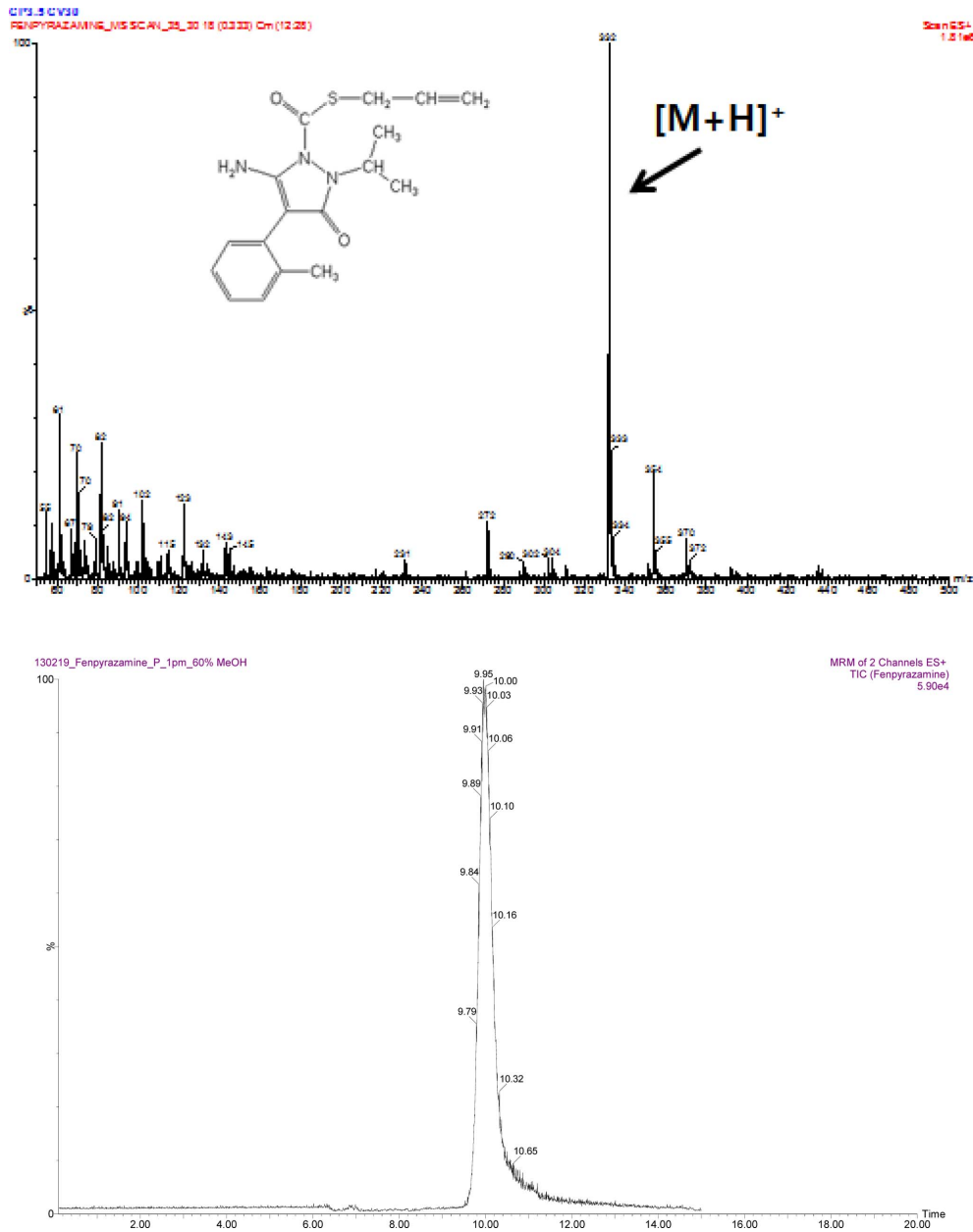


Fig. 4. Full scan mass spectrum of fenpyrazamine and chromatogram of fenpyrazamine standard solution at 1.0 µg/mL.

mass spectrum으로 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 질량이 331인 fenpyrazamine 표준용액 (1.0 µg/mL)을 10 µL/min 속도로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 332인 $(M+H)^+$ 형태로 나타났다. 피크 강도에 가장 큰 영향을 미치는 cone voltage를 확인하기 위하여 LC-MS에

주입하는 fenpyrazamine량을 일정하게 하여 cone voltage의 변화 (10 ~ 70 V)에 따른 피크 강도의 차이를 알아보았다. 30 V에서 최대의 peak 강도가 나타나며 30 V 전후의 voltage에서는 peak 강도는 감소가 일어남을 확인할 수 있었다. 70 V 이상에서는 trace 정도로 나타났다. 또한 이를 ion spectrum에서 확인하

고자 동일한 조건에서 scan mode로 확인한 결과 SIR 모드 결과와 동일한 결과를 나타내어 fenpyrazamine 분석 시 최적의 cone voltage는 30 V임을 확인할 수 있었다. 따라서 cone voltage 30 V에서의 fenpyrazamine의 full scan mass spectrum 분석 결과 332 m/z가 최적화됨을 알 수 있었고 위의 조건에서 분석한 결과 fenpyrazamine의 머무름 시간은 9.9분이었다(Fig. 4). 분석법 검증 대상 농산물인 복숭아, 포도, 감귤, 고추, 현미, 대두 및 감자의 모든 시료에 대해 LC-MS로 분석한 결과, 물질에 대한 우수한 선택성을 확인함으로써 본 연구에서 개발한 분석법에 대한 높은 신뢰성과 정확성을 확보할 수 있었다.

4. 결 론

Fenpyrazamine은 증기압이 2.89×10^{-8} Pa (25 °C)로 휘발성이 낮고 분자 구조상에서 pyrazole 구조가 있어 190 ~ 220 nm의 단파장을 흡수하는 특성을 가지고 있기 때문에 HPLC-UVD를 분석기기로 선택하였으며, 243 nm에서 최대흡광도를 나타내어 검출과장으로 선택하였다. 추출용매는 물질의 용해도와 추출효율을 고려하여 acetonitrile로 선정하였으며, n-octanol/water 분배계수 ($\log P_{ow}$, 25 °C)가 3.52의 중간 비극성의 물리화학적 특징을 고려하여 액-액 분배 단계에서 dichloromethane과 물의 분배로 극성 불순물을 제거하였고, 정제단계에서는 silica cartridge를 이용하여 hexane/acetone (95/5, v/v) 10 mL로 카트리지를 세척한 다음 hexane/acetone (85/15, v/v) 10 mL로 용출해 주었을 때 다양한 매트릭스 간섭 물질로부터 fenpyrazamine을 효과적으로 정제할 수 있었다. 확립된 시험법으로 7종의 대표농산물에 대한 회수율 실험을 시행한 결과 회수율 범위와 분석오차 모두 국내 및 국제기구의 잔류농약 가이드라인에 적합하여 시험법의 정확성 및 정밀성을 확인하였으며, LC-MS를 통한 재확인 과정을 수행함으로써 시험법의 신뢰성과 선택성을 확보할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물에 잔류하는 fenpyrazamine을 분석하기 위한 공정 시험법으로 적극 활용될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처의 연구개발비 (13161식품안001)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

니다.

참고문헌

1. Byeong-sub, K. Fungicide resistance and physiological and ecological diversity of *Botrytis cinerea*. Ph. D. Dissertation, The Graduate School of Seoul National University, Seoul, Korea (1996).
2. EFSA, 'Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fenpyrazamine', *EFSA Journal*, **10**(1), 2496-2557 (2012).
3. S. S. Hong, M. H. Jeong, A. S. Yoo, C. R. Park, K. H. Park, J. E. Park and K. B. Chang, 2012 Annual Conference of Korean Society of Pesticide Science, 175 (2012).
4. S. Tanaka, R. Ishikawa, P. Armengaud and Y. Senechal, 10th International Conference on Diseases of Plants, Tours, France, 680-691 (2012).
5. EFSA, 'Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for fenpyrazamine in almonds, grapes, apricots, peaches and strawberries', *EFSA Journal*, **10**(11), 2989-3020 (2012).
6. EPA, 'Fenpyrazamine; Pesticide Tolerances', **78**(44), 14461-14465 (2013).
7. National Academy of Agricultural Science, 'Risk assessment and ADI establishment of fenpyrazamine' (2012).
8. Ministry of Food and Drug Safety, http://fse.food-nara.go.kr/residue/pesticides/pesticides_info.jsp, Accessed 2 July 2013.
9. Y. D. Lee, 'Practical book of Korea Food Code pesticide residue analysis method', 3rd Ed. KFDA, Osong, 2012.
10. CAC, 'Guidelines on good laboratory practice in residue analysis', CAC/GL 40, 2nd Ed., Codex, Rome, 2003.
11. E. C., 'Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed', SANCO/10684/2009, E.C., Bruxelles, 2009.
12. C. H. Kwon, M. H. Chang, M. H. Im, D. I. Choi, S. C. Jung, J. Y. Lee, Y. D. Yu, J. O. Lee and M. K. Hong, *J. Anal. Sci. Technol.*, **21**(6), 518-525 (2008).
13. S. J. Lee, Y. H. Kim, L. W. Song, Y. S. Hwang, J. D. Lim, E. H. Sohn, M. H. Im, J. A. Do, J. H. Oh, K. S. Kwon, J. K. Lee, Y. D. Lee and M. G. Choung, *Korean J. Pest. Sci.*, **15**(3), 254-268 (2011).