

## Development and validation of an analytical method for nematicide imicyafos determination in agricultural products by HPLC-UVD

Jung-Ah Do<sup>1</sup>, Hyejin Park<sup>1</sup>, Ji-Eun Kwon<sup>1</sup>, Won-Jo Choi<sup>2</sup>, Hyun-Sook Lee<sup>3</sup>,  
Moon-Ik Chang<sup>1</sup>, Jin-Hwan Hong<sup>1</sup> and Jae-Ho Oh<sup>1</sup>,★

<sup>1</sup>Department of Food Safety Evaluation, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,  
Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk 363-700, Korea

<sup>2</sup>Hazardous Substances Analysis Team, Center for Food and Drug Analysis, Busan Regional Korea Food  
and Drug Administration, Busan 608-080, Korea

<sup>3</sup>Hazardous Substances Analysis Team, Center for Food and Drug Analysis, Gyeongin regional Korea Food  
and Drug Administration, Incheon 402-835, Korea

(Received September 22, 2014; Revised October 11, 2014; Accepted October 11, 2014)

## HPLC-UVD를 이용한 살선충제 imicyafos의 시험법 개발 및 검증

도정아<sup>1</sup> · 박혜진<sup>1</sup> · 권지은<sup>1</sup> · 최원조<sup>2</sup> · 이현숙<sup>3</sup> · 장문익<sup>1</sup> · 홍진환<sup>1</sup> · 오재호<sup>1</sup>,★

<sup>1</sup>식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부,

<sup>2</sup>부산지방식품의약품안전청 유해물질분석팀, <sup>3</sup>경인지방식품의약품안전청 유해물질분석팀  
(2014. 9. 22. 접수, 2014. 10. 11. 수정, 2014. 10. 11. 승인)

**Abstract:** Imicyafos which is a nematicide for controlling root-knot nematodes has been registered in the Republic of Korea in 2012, and the maximum residue limits of imicyafos are set to watermelon and korean melon as each 0.05 mg/kg. Extremely reliable and sensitive analytical method is required for ensuring food safety on imicyafos residues in agricultural commodities. Imicyafos residues in samples were extracted with acetone, partitioned with hexane and dichloromethane, and then purified with florisil. The purified samples were analyzed by HPLC-UVD and confirmed with LC-MS. Linear range was between 0.1~5 mg/kg with the correlation coefficient ( $r^2$ ) 0.99997. Average recoveries of imicyafos ranged from 77.0 to 115.4% at the spiked levels of 0.02 and 0.05 mg/kg with the relative standard deviations of 2.2~9.6%. Limit of detection and quantification were 0.005 and 0.02 mg/kg, respectively. An inter-laboratory study was conducted to validate the determination method in depth, and the results were satisfactory. All of the validation results revealed that the developed analytical method in this study is relevant for imicyafos determination in agricultural commodities and will be used as an official analytical method.

**요 약:** Imicyafos는 뿌리혹선충류, 뿌리선충류, 뿌리썩이선충류 등의 방제에 효과적인 살선충제로 국내에는 2012년에 처음 사용 등록되었으며, 식품의약품안전처에서 수박과 참외에 신규 잔류허용기준(0.05 mg/kg)을 신설·고시하였다. Imicyafos는 증기압이  $1.9 \times 10^{-4}$  mPa (25 °C)로 휘발성이 낮고 분자 구조상에서 질소, 산소원자의 비공유전자쌍과 이중, 삼중결합 사이에서의 전자전이에 의하여 190~220 nm의 단파

★ Corresponding author

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

E-mail : [jado@korea.kr](mailto:jado@korea.kr)

장을 흡수하는 특성을 가지고 있기 때문에 HPLC-UVD를 이용하여 시험법을 확립하였다. Imicyafos 분석을 위한 직선성은 상관계수( $r^2$ )가 0.99997로 우수하였고, 대표 농산물 시료(수박, 참외, 감귤, 고추, 감자, 대두, 현미)에 대한 회수율을 측정된 결과 77.0~115.4%, 분석오차 2.2~9.6%로 시험법의 정확성과 재현성을 확인하였다. 또한 확립된 시험법으로 2 개 기관에서 실험실간 검증을 실시한 결과 오차범위가 14.9% 이내로 코덱스 가이드라인에 적합함을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 국내에서 유통되고 있는 농산물에 잔류하는 imicyafos를 분석하기 위한 공정 시험법으로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

**Key words:** imicyafos, nematicide, HPLC-UVD, LC-MS, official analytical method

## 1. 서 론

Imicyafos는 일본 아그로카네쇼 주식회사(Agro Kanesho Co Ltd)가 개발한 phosphonothioate계 살충제로 신경전달물질인 아세틸콜린의 정상적인 신경전달을 억제하는 작용기작으로 강력한 살충효과를 나타내며, 수박, 참외, 토마토 등의 뿌리혹선충류, 뿌리선충류, 뿌리썩이선충류 등의 방제에 효과적이다. Imicyafos를 작물 정식 전에 토양혼합 처리하면 토양 중 선충에 직접 접촉되어 극히 낮은 농도에서도 높은 방제효과를 나타내며, 침투이행성을 가지고 있어 이미 뿌리에 침입한 선충도 효과적으로 제거할 수 있다고 보고되었다.<sup>1</sup>

일본에서 imicyafos의 최대잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)은 감자 등 14 품목에 0.01~1 mg/kg으로 설정되어 있지만,<sup>2</sup> Codex와 EU에서는 imicyafos에 대한 MRL이 설정되어 있지 않다. 국내에서는 imicyafos의 뿌리혹선충에 대한 농약품목등록시험, 약효약해시험, 독성시험, 잔류시험 등을 거쳐 수박과 참외에 2012년 사용이 처음 허가되었다. 독성시험평가 결과 장기 노출시 인체에 대한 안전성이 확보된 것으로 나타났으며, 체내에서 빠르게 대사되는 것으로 확인되어 일일섭취허용량(Acceptable Daily Intake, ADI)은 국내 및 일본에서 0.0005 mg/kg b.w./day로 설정하였다.<sup>3,4</sup> ADI를 고려한 위해평가를 통해 식품의약품안전처에서는 수박 및 참외의 MRL을 각각 0.05 mg/kg으로 신설하여 고시(식품의약품안전처 고시 제 2012-1호)<sup>5</sup>한 이래, 2014년 현재 마 등 7품목에 MRL이 0.05 mg/kg으로 설정되어 있다.<sup>6</sup>

기준이 설정된 농약의 경우 국내에서 생산되는 농산물과 수입되는 농산물에서 시험검사를 통해 안전성을 확인하게 되는데, imicyafos는 신규 등록된 농약으로 아직까지 이를 확인하기 위한 시험법이 보고된 바

가 없다. 따라서 본 연구를 통해 국내 유통 농산물에서 imicyafos를 분석하기 위한 공정시험법을 마련하여 국내에서 유통되고 있는 농산물을 안전하게 관리하는데 기여하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 재료

Imicyafos 표준품(91%)은 (주)경농연구소에서 제공 받았고, acetonitrile과 acetone, dichloromethane, *n*-hexane은 HPLC grade로써 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, sodium chloride와 sodium sulfate anhydrous는 Wako (Osaka, Japan) 사의 제품을 사용하였다. Florisil (60-100 mesh)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

검체는 기준이 설정된 농산물인 수박, 참외 외에 대표 작물인 감귤(과일류), 고추(채소류), 감자(서류), 대두(콩류), 그리고 현미(곡류)를 구입하여 균질화한 후 폴리에틸렌 용기에 담아 -50 °C에 보관하고 실험에 사용하였다.

### 2.2. 표준원액 및 표준용액

Imicyafos 표준품 21.98 mg을 acetonitrile 20 mL에 용해하여 1,000 µg/mL (1,000 ppm)의 표준원액을 조제하고 acetonitrile로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 µg/mL의 표준용액을 제조하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. 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 500 mL 튜버이커에 넣었다 (곡류 및 콩류는 검체에 distilled water 20 mL를 넣고

30 분간 방치). 여기에 acetone 100 mL를 넣은 후 균질기로 5 분간 균질화하였다. 이를 부호너깁때기로 감압여과한 후 여액을 1 L 분액깔때기로 옮기고 포화식염수 50 mL와 distilled water 450 mL, *n*-hexane 100 mL를 차례로 가한 후 5 분간 격렬하게 진탕하고 층이 완전히 분리될 때까지 정치하였다. 아래 수용액층은 별도의 1 L 분액깔때기에 옮기고 *n*-hexane층은 버린 후 옮긴 수용액층을 dichloromethane 100 mL 및 50 mL로 2 회 분배하여 합친 후 이액을 40 °C 이하에서 감압농축하여 건조시켜 dichloromethane 10 mL에 용해하였다(곡류 및 콩류 등 지방성 검체의 경우 40 °C 이하 수욕상에서 감압농축한 후 잔류물에 미리 acetonitrile로 포화시킨 *n*-hexane 30 mL를 가하여 녹인 후 acetonitrile층을 250 mL 용량의 분액깔때기에 옮긴다. 이를 미리 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL로 2 회 분배하여 acetonitrile 층을 취하여 지방을 제거한다. 이를 dichloromethane 10 mL로 재용해하였다).

안지름 11 mm, 길이 400 mm의 유리칼럼에 Florisil 5 g과 그 위에 2 cm 높이로 sodium sulfate anhydrous를 차례로 건조충진한 후 dichloromethane 50 mL를 가하여 칼럼표면이 노출되기 직전까지 내려주고 위의

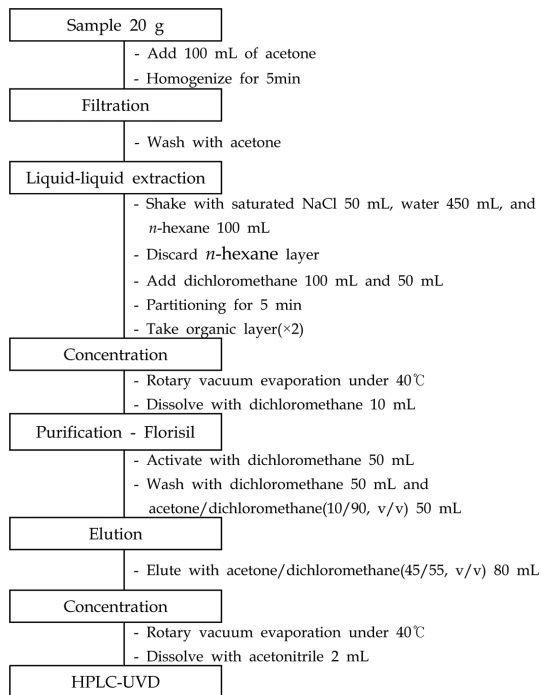


Fig. 1. Flow chart for imicyafos analysis.

dichloromethane으로 용해한 시료용액을 칼럼에 가하여 칼럼 표면이 노출되기 직전까지 내려주었다. Dichloromethane 50 mL와 acetone/dichloromethane (10/90, v/v)용액 50 mL를 차례로 칼럼에 가하여 씻어서 버렸다. 칼럼 표면이 노출되기 직전 acetone/dichloromethane (45/55, v/v)용액 80 mL를 가하여 용리하여 받은 후 40 °C 이하 수욕상에서 감압농축한 후 잔류물에 acetonitrile 2 mL를 가하여 최종부피를 2 mL가 되게 하여 시험용액으로 사용하였다. 상기 imicyafos 시험법을 flow chart (Fig. 1)로 나타내었다.

#### 2.4. 기기분석

Imicyafos는 HPLC-UVD로 분석하였고, 분석을 위한 파장은 227 nm로 설정하였으며, 기기분석조건은 Table 1에 나타내었다. 시험법의 신뢰성을 확보를 위해 LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer)를 이용하여 재확인 과정을 수행하였으며, 이를 위한 기기분석조건은 Table 2에 나타내었다.

#### 2.5. 실험실내 시험법 검증

본 연구에서 확립한 추출 및 정제 방법과 기기분석 과정을 검증하기 위해 농약을 처리되지 않은 농산물 시료에 2수준(0.02, 0.05 mg/kg) 농도로 imicyafos를

Table 1. Instrumental conditions for imicyafos analysis

|                  |   |
|------------------|---|
| Instrument       | HPLC-UVD (Waters 2695)  |
| Column           | Capcell pak UG 120 C <sub>18</sub> (4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 μm) |
| Oven temperature | 25 °C   |
| Mobile phase     | Distilled water/acetonitrile (25/75, v/v)                       |
| Flow rate        | 1.0 mL/min  |
| Detection        | Absorption (227 nm)   |
| Injection volume | 10 μL   |

Table 2. Confirmative conditions for imicyafos

|                    |   |
|--------------------|---|
| Instrument         | LC-MS (Quattro Premier XE, Waters, USA)                                 |
| Column             | Capcell pak UG 120 C <sub>18</sub> (2.0 mm I.D. × 150 mm, 3 μm)         |
| Flow               | 0.25 mL/min   |
| Mobile phase       | 0.1% formic acid in water/0.1% formic acid in acetonitrile (70/30, v/v) |
| Column temperature | 25 °C   |
| Ionization mode    | ESI positive-ion mode   |
| Cone voltage       | 35 V  |
| Injection volume   | 5 μL  |

첨가하고 3 회 반복 실험을 수행하여 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 구하였으며, 이를 근거로 시험법의 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 구하였다.

## 2.6. 실험실간 시험법 검증

본 연구에서 확립한 시험법에 대한 실험실간 검증을 하기 위해 시험법 확립 후 작성한 SOP (Standard Operation Procedure)를 부산지방식품의약품안전청과 경인지지방식품의약품안전청에 각각 제공하고 동일한 시험을 수행하여 회수율과 상대표준오차 및 정량한계를 구하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 분석기기선정과 HPLC 분석조건 확인 및 직선성

Imicyafos 분석을 위한 분석기기를 선정하기 위해 증기압, 분자량 등의 물리·화학적 특성을 고려하였다 (Table 3). Imicyafos는 증기압이  $1.9 \times 10^{-4}$  mPa (25 °C)로 휘발성이 낮고 분자 구조상에서 질소, 산소원자의

비공유전자쌍과 이중, 삼중결합 사이에서의 전자전이에 의하여 190 nm~220 nm의 단파장을 흡수하는 특성을 가지고 있기 때문에 HPLC-UVD가 적합할 것으로 판단되었다. 표준용액 1.0 µg/mL를 UV spectrophotometer의 210 nm에서 400 nm 범위에서 스캔한 결과, 최적흡수파장으로 227 nm를 확인하였다(Fig. 2). 이동상은 distilled water와 acetonitrile을 사용하였으며 isocratic 조건에서 이동상 비율을 조절하여 측정된 결과, distilled water/acetonitrile (25/75, v/v) 비율에서 가

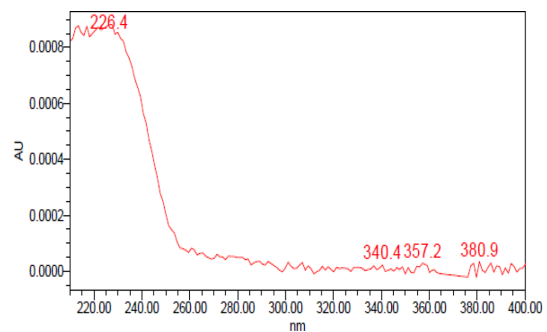


Fig. 2. UV spectrophotometric spectrum of imicyafos.

Table 3. Physicochemical properties and structure of imicyafos

|                     |   |  |
|---------------------|---|--|
| IUPAC name          | (RS)-{O-ethylS-propyl(E)-[2-(cyanoimino)-3-ethylimidazolidin-1-yl]phosphonothioate} |  |
| CAS No.             | 140163-89-9   |  |
| Classification      | Nematicide  |  |
| Melting point       | 26.5-28 °C  |  |
| Molecular weight    | 304.35 (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> PS)           |  |
| Density             | 1.19 g/mol (20 °C)  |  |
| Log P <sub>ow</sub> | 1.64(pH 7, 20 °C)   |  |
| Vapor pressure      | $1.9 \times 10^{-4}$ (25 °C, mPa)   |  |
| Solubility          | In water 77.63 g/L<br>In dichloromethane, methanol, acetone > 1,000 (all in g/L)    |  |
| Toxicity            | ADI: 0.005 mg/kg bw/day   |  |

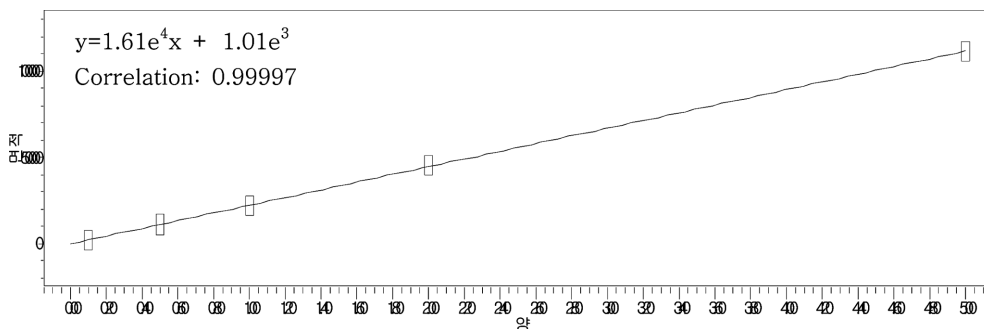


Fig. 3. Calibration curve of imicyafos standard solutions.

장 우수한 분리가 이루어짐을 확인할 수 있었다. 확립된 기기분석 조건에서 imicyafos의 직선성(linearity)을 구하기 위하여 acetonitrile로 희석하여 제조한 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 그리고 5.0 µg/mL의 표준용액을 HPLC-UVD에 주입하여 위에서 제시한 방법으로 분석하였다. Imicyafos의 직선성은 0.1~5.0 µg/mL의 범위에서 상관계수( $r^2$ ) 0.99997로써 우수한 직선성을 보여주었다(Fig. 3).

### 3.2. 추출 및 정제과정의 확립

Imicyafos의 효율적인 추출을 위해 추출용매 선택시 용매에 대한 용해도와 극성도와 같은 imicyafos의 물리·화학적 특성을 고려해야 한다. 또한 분석시료에 처리된 imicyafos의 최적 추출효율을 확인하기 위해서는 matrix가 추출효율에 미치는 영향도 염두해 두어야 한다.<sup>7</sup> 따라서 본 연구에서는 imicyafos의 용매에 대한 용해도와 극성 정도(Log  $P_{ow}$ ; 1.64, pH 7, 20 °C)를 확인하고 추출효율을 비교한 결과 중간 비극성인 imicyafos의 추출을 위해 비극성 화합물의 추출에 많이 이용되는 acetone을 최적 추출용매로 선정하였다.<sup>8,9</sup> Acetone 추출액으로부터 지방, 산, 색소, 전분 등의 농산물로부터 유래되는 방해성분들을 제거하기 위해 일차적으로 액-액 분배를 실시하였다. 보다 효율적인 추출을 위해 acetone 추출액을 농축하지 않고 포화식염수 50 mL와 distilled water 450 mL, *n*-hexane 100 mL를 가한 후 액-액 분배를 실시하여 *n*-hexane층에 존재하는 비극성 불순물을 제거하고 남은 수용액층에 다시 imicyafos가 중간비극성인 특성을 가지기 때문에 dichloromethane을 첨가하여 분석 성분을 비극성 용매인 dichloromethane층으로 이동시켜 극성의 간섭물질을 효과적으로 제거하였다.

농산물로부터 미량의 imicyafos를 분석하기 위해서는 액-액 분배 과정을 거친 후에도 간섭물질을 제거하기 위한 추가 정제과정이 필요하다. 따라서 정제 시에는 용매의 선택에 있어 분석성분에 대한 더 높은 선택성을 요구한다. 본 시험법에서는 컬럼 충전제로 유지, 색소의 용출성이 우수하고 극성의 물질을 넓은 범위에서 흡착하는 특성을 가지는 florisil을 선택하였는데, matrix에서 문제가 되는 간섭물질과 극성물질을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인할 수 있었다. Acetone/dichloromethane (10/90, v/v) 용액을 흘려주었을 때 50 mL 용리액까지 imicyafos가 검출되지 않아서 씻는 용매로 사용하였고, 분석 성분에 대한 선택적 용출을 위해 acetone/dichloromethane (45/55, v/v)을 용매로 선정하고 80 mL 까지 흘렸을 때 99%의 회수율을 보여 용출 용매로 선

정하선정하였다. 이와 같이 각 단계별로 분석 성분에 대한 특성을 파악함으로써 imicyafos 분석을 위한 효율적인 추출 및 정제조건을 확립할 수 있었다.

### 3.3. 검출한계 및 정량한계

본 연구에서 확립한 시험용액 조제 및 기기시험법을 이용하여 검체 중 imicyafos의 정량한계를 구하였다. 검출한계는 최소검출량이 0.5 ng (S/N=3)으로 아래의 계산식에 따라 0.005 mg/kg으로 나타났다. 정량한계는 최소검출량이 2 ng (S/N=10)으로 아래의 계산식에 따라 0.02 mg/kg으로 나타났다.

검출한계 (mg/kg) =

$$\begin{aligned} & \text{최소검출량 (ng)} \times \frac{1}{\text{시료량(g)}} \times \frac{\text{최종희석부피(mg)}}{\text{시료 주입량(µg)}} \\ & = 5(\text{ng}) \times \frac{1}{20(\text{g})} \times \frac{2(\text{mL})}{10(\text{µL})} = 0.005 \end{aligned}$$

정량한계 (mg/kg) =

$$\begin{aligned} & \text{최소검출량 (ng)} \times \frac{1}{\text{시료량(g)}} \times \frac{\text{최종희석부피(mL)}}{\text{시료 주입량(µL)}} \\ & = 2(\text{ng}) \times \frac{1}{20(\text{g})} \times \frac{2(\text{mL})}{10(\text{µL})} = 0.02 \end{aligned}$$

### 3.4. 실험실내 시험법 검증

회수율 측정은 시험법의 정확성, 재현성 및 효율성

Table 4. Validation results of an analytical method for the determination of imicyafos in the samples

| Sample       | Fortification (mg/kg) | Recovery ± RSD (mg/kg) | LOQ (mg/kg) |
|--------------|-----------------------|------------------------|-------------|
| Watermelon   | 0.02                  | 79.7±4.3               | 0.02        |
|              | 0.05                  | 94.0±8.9               |             |
| Korean melon | 0.02                  | 101.7±7.3              |             |
|              | 0.05                  | 79.1±4.6               |             |
| Mandarin     | 0.02                  | 78.9±4.2               |             |
|              | 0.05                  | 90.0±9.3               |             |
| Pepper       | 0.02                  | 77.1±2.5               |             |
|              | 0.05                  | 77.0±4.2               |             |
| Potato       | 0.02                  | 78.1±8.5               |             |
|              | 0.05                  | 85.1±2.2               |             |
| Soybean      | 0.02                  | 102.4±6.6              |             |
|              | 0.05                  | 88.0±5.6               |             |
| Hulled rice  | 0.02                  | 115.4±2.8              |             |
|              | 0.05                  | 110.5±9.6              |             |

\*Mean values of triplicates with relative standard deviation.

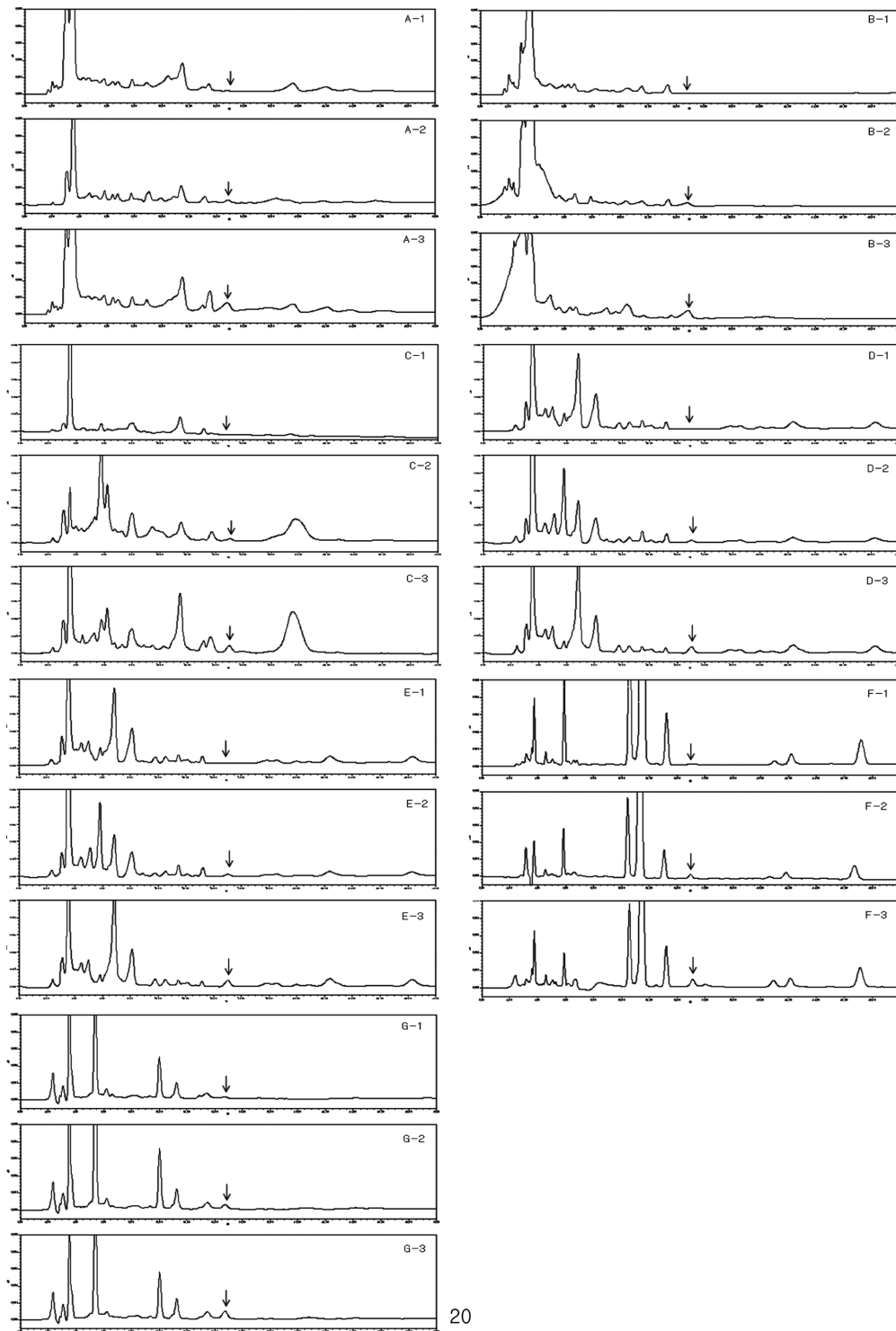


Fig. 4. HPLC-UV-D chromatograms corresponding to watermelon (A) korean melon, (B) mandarin, (C) pepper, (D) potato, (E) soybean, (F) and hulled rice, (G) 1, control; 2, spiked at 0.02 mg/kg; and 3, spiked at 0.05 mg/kg.

등을 판단하기 위한 과정으로, 본 연구에서는 잔류허용기준이 각각 0.5 mg/kg으로 신설 고시된 수박, 참외를 포함하여 대표 농산물 시료인 곡류 중 현미, 과일류 중 감귤, 서류 중 감자, 채소 중 고추, 콩류 중 대두에 대해 각각 무처리군과 0.02, 0.05 mg/kg의 2 수준 농도로 처리하여 3 반복으로 회수율 실험을 수행하였다. 무처리 검체를 이용하여 간섭물질이 존재하지 않는 동일한 머무를 시간을 확인하였으며, 우수한 분리능과 선택성을 가지는 분리 조건을 확인 할 수 있었다. 회수율 실험 결과는 Table 4에 나타내었다. 측정 결과, 70.0~115.4% 범위의 회수율과 10% 미만의 분석오차를 나타냄으로써 국내기준<sup>11</sup> 및 국제식품규격위원회(Codex)의 잔류시험법 기준<sup>12</sup>을 만족함을 확인하였다. EU 가이드라인<sup>13</sup>에 따라 잔류시험법 기준이 만족(회수율: 70~120%, RSD: ≤20%)되는 정량한계(LOQ)는 0.02 mg/kg이었으며, 이는 국제식품규격위원회(Codex) 및 국내에서 권장하는 기준인 잔류허용기준의 1/2 또는 0.05 mg/kg 이하에도 부합하여, 본 시험법의 적합성을 확인할 수 있었다. 회수율 시험을 수행한 결과 크로마토그램을 그림에 나타내었다(Fig. 4).

### 3.5. LC-MS를 이용한 시험법의 재확인

LC 시험법을 통한 회수율은 표준품과 동일한 머무

름 시간대의 peak 면적으로 측정하기 때문에 분석대상 물질에 대한 정성의 정확성을 확보하기에 어려움이 있다. 따라서 imicyafos 분석을 위해 개발된 시험법에 대한 신뢰성을 확보하고 물질에 대한 정성의 정확성을 검증하기 위해 LC-MS를 이용한 시험법 재확인이 필요하였다. 이러한 LC-MS 분석은 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온의 mass spectrum을 확인함으로써 보다 정확한 정성확인을 가능하게 한다.<sup>7,8</sup> 분자량이 304.4인 imicyafos를 50~500 m/z 분자량 범위에서 full scan mass spectrum mode로 분석한 결과(Fig. 5) 정성 및 정량을 위한 imicyafos의 특성이온은 m/z 305가 최적임을 알 수 있었다. 머무를 시간은 3.5 분이었고 positive조건에서 측정되었으며, 특성이온의 m/z값은 Table 5에 나타내었다. 시험법 검증 대상 농산물인 수박, 참외, 고추, 현미, 감귤 및 감자의 모든 시료에 대해 LC-MS로 분석한 결과, 물질에 대한 선택성을 확인함으로써 본 연구에서 개발한

Table 5. Selected-ion of LC-MS for imicyafos

| Retention time (min) | Molecular weight | Exact mass | Ion monitored (m/z) |
|----------------------|------------------|------------|---------------------|
| 3.5                  | 304.4            | 304.1      | 305                 |

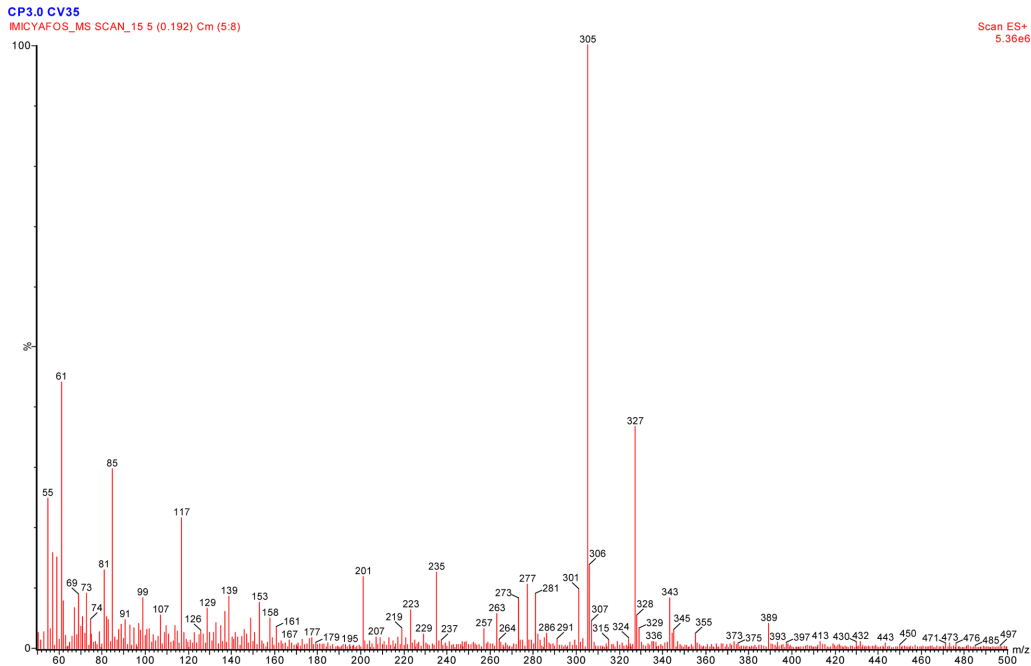


Fig. 5. Full scan mass spectrum of imicyafos.

Table 6. Inter-laboratory validation results of an analytical method for imicyafos in the samples

| Sample       | Fortification<br>(mg/kg) | Recovery $\pm$ RSD <sub>r</sub> <sup>*</sup> (%) |                 |                  | Ave.<br>Recovery<br>(n=9) | RSD <sub>R</sub> <sup>*</sup><br>(%)<br>(n=9) |
|--------------|--------------------------|--|-----------------|------------------|---------------------------|---|
|              |                          | Headquarter<br>(n=3)                             | Busan<br>(n=3)  | Gyungin<br>(n=3) |                           |   |
| Watermelon   | 0.02                     | 79.7 $\pm$ 4.3                                   | 97.8 $\pm$ 1.0  | 87.4 $\pm$ 6.7   | 89.3                      | 10.2  |
|              | 0.05                     | 94.0 $\pm$ 8.9                                   | 84.9 $\pm$ 4.3  | 81.2 $\pm$ 6.4   | 87.5                      | 6.4   |
| Korean melon | 0.02                     | 101.7 $\pm$ 7.3                                  | 79.8 $\pm$ 2.8  | 102.6 $\pm$ 8.9  | 89.1                      | 12.7  |
|              | 0.05                     | 79.1 $\pm$ 4.6                                   | 87.5 $\pm$ 2.0  | 84.2 $\pm$ 7.6   | 83.2                      | 5.0   |
| Mandarin     | 0.02                     | 78.9 $\pm$ 4.2                                   | 84.5 $\pm$ 2.5  | 85.8 $\pm$ 3.2   | 82.6                      | 3.9   |
|              | 0.05                     | 90.0 $\pm$ 9.3                                   | 89.2 $\pm$ 5.4  | 83.1 $\pm$ 9.2   | 87.2                      | 4.7   |
| Pepper       | 0.02                     | 77.1 $\pm$ 2.5                                   | 90.1 $\pm$ 1.0  | 94.1 $\pm$ 4.1   | 82.0                      | 8.6   |
|              | 0.05                     | 77.0 $\pm$ 4.2                                   | 90.7 $\pm$ 3.6  | 84.1 $\pm$ 9.9   | 81.0                      | 10.4  |
| Potato       | 0.02                     | 78.1 $\pm$ 8.5                                   | 93.0 $\pm$ 3.5  | 84.4 $\pm$ 6.5   | 88.4                      | 10.1  |
|              | 0.05                     | 85.1 $\pm$ 2.2                                   | 76.8 $\pm$ 4.1  | 82.5 $\pm$ 8.0   | 82.0                      | 5.5   |
| Soybean      | 0.02                     | 102.4 $\pm$ 6.6                                  | 105.3 $\pm$ 1.3 | 78.9 $\pm$ 3.3   | 98.4                      | 9.8   |
|              | 0.05                     | 88.0 $\pm$ 5.6                                   | 84.0 $\pm$ 3.3  | 75.4 $\pm$ 1.4   | 84.4                      | 4.0   |
| Hulled rice  | 0.02                     | 115.4 $\pm$ 2.8                                  | 95.2 $\pm$ 1.3  | 90.5 $\pm$ 7.4   | 104.4                     | 9.8   |
|              | 0.05                     | 110.5 $\pm$ 9.6                                  | 88.7 $\pm$ 2.6  | 83.7 $\pm$ 4.4   | 94.5                      | 14.9  |

\*RSD<sub>r</sub> : intra-laboratory validation\*\*RSD<sub>R</sub> : inter-laboratory validation

시험법에 대한 높은 신뢰성과 정확성을 확보할 수 있었다.

### 3.6. 실험실간 시험법 검증

실험실내 선택성, 정확성 및 효율성을 확보한 후 시험법에 대한 실험실간 재현성을 확인하기 위해서는 검증이 필요하다. 이에 본 연구에서는 부산지방식품의약품안전청과 경인지방식품의약품안전청에 본 시험법 SOP를 제공하고 동일한 조건에서 분석을 진행하여 실험실간 검증을 실시하였다. 코텍스 가이드라인<sup>12</sup>에서 제공하는 실험실간 편차(RSD<sub>R</sub>; Relative Standard Deviation on reproducibility)는 >0.01 mg/kg, ≤0.1 mg/kg범위의 농도에서 32% 이하로 본 연구에서는 0.02 및 0.05 mg/kg 농도에서 편차가 3.9~14.9%로 조사되어 실험실간 정밀성이 매우 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 시험법이 매우 견고함을 유추할 수 있었다. 또한 실험실내 편차(RSD<sub>r</sub>; Relative Standard Deviation on repeatability)를 20% 이하로 제안하고 있는데, 검증 결과 0.02 및 0.05 mg/kg 농도에서 모두 1.0~9.9%로 조사되어 오차범위 또한 적합함을 확인할 수 있었다(Table 6). 따라서 본 시험법은 imicyafos 분석을 위한 공정 시험법으로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전처의 연구개발비(12161식품안016)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. N. Osaki and T. Fukuchi, 'Biological activities and characteristics of a novel nematicide, Plant Protection, 64, 2010.
2. Japan pesticide standards, [http://www.m5.ws001.squar-estart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a\\_inq=8750](http://www.m5.ws001.squar-estart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=8750). Assessed 1 July, 2014.
3. Pesticide database, <http://www.mfds.go.kr/index.do?x=0&searchkey=title:contents&mid=686&searchword=2012-1&division=&y=0&pageNo=4&seq=3828&cmd=v>. Assessed 1 July, 2014.
4. 農評書, <http://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya20120718564>. Assessed 1 July, 2014.
5. Ministry of Food and Drug Safety Notification No. 2012-1(2012.1.20), Republic of Korea.
6. Food Code, Ministry of Food and Drug Safety, 2013.
7. C. H. Kwon, M. H. Chang, M. H. Im, D. I. Choi, S. C.



- Jung, J. Y. Lee, Y. D. Lee, J. O. Lee and M. K. Hong, *J. Anal. Sci. Technol.*, **21**, 518-525 (2008).
8. 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**, 254-268 (2011).
9. M. A. Luke, J. E. Froberg and H. T. Masumoto, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 1020-1026 (1975).
10. J. W. Wong, K. Zhang, K. Tech, D. G. Hayward, A. I. Krynitsky, I. Cassias, F. J. Schenck, K. Banerjee, S. Dasgupta and D. Brown, *J. Agric Food Chem.*, **58**(10), 5884-96 (2010).
11. Y. D. Lee, Practical book of Korea Food Code pesticide residue analysis method. 3rd ed. MFDS, Korea, 2012.
12. Codex Alimentarius Commission. 'Guidelines on good laboratory practice in residue analysis', CAC/GL 40, Rome, Italy, 2003.
13. European Commission. 'Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed', Document No. SANCO/10684/2009. Bruxelles, Belgium, 2009.