

HPLC-UVD를 이용한 농산물 중 살균제 pyriofenone 분석법 확립

박혜진¹ · 김희정¹ · 도정아² · 권지은¹ · 윤지영¹ · 이지영¹ · 장문익^{1*} · 이규식¹¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 잔류물질과, ²첨단분석팀

Development of an Analytical Method for the Determination of Pyriofenone residue in Agricultural Products using HPLC-UVD

Hyejin Park¹, HeeJung Kim¹, Jung-Ah Do², Ji-Eun Kwon¹, Ji-Young Yoon¹, Ji-Young Lee¹, Moon-Ik Chang^{1*} and Gyu-Seek Rhee¹¹Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, ²Advanced Analysis Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk 363-700, Korea

(Received on March 19, 2014. Revised on March 28, 2014. Accepted on May 2, 2014)

Abstract Pyriofenone is an aryl phenyl ketone fungicide that is newly registered in Korea in 2013 to control powdery mildew on food. The objective of this study was to develop reliable and sensitive analytical method for determination of pyriofenone residue in agricultural products for ensuring the food safety. The pyriofenone residues in all samples(Korean melon, pepper, potato, mandarin, soybean, and hulled rice) were extracted with acetonitrile, partitioned with dichloromethane, and then purified with a silica cartridge. The purified samples were analyzed by HPLC-UVD and confirmed with LC-MS. The linear range of pyriofenone was 0.05~5 mg/kg with the correlation coefficient (r^2) > 0.999. Average recoveries of pyriofenone ranged from 72.8% to 99.5% at the spiked level of 0.05 and 0.5 mg/kg, while the relative standard deviation was 2.3%~6.4%. In addition, the limit of detection and limit of quantification were 0.01 and 0.05 mg/kg, respectively. The results revealed that the developed and validated analytical method was suitable for pyriofenone determination in agricultural products.

Key words Fungicide, HPLC-UVD, LC-MS, Pyriofenone

서 론

농약은 병해충 및 잡초로부터 농작물을 보호하여 고품질의 농산물을 안정적으로 대량 생산하는데 크게 공헌하고 있지만 인체와 환경생물에 독성학적 위해요인으로 작용할 수 있다(Noh et al., 2010; Ha et al., 2012). 현재 우리나라에 잔류허용기준이 설정된 농약은 439종이며, 2개의 다중농약 다성분 분석법, 42개의 다성분 분석법과 164개의 단성분 분석법을 고시하여 그 목적에 따라 상호보완적으로 적용하고 있다(Ministry of Food and Drug Safety 2013). 그러나 농업

기술 개발 등에 따라 농약의 수와 종류는 점점 늘어나므로 분석방법 또한 지속적으로 추가되어야 한다(Kim et al., 2013).

피리오페논 (Pyriofenone, [(5-chloro-2-methoxy-4-methyl-3-pyridinyl)2,3,4-trimethoxy-6-methyl phenyl)methanone]은 2010년 일본 Ishihara Sangyo Kaisha Biosciences에서 개발한 아릴페닐케톤계 살균제(항진균제)로 식물 병원성 곰팡이의 부착기의 형성과 식물 세포에서 균사가 침투하는 것을 억제하여 방제 효과를 나타낸다(EFSA 2013). 피리오페논은 미국환경보호청(Environmental Protection Agency, EPA)에 등록되어 있지 않고 수입식품 잔류허용기준(import tolerance, 포도 0.3 ppm, 건포도 0.5 ppm; US EPA 40 CFR § 180.660) (eCFR 2014)만 설정되어 있다. 유럽에서는 포도나

*Corresponding author

Tel: +82-43-719-4204, Fax: +82-43-719-4200

E-mail: 1004@korea.kr

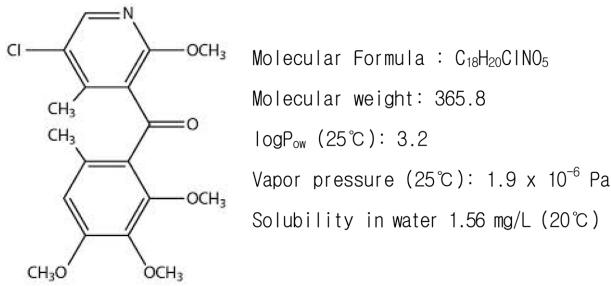


Fig. 1. Chemical structure and properties of pyriofenone.

무의 흰가루병 방제에 사용이 허가되어 있으나 아직 캐나다, 멕시코, Codex에서는 잔류허용기준이 설정되어 있지 않으며, 국내에서는 2013년에 참외와 고추(2.0 mg/kg)에 잔류허용기준 설정이 추진 중인 신규농약이다.

피리오페논과 같은 아릴페닐케톤계 농약으로는 피리벤족심(pyribenzoxim) 및 메트라페논(metrafenone) 등이 있으며 이들 농약에 대해 식품공전에서는 acetone을 사용하여 검체를 추출하고 비극성 용매를 이용하여 액-액 분배를 한 후, 흡착크로마토그래피를 통한 최종 정제과정을 거쳐 기기분석을 하도록 제시하고 있다(Ministry of Food and Drug Safety 2014). 또한, Yao 등(2007)은 논토양과 벚짚, 벼 알곡 중의 피리벤족심을 acetone으로 추출한 후 침전법을 이용한 정제 방법을 제시하고 있으나, 피리오페논의 분석에 관한 논문은 전무한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 식품 중 잔류할 수 있는 피리오페논의 안전관리를 위하여 잔류분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

피리오페논(Fig. 1) (US EPA 2012) 표준품은(99.2%) Ishihara Sangyo Kaisha (Osaka, Japan)에서 공여받아 사용하였고, 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, silica SPE cartridge는 Waters (Milford, MA, USA)로부터 구입하였다. 증류수는 Sartorius nanopure water system (Sartorius stedim Biotech, Germany)을 사용하여 전기전도도 18.2 MΩ 이상을 사용하였다. 검체(참외, 고추, 감귤, 감자, 현미, 대두)는 모두 무농약 농산물을 구입하여 식품공전(Ministry of Food and Drug Safety 2013)의 검체 처리방법에 따라 전처리하여 밀봉된 용기에 담아 -50°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준용액의 조제

피리오페논은 표준품 50.41 mg을 정확히 재어 50 mL 정용병에 넣고 acetonitrile에 용해하여 1,000 µg/mL(1,000 ppm)의 표준원액을 만들었다. 이를 단계적으로 희석하여 표준용액을 만들고 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 농도별 표준희석용액을 10 µL씩 HPLC-UVD에 주입하여 얻은 크로마토그램상의 피크 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도로 검량선을 작성하였다.

최적 분석법의 확립

기기분석 조건

피리오페논의 물리화학적 특성을 고려하여 분석기기를 선정하였고, 조제한 표준용액을 선정한 기기에 주입하여 최적 기기분석 조건을 확립하였다.

정제 방법 선택

피리오페논의 정확한 분석을 위한 최종 불순물 제거를 위해 잔류농약 분석에 있어 가장 널리 이용되고 있는 florisisil, silica, NH₂ 카트리지를 이용하여 hexane/acetone 및 dichloromethane/ethyl acetate의 다양한 용매 조성을 가지고 정제 효율 시험을 실시하여 최적의 정제 방법을 선택하였다.

추출 용매 선택

일반적인 잔류농약 분석에 사용되는 추출용매로는 hexane, dichloromethane, acetone, acetonitrile, methanol 및 ethyl acetate 등이 있으며, 시료에 존재하는 성분과 pyriofenone의 물리화학적 특성에 따라 추출용매를 선택하였다. 참외에 2 mg/kg 농도의 피리오페논은 1 mL를 주입한 후, acetone, acetonitrile, methanol을 이용하여 추출을 하고 확립된 정제 방법으로 불순물을 제거하고 기기분석을 실시하여 회수율을 통해 추출 효율을 알아보았다.

분석법의 검증

본 연구에서 확립된 분석법의 선택성, 정밀성, 직선성, 정확성을 검증하였다. 표준원액을 acetonitrile에 단계적으로 희석하여 직선성을 확인하였다. 또한, 선택성, 정밀성, 정확성을 평가하기 위해 농약이 처리되지 않은 분쇄시료에 2수준(0.05 및 0.5 mg/kg)으로 농약을 첨가하고 5회 반복 실험하여 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 구하였다.

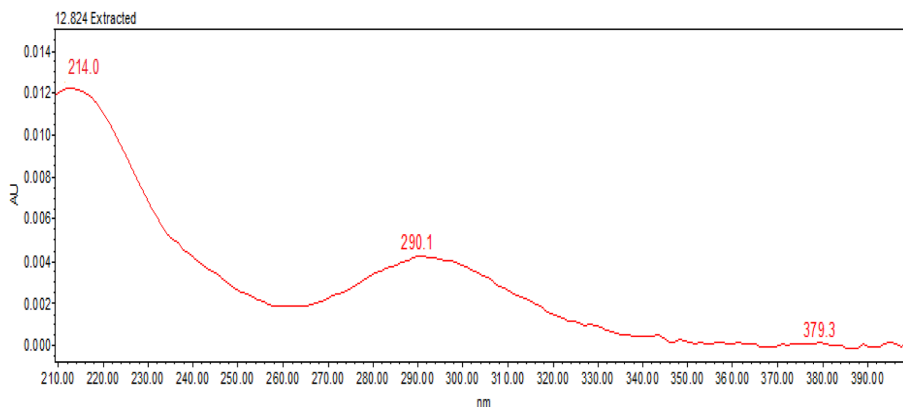
결과 및 고찰

최적기기분석조건 확립

피리오페논은 증기압이 1.9 × 10⁻⁶ Pa (25°C)로 휘발성이 낮고 옥탄올/물 분배계수(Log P_{ow})가 3.2로 비극성인 화합물

Table 1. Analytical conditions for the determination of pyriofenone residues

Parameter	Condition of HPLC method
Instrument	HPLC-UVD (Waters 2695)
Column	Capcell Pak C ₁₈ (5 µm, 4.6 mm i.d. × 250 mm, Shiseido)
Column temperature	30°C
Mobile phase	Water/Acetonitrile (35/65, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Wavelength	214 nm
Injection volume	10 µL

**Fig. 2.** HPLC-UVD spectrum of pyriofenone.

(MacBean 2012)로 분자 구조상에서 질소, 산소원자의 비공유전자쌍과 이중결합 사이에서의 전자전이에 의하여 자외선 영역의 파장대에서 강한 흡광성을 나타낼 것으로 판단되어 HPLC를 분석기기로 선정하였다. 피리오페논의 최적흡수파장을 알아보기 위해 PDA 검출기로 210 nm에서 400 nm까지 스캔하여 흡광도가 가장 높은 214 nm를 분석파장(Fig. 2)으로 선택하였다.

이동상의 조성에 따른 피리오페논의 분리능을 확인하기 위해 water/acetonitrile 혼합용액에서 물의 비율을 0~50%로 조정하여 테스트한 결과 물/acetonitrile (35/65, v/v)에서 가장 좋은 분해능과 해상도를 보였다. 확립된 분석조건(Table 1)을 이용하여 표준회색용액과 시료를 분석한 결과 머무름 시간 12.8분에서 어떠한 방해물질 없이 동일한 피크를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

추출 용매 선택

피리오페논의 최적 추출 용매 선정을 위해 acetone, acetonitrile, methanol을 이용하여 추출 효율을 비교하였다. 세 용매 모두 추출 효율이 각각 acetonitrile 100%, acetone 98%, methanol 92%로 효과적이거나 methanol의 경우 감압여과 시 용매의 점성으로 인해 시간이 많이 소요되고 농축 시에 용매가 튀어 다른 용매에 비해 회수율이 낮아지는 단점을 가지며, acetone의 경우도 농축 시 약간의 용매가 튀는

현상이 있었다. 따라서 이 실험에서는 공추출물(색소, 지방 등)이 적고 추출 효율도 가장 높은 acetonitrile을 추출 용매로 선정하였다(Lee et al., 2008). 또한, 유지를 비롯한 비극성 간섭물질은 기기분석 시 간섭 및 칼럼의 급격한 분리능 저하를 초래하므로 Association of Official Analytical Chemists (AOAC)와 Food and Drug Administration (FDA)의 공전분석법에서 지방 및 왁스의 제거에 주로 이용되는 정제법인 acetonitrile/hexane 분배법을 추가하여 비극성 간섭물질을 제거하였다.

정제 카트리지와 정제 용매 선택

잔류농약 분석에 있어 가장 널리 이용되고 있는 florisil, silica, NH₂ 카트리지와 비극성의 농약의 잔류분석에 주로 적용되고 있는 hexane/acetone 및 dichloromethane/ethyl acetate 혼합용매를 이용한 정제 효율을 비교한 결과(Table 2), hexane/acetone 혼합용매를 이용한 경우가 다른 경우보다 피리오페논의 정제에 보다 효과적이었다. 또한 silica 카트리지를 이용한 정제 시 다른 흡착제를 보다 높은 회수율을 보였는데 이는 florisil의 경우 극성물질에 대한 강한 흡착성을 띄고 있어서 피리오페논과의 흡착이 silica 보다 강하게 나타나 회수가 효과적이지 못하였고, 그 반대로 NH₂의 경우 피리오페논에 대한 흡착이 약해서 정제에 효과적이지 않다고 판단되었다. Silica 카트리지를 이용하여 hexane/

Table 2. Comparisons of SPE cartridge and elution solvents for pyriofenone analysis

Solvent	Cartridge	Elution (%)			Total (%)
		Loading	0~5 mL	5~10 mL	
<i>n</i> -Hexane	Florisil	0	0	0	0
	Silica	0	0	0	0
	NH ₂	0	0	0	0
<i>n</i> -Hex/Acetone (90/10, v/v)	Florisil	0	96.3	0	96.3
	Silica	0	84.5	17.0	101.5
	NH ₂	0	98.2	0	98.2
<i>n</i> -Hex/Acetone (70/30, v/v)	Florisil	0	95.8	0	95.8
	Silica	0	98.8	0	98.8
	NH ₂	0	96.9	0	96.9
Dichloromethane	Florisil	0	0	0	0
	Silica	0	0	0	0
	NH ₂	33.3	62.8	0	96.1
Dichloromethane/ethyl acetate (90/10, v/v)	Florisil	0	91.6	0	91.6
	Silica	0	97.3	0	97.3
	NH ₂	32.9	67.8	0	100.7
Dichloromethane/ethyl acetate (70/30, v/v)	Florisil	0	93.5	0	93.5
	Silica	0	97.6	0	97.6
	NH ₂	32.7	68.1	0	100.8

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

Solvent	Elution (%)		Total
	0~5 mL	5~10 mL	
<i>n</i> -Hex/Acetone (95/5, v/v)	8.1	90	98.1
Dichloromethane/ethyl acetate (95/5, v/v)	85.9	10.8	96.7

acetone (95/5, v/v) 혼합용매와 dichloromethane/ethyl acetate (95/5, v/v) 혼합용매로 각각 5 mL 씩 2단계로 받아 정제 효율을 비교한 결과 두 혼합용매 모두 첫 번째 단계에서 피리오페논이 유출되어 세척용매로써 적합하지 않았다(Table 3). 따라서 hexane 10 mL로 세척한 다음 hexane/acetone (90/10, v/v) 혼합용매 10 mL로 유출시키면 다양한 매트릭스 간섭 물질로부터 피리오페논을 효과적으로 정제할 수 있었다.

6개의 대표농산물을 가지고 시험법을 검증한 결과 특정 검체의 색소, 지방, 전분 등의 불순물이 문제가 되지 않았다. 이러한 결과는 효율 비교를 통한 추출 용매의 선택과 약제 특성에 맞게 극성도를 조절하여 다양한 정제 실험을 하여 최적의 정제법을 선택하였기 때문이라고 판단된다.

확립된 분석방법

농산물 중 피리오페논의 분석을 위해 검체를 분쇄하여 균질화한 후 20 g (곡류 및 콩류는 약 1 kg을 혼합하여 표준제 420 µm를 통과하도록 분쇄한 시료 20 g, 과일류, 채소류, 서류는 약 1 kg을 분쇄한 시료 20 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고(곡류 및 콩류의 경우는 증류수 30 mL를 넣어 2

시간 방치) acetonitrile 100 mL를 가하여 5분간 진탕하였다. 이를 여과지가 깔려있는 부호너칼때기에서 흡인여과하고, acetonitrile 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내어 앞의 여액과 합한 후 40°C 이하의 수욕 상에서 감압농축을 실시하였다. 이를 증류수 100 mL, 포화식염수 20 mL 및 dichloromethane 100 mL로 차례로 씻어서 500 mL 용량의 분액여두에 옮겨 격렬하게 진탕하고 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 후 dichloromethane 층을 무수 황산나트륨에 통과시켜 감압농축플라스크에 받고 수용액층에 dichloromethane 50 mL를 가하여 위의 과정을 반복하였다. 이를 40°C 이하 수욕 상에서 감압농축한 후 잔류물을 hexane 4 mL로 재용해하였다. 곡류 및 두류와 같은 지방성 검체의 경우 잔류물에 미리 acetonitrile로 포화시킨 hexane 30 mL를 건조물에 가하여 녹인 후 250 mL 용량의 분액여두에 옮기고 미리 hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL씩으로 2회 분배 추출하였다. 합친 acetonitrile층을 40°C에서 감압농축한 후 잔류물을 hexane 4 mL로 재용해하였다.

피리오페논의 정제를 위해 silica 카트리지를 이용하였다. silica 카트리지의 활성화를 위해서 카트리지에 hexane 10

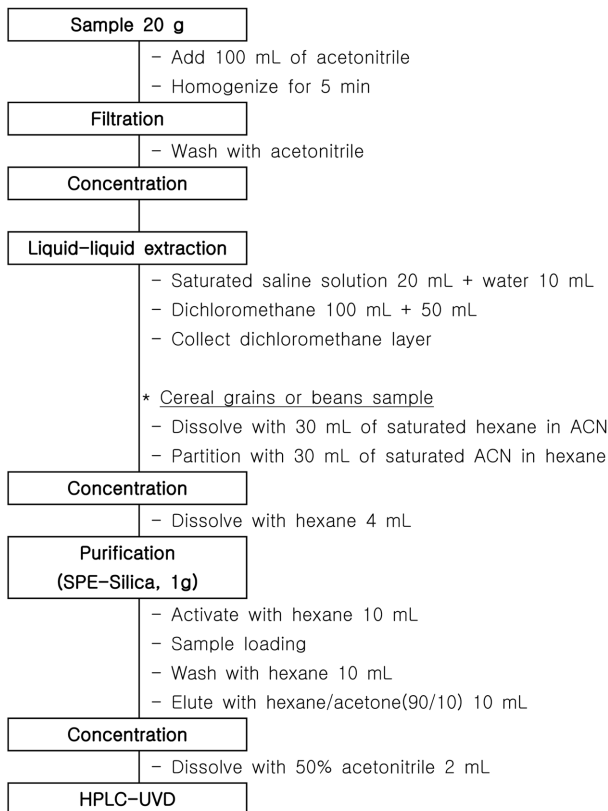


Fig. 3. Flow chart for pyriofenone analysis.

mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출시켜 버린다. 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정으로부터 얻은 잔류물을 hexane 4 mL에 녹인 액을 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 유출시켜 씻어 버리고 고정상 상단이 노출되기 전에 hexane 10 mL를 유출시켜 버린 후, hexane/acetone (90/10, v/v) 10 mL를 유출시켜 받은 시험액을 감압농축플라스크에 취한다. 이를 40°C 이하 수욕 상에서 감압농축하

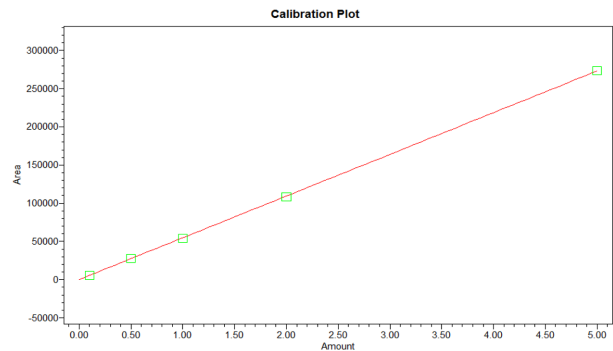


Fig. 4. Calibration curve of pyriofenone standard solution ($r^2 > 0.999$).

고 50% acetonitrile 2 mL에 녹여 필터(PTFE 0.2 μ m)로 여과하여 시험용액으로 하였다. 추출 및 정제 방법을 Fig. 3에 흐름도로 간략하게 나타내었다.

피리오페논의 분석은 UV 검출기가 장착된 Waters 2695 series HPLC (Waters, USA)를 사용하였다. 칼럼은 CAPCELL PAK C18 UG 120 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 최적이동상조건을 선정하기 위하여 water/acetonitrile 혼합용액에서 물의 비율을 0~50%로 변화를 주며 시험하였다. PDA 검출기를 통해 최대흡수 파장을 선정하였고, 이동상의 속도는 1.0 mL/min이었다.

시험법의 검증 및 정량한계

피리오페논의 선택성(selectivity)은 표준용액과 참외, 현미, 대두, 감귤, 감자, 고추의 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교함으로써 평가할 수 있었다. 시료의 매트릭스 중 피리오페논과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않아 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다. 피리

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

Sample	Fortification (mg/kg)	Average \pm RSD (%) [*]	LOQ (mg/kg)
Korean melon	0.05	87.8 \pm 3.6	0.05
	0.5	74.8 \pm 2.8	
Pepper	0.05	82.2 \pm 3.7	
	0.5	79.8 \pm 2.3	
Mandarin	0.05	81.6 \pm 3.5	
	0.5	76.0 \pm 2.5	
Potato	0.05	87.4 \pm 3.1	
	0.5	76.8 \pm 4.2	
Hulled rice	0.05	72.8 \pm 5.1	
	0.5	73.6 \pm 6.4	
Soybean	0.05	99.5 \pm 5.7	
	0.5	90.9 \pm 3.9	

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

오페논의 직선성(linearity)을 구하기 위하여 표준용액 0.05, 0.5, 1.0, 2.0 그리고 5.0 µg/mL를 10 µL씩 HPLC-UVD에 주입하여 분석한 결과 상관계수(r^2)가 0.999 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 4).

시험법의 정확성을 평가하기 위하여 처리농도 0.05와 0.5

mg/kg에서 피리오페논의 회수율 실험을 5회 반복하여 수행하였으며, 각 농도에서 평균 회수율은 72.8~99.5%로 잔류 분석기준인 회수율 70~120% 및 분석오차 10% 미만으로 조사되어 잔류농약 시험법의 적합성을 확인할 수 있었다 (Fig. 5, Table 4).

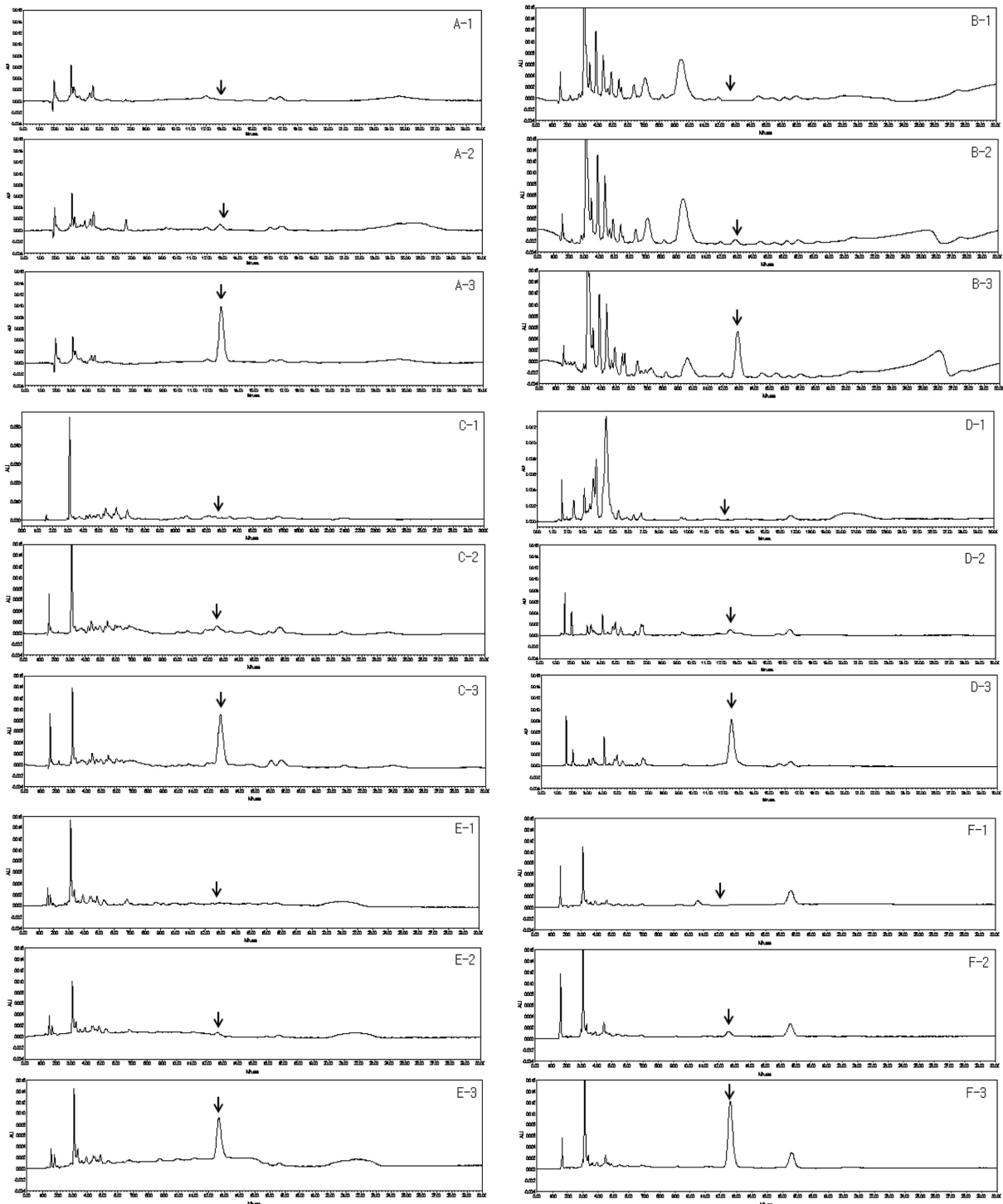


Fig. 5. HPLC-UVD chromatograms corresponding to korean melon (A); pepper (B); mandarin (C); potato (D); hulled rice (E); and soybean (F): 1, control; 2, spiked at 0.05 mg/kg; and 3, spiked at 0.5 mg/kg.

Table 5. Confirmative conditions for identifying pyriofenone

Instrument	LC-MS (Quattro Premier XE, Waters, USA)
Column	UG 120 C ₁₈ (2.0 mm I.D. × 150 mm, 3 μm, 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	40 V
Injection volume	5 μL

Table 6. Selected-ion of LC-MS for pyriofenone

Retention time (min)	Molecular weight	Exact mass	Fragment monitored (m/z)
4.2	365.8	365	366

본 연구에서 확립한 시험용액 조제 및 기기분석법을 이용하여 검체 중 피리오페논의 정량한계 및 검출한계를 구하였다. 분석을 위한 검출한계(LOD)는 기기분석시 크로마토그램에서 피크로 검출할 수 있는 한계농도를 의미하는 것으로 HPLC 상에서 신호대 잡음비(signal to noise ratio, S/N)가 3 이상을 나타내는 성분의 농도로 측정 가능한 최소검출량을 이용하여 산출하였다. 검출한계는 기기상의 최소검출량이 1.0 ng(S/N = 3)이었고 아래의 계산식에 따라 0.01 mg/kg이었고, 정량한계는 신호대 잡음비가 10 이상으로 아래의 계산식에 따라 0.05 mg/kg이었다. 국내 정량한계 범위는 국제 기준을 수용하고 있으며, Codex(Codex Alimentarius Commission, 2003)에서 규정하고 있는 분석법의 정량한계 기준에 따르면 본 시험법의 정량한계인 0.05 mg/kg이 국제 기준에 적합함을 확인할 수 있었다(Ministry of Food and Drug Safety, 2014).

검출한계 (mg/kg) = 최소검출량 (ng) ×

$$\frac{1}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{최종희석부피 (mL)}}{\text{시료 주입량 (μL)}}$$

$$= 1.0 \text{ (ng)} \times \frac{1}{20 \text{ (g)}} \times \frac{2 \text{ (mL)}}{10 \text{ (μL)}} = 0.01$$

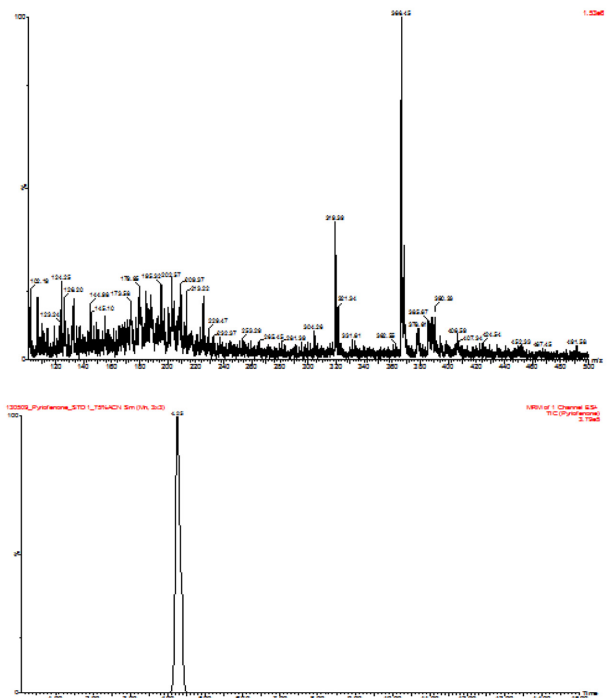
정량한계 (mg/kg) = 최소검출량 (ng) ×

$$\frac{1}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{최종희석부피 (mL)}}{\text{시료 주입량 (μL)}}$$

$$= 5.0 \text{ (ng)} \times \frac{1}{20 \text{ (g)}} \times \frac{2 \text{ (mL)}}{10 \text{ (μL)}} = 0.05$$

LC-MS를 이용한 잔류분의 재확인

본 연구에서 확립된 시험법의 신뢰성을 확보하기 위하여 재확인 시험을 하였다. 검체 중의 피리오페논을 확인하기 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-

**Fig. 6.** Full scan mass spectrum and chromatogram of pyriofenone standard solution analyzed by LC-MS.

Mass Spectrometer, LC-MS)를 사용하였고 확인 조건은 Table 5에 나타내었다.

피리오페논은 분자 구조상 질소, 산소원자의 비공유전자쌍과 이중결합 사이에서의 전자전이가 용이하여 이온화법으로 전자분무이온화법(electrospray ionization, ESI)법을 사용하였고 위의 분석조건에서 얻은 총이온 크로마토그램(total ion chromatogram, TIC)과 질량 스펙트럼으로 선택이온 모니터링(selected-ion monitoring, SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 질량이 365인 피리오페논 표준용액(1.0 μg/mL)을 10 μL/min 속도로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 366인 (M+H)⁺ 형태로 나타났다.

피크 강도에 가장 큰 영향을 미치는 cone voltage를 확인하기 위하여 LC-MS에 주입하는 피리오페논의 양을 일정하게 하여 cone voltage의 변화(10~70 V)에 따른 피크 강도의 차이를 알아보았다. 40 V에서 최대의 피크 강도가 나타나며 70 V 이상에서는 미량만 검출되었다. 또한, 이를 이온 스펙트럼(ion spectrum)에서 확인하고자 동일한 조건에서 스캔(scan) 모드로 확인한 결과 SIM 모드 결과와 동일한 결과를 나타내어 피리오페논 분석 시 최적의 cone voltage는 40 V임을 확인할 수 있었다. 따라서 cone voltage 40 V에서의 피리오페논의 질량 스펙트럼 분석 결과(Fig. 6) 366 m/z 이 최적화됨을 알 수 있었고 위의 조건에서 분석한 결과 피리오페논의 머무름 시간은 4.2분이었다(Table 6).

감사의 글

This study was carried out with the support of “Safety Evaluation and Analysis Method on Pesticide Residues in Foods-2013 (13161MFDS001)” from Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea in 2013.

Literature Cited

- Codex Alimentarius Commission (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rome, Italy.
- Electronic Code of Federal Regulations (eCFR) (2014) Pyriofenone; tolerances for residues. <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=e303fd4688e0fced07898e61a15ccdbc&ty=HTML&h=L&r=SECTION&n=40y25.0.1.1.27.3.19.380>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyriofenone. *EFSA Journal* 11(4):3147-3230.
- Ha, H. Y., D. S. Ra, W. C. Shin, G. J. Im and J. E. Park (2012) Survey of Pesticide use in Fruit Vegetables, Fruits, and Rice Cultivation Areas in Korea. *orean J. Pestic. Sci.* 16(4):395-400.
- Kim, J. Y., H. J. Ham, J. A. Do, J. H. Oh, Y. D. Lee and J. H. Hur (2013) Method development and validation for analysis of isopyrazam residues in agricultural products. *Korean J. Pestic. Sci.* 17(2):84-93.
- Ministry of Food and Drug Safety (2013) Korean Food Standards Codex.
- Ministry of Food and Drug Safety (2014) Practical commentary Korean Food Standards Codex pesticide residues analysis method. Fourth ed.
- Lee, J. H., H. W. Park, Y. S. Keum, C. H. Kwon, Y. D. Lee and J. H. Kim (2008) Dissipation pattern of boscalid in cucumber under green house condition. *Korean J. Pestic. Sci.* 12(6):7-73.
- MacBean, C (2012) The pesticide Manual, pp. 991-992., sixteenth ed., British Crop protection Council, Hampshire, UK.
- Noh, H. H., Y. S. Park, K. W. Kang, H. K. Park, K. H. Lee, J. Y. Lee, K. W. Yeop, S. R. Choi and K. S. Kyung (2010) Monitoring of pesticide residues in leafy vegetables collected from wholesale and traditional markets in Cheongju. *Korean J. Pestic. Sci.* 14(4):381-393.
- U.S. Environmental Protection Agency (2012) Pesticide Fact Sheet : Pyriofenone. http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-028828_01-Mar-12.pdf
- Yao, J. R., F. S. Dong, X. G. Liu, Y. Q. Zheng, X. L. Chen, B. T. Hu, Z. J. Zheng and J. Li (2007) Residue and behavior of pyribenzoxim 5% EC in paddy environment. *J. Agro-environ. Sci.* 5:1754-1758.

HPLC-UVD를 이용한 농산물 중 살균제 pyriofenone 분석법 확립

박혜진¹ · 김희정¹ · 도정아² · 권지은¹ · 윤지영¹ · 이지영¹ · 장문익^{1*} · 이규식¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 잔류물질과, ²첨단분석팀

요 약 피리오페논은 아릴페닐케톤계 농약으로, 식물 병원성 곰팡이의 부착 및 침투를 억제하여 방제 효과를 나타내는 살균제이다. 미국에서는 2012년에 피리오페논을 사용등록 하였으며, 우리나라에서는 2013년에 참외와 고추에 대해 잔류허용기준 설정을 추진하고 있다. 이에 따라, 본 연구에서는 식품 중 피리오페논의 안전관리를 위한 시험법을 개발하고자 하였다. 피리오페논은 분자량(365.8)이 크고 증기압이 1.9×10^{-6} Pa (25°C)로 휘발성이 낮은 편으로, 질소, 산소원자의 비공유전자쌍과 이중결합이 UVD에 높은 감도를 보여 HPLC-UVD를 분석기기로 선택하였다. 추출용매는 물질의 용해도와 추출효율을 고려하여 acetonitrile로 선정하였으며, 피리오페논이 옥탄올/물 분배계수 (logPow, 25°C)가 3.2인 비극성 물질이므로 증류수, 포화식염수와 dichloromethane을 사용하여 극성 불순물을 제거하도록 액-액 분배하였다. 분배 추출액을 silica 카트리지를 이용하여 정제하는데, hexane으로 세척한 후 hexane/acetone(90/10, v/v)로 용출하면 간섭 물질로부터 피리오페논을 효과적으로 정제할 수 있었다. 본 연구에서 확립한 시험법을 통한 대표작물에 대한 회수율은 72.8~99.5%이었고 분석오차는 10% 미만으로 코텍스 가이드라인((CAC/GL 40)에 적합하였다. LC-MS로 재확인 시험을 하여 시험법의 신뢰성과 선택성을 확보하였다. 본 연구에서 개발한 시험법은 식품 중 피리오페논의 안전관리를 위한 시험법으로 활용될 것이다.

색인어 살균제, 액체크로마토그래프-자외부흡광검출기, 액체크로마토그래프-질량분석기, 피리오페논