



LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Isoxaflutole과 대사산물(Diketonitrile)의 동시시험법 개발

고아영¹ · 김희정¹ · 도정아¹ · 장 진¹ · 이은향¹ · 주윤지¹ · 김지영² · 장문익^{1,*} · 이규식¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, ²서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과

Development of Simultaneous Analytical Method for Determination of Isoxaflutole and its Metabolite (Diketonitrile) residues in Agricultural Commodities Using LC-MS/MS

Ah-Young Ko¹, Heejung Kim¹, Jung Ah Do¹, Jin Jang¹, Eun-Hyang Lee¹, Yunji Ju¹, Ji Young Kim², Moon-Ik Chang^{1,*} and Gyu-Seek Rhee¹

¹Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Department of Food Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk 28159, Korea

²Imported Food Analysis Division, Seoul Regional Food and Drug Administration, Seoul, 07978, Korea

(Received on February 22, 2016. Revised on May 25, 2016. Accepted on June 17, 2016)

Abstract A simultaneous analytical method was developed for the determination of isoxaflutole and metabolite (diketonitrile) in agricultural commodities. Samples were extracted with 0.1% acetic acid in water/ acetonitrile (2/8, v/v) and partitioned with dichloromethane to remove the interference obtained from sample extracts, adjusting pH to 2 by 1 N hydrochloric acid. The analytes were quantified and confirmed via liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) in positive-ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). Matrix matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.02-2.0 µg/mL) for all the analytes into blank extract with $r^2 > 0.997$. For validation purposes, recovery studies were carried out at three different concentration levels (LOQ, 10LOQ, and 50LOQ) performing five replicates at each level. The recoveries were ranged between 72.9 to 107.3%, with relative standard deviations (RSDs) less than 10% for all analytes. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guideline (CAC/GL40, 2003). Furthermore, inter-laboratory study was conducted to validate the method. The proposed analytical method was accurate, effective, and sensitive for isoxaflutole and diketonitrile determination in agricultural commodities.

Key words Agricultural commodities, Analytical method, Diketonitrile, Isoxaflutole, LC-MS/MS

서 론

Isoxaflutole은 1992년 Bayer CropScience사에서 개발하여 1996년에 상품화된 isoxazole계 약제로 광엽잡초의 뿌리나 잎을 통해 식물체내로 흡수되어 plastoquinone의 합성에 관여하는 4-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase (HPPD)를 저해하거나 carotenoid의 생합성을 억제하여 식물을 고사시

키는 작용을 하는 이형성 제초제이다(Pallett et al., 1997, 1998; Pesticide manual 16th, 2012). Isoxaflutole은 그 자체로 살초활성을 발휘하지 않고 농약 살포 후 토양이나 식물 체내에 수분이 존재할 때 isoxazole ring내 N-O결합의 구조가 재배열되어 diketonitrile로 전환된 후 제초제의 기능을 수행하므로(Fig. 1)(Pallett et al., 1998; Vivani et al., 1998; Lin et al., 2002), 모화합물인 isoxaflutole 뿐만 아니라 대사산물인 diketonitrile의 잔류량을 포함하여 분석해야한다. 따라서 식품의약품안전처에서는 isoxaflutole의 잔류물의 정의를 isoxaflutole과 diketonitrile의 합으로 관리하고자 하였다

*Corresponding author
E-mail: 1004@korea.kr

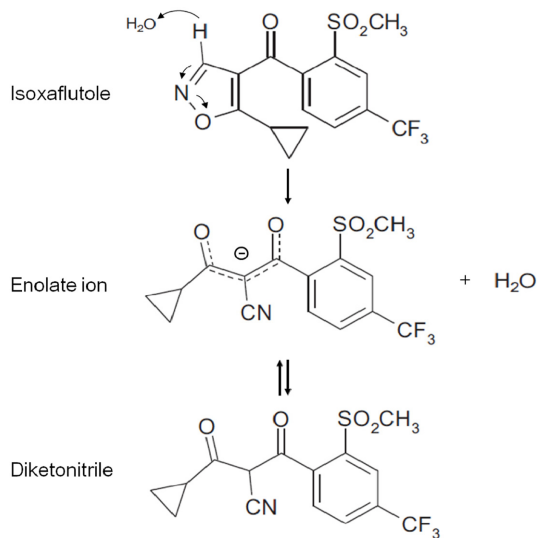


Fig. 1. Cleavage pathway of the N-O bond of isoxaflutole.

(식품의약품안전처 행정예고 제2016-7호, '16.01.06.).

2016년 현재 농산물 중 isoxaflutole의 국외 잔류허용기준 (MRL, maximum residue limit)은 국제식품규격위원회(옥수수, 0.01 mg/kg; 사탕수수, 0.02 mg/kg), 일본(옥수수, 콩과 식물 등 0.01-0.03 mg/kg), 유럽연합(과일류, 채소류, 곡류 등 0.02-0.1 mg/kg), 미국(대두, 옥수수 등 0.3-0.02 mg/kg)에서 설정하여 관리하고 있다. 국내의 경우 잔류허용기준이 설정되지 않았으나 수입식품의 안전성 확보를 위한 수입식품 잔류허용기준(Import tolerance)제도 운영에 따라 국내에 수입식품으로의 잔류허용기준 설정이 요청된 isoxaflutole의 GLP자료(농약 독성 및 작물에 대한 잔류자료보고서 등)를 검토 후 대두에 0.02 mg/kg 수준으로 기준이 신설될 예정이다(식품의약품안전처 행정예고 제2016-7호, '16.01.06.). 따라서 국내에 유통되는 수입식품에 잔류할 수 있는 isoxaflutole의 안전관리를 위하여 잔류허용기준 초과유무를 확인할 수 있는 시험법 개발이 필요하다.

Isoxaflutole의 잔류시험법으로는 식품공전(4.1.3.38)에 isoxaflutole을 포함한 3종 잔류농약에 대해 LC-MS를 이용한 방법이 고시되어 있는데, 현행 시험법은 대사산물을 포함하지 않는 시험법으로 isoxaflutole과 diketonitrile을 동시에 분석하는데 어려움이 있었다(Korean Food Standards Code, 2014). 그 외 보고된 시험법으로는 대사산물을 포함한 isoxaflutole에 대하여 GC-MS를 이용한 시험법과(Nandihalli, 1994), HPLC-UV를 이용한 시험법이 있으며(Plaisance, 1995), HPLC-UV와 LC-MS/MS의 분석 효율을 비교하고, LC-MS/MS를 이용한 개선된 시험법(Lin et al., 2002, Meyers et al., 2007; Lin et al., 2007) 등이 보고되었다. 기존 시험법은 토양, 물, 농산물(옥수수)만을 대상 시료로 하는 방법이므로, 국내 등록예정인 수입식품(대두)과 향후에 수입등록이 확대되거나 오남용에 대비하여 isoxaflutole 및 diketonitrile

의 잔류량을 확인할 수 있는 공인된 동시시험법의 개발이 요구되었다. 따라서 본 연구에서는 isoxaflutole 및 diketonitrile의 물리화학적 특성을 고려하고, 기존 시험법들을 참고하여 농산물 중 isoxaflutole 및 diketonitrile의 LC-MS/MS를 이용한 동시시험법 확립을 목적으로 수행하였다. 확립된 시험법은 과정별 최적화 연구를 통해 시료 전처리, 추출, 정제 및 기기분석 등의 효율을 고려한 시험법으로 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003) 시험법의 직선성, 선택성, 정밀성, 정확성 및 재현성 등을 검증하였으며, 검증 후 농산물 중 농약 안전관리를 위한 시험법으로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Isoxaflutole (98.5%)과 대사산물인 diketonitrile (99.5%)의 표준품은 Bayer Crop Science에서 제공받아 분석물질로 사용하였고(Table 1), acetonitrile (ACN), methanol, *n*-hexane, dichloromethane (DCM) 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 또한 hydrochloric acid (HCl), sodium chloride (NaCl)는 Wako (Osaka, Japan)로부터, 여과보조제(celite 545) 및 anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄)는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였고 acetic acid, formic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 추출에는 교반진탕장비(MMV-1000W, Eyela, Korea)를 사용하였고, 추출액 pH 조절에는 pH 미터기(Docu-pH plus meter, Sartorius, Germany)를 사용하였다. 검체는 식품의약품안전처에서 잔류농약 시험법 개발 시 고려하는 대표농산물 5종 감귤(과일류), 감자(서류), 고추(과채류), 대두(콩류), 현미(곡류) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

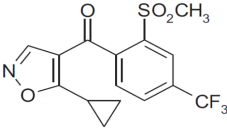
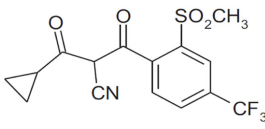
표준원액 및 표준용액의 조제

Isoxaflutole 및 diketonitrile 표준품 20.3 mg, 20.1 mg을 각각 20 mL의 acetonitrile 용해하여 1,000 µg/mL의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 농산물 검체의 무처리 추출물 900 µL에 20 µg/mL 표준용액 100 µL를 넣어 2.0 µg/mL matrix-matched 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 희석하여 0.02, 0.01, 0.1, 0.2, 1.0 및 2.0 µg/mL의 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

균질화한 검체 10 g(과일류, 채소류, 서류는 약 1 kg을 분

Table 1. Chemical structures and physicochemical properties of isoxaflutole and diketonitrile

Property	Isoxaflutole	Diketonitrile
Structure		
IUPAC name	5-cyclopropyl-1,2-oxazol-4-yl α,α,α -trifluoro-2-methyl- ρ -tolyl ketone	2-cyclopropylcarbonyl-3-(2-methylsulfonyl)-4-trifluoromethylphenyl)-3-oxopropanenitrile
CAS No.	141112-29-0	143701-75-1
Classification	Herbicide	Metabolite
Molecular formula	$C_{15}H_{12}F_3NO_4S$	$C_{15}H_{12}F_3NO_4S$
Molecular weight	359.3	359.3
Melting point	140°C	190°C
Density	1.42 g/cm ³	1.5 ± 0.1 g/cm ³
Log P _{ow}	2.34	2.04
Vapor pressure	1 × 10 ⁻³ mPa (25°C)	-
Solubility in water	6.2 mg/L (pH 5.5, 20°C)	326 mg/L
Solubility in solvent	Dichloromethane 346, Acetone 293, acetonitrile, ethyl acetate 233, n-hexane 0.1, toluene 31.2, methanol 13.8 (all in g/L, 20°C)	-

쇄한 후 그 10 g, 곡류 및 콩류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μ m를 통과하도록 분쇄한 후 그 10 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고(곡류 및 건조시료의 경우 0.1% acetic acid 수용액 20 mL를 넣어 30분 방치) 0.1% acetic acid in water/acetonitrile (2/8, v/v) 50 mL를 가하여 진탕기에서 10 분간 진탕하였다. 진탕 후 여과지가 깔려있는 부호너 깔때기로 여과보조제인 celite 545 약 10 g을 이용해 흡인여과한 뒤 acetonitrile 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내려 앞의 여액과 합하였다. 합친 여액에 증류수 100 mL를 더하고 pH 미터로 확인하며 1 N HCl을 천천히 가하여 pH 2가 되도록 하였다. 이를 500 mL 분액여두에 옮기고 NaCl 15 g 및 dichloromethane 50 mL를 차례로 가한 후 심하게 흔들여 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 dichloromethane 층을 Na_2SO_4 에 통과시켜 감압농축플라스크에 받는 과정을 2회 반복하였다. 이를 40°C 이하의 수욕 상에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 후, 잔류물에 acetonitrile을 가하여 최종 부피 5 mL가 되게 한 뒤 시린지 필터로 여과한 후 시험용액으로 하였다[지방성 검체(대두, 현미)의 경우 잔류물에 n-hexane 30 mL를 잔류물에 가하여 녹인 후 250 mL 분량의 분액여두에 옮기고 acetonitrile 30 mL으로 2회 분배 추출한다. 합친 acetonitrile층을 40°C에서 감압 농축한 후 잔류물에 acetonitrile을 가하여 최종부피 5 mL가 되게 한 뒤 시린지 필터를 이용해 여과한 후 시험용액으로 하였다.]

LC-MS/MS 분석조건

Isoxaflutole 및 diketonitrile의 동시분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass

Spectrometer, LC-MS/MS, Waters, Milford, USA)를 사용하였고, 분석용 역상 칼럼인 XBridge[®] C₁₈ (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 μ m, Waters, USA)칼럼을 선택하였으며 이동상으로 0.1% formic acid in methanol과 0.1% formic acid in water을 사용하여 최적화된 기류기 용리 방식을 적용하였다. 각 대상성분의 이온화는 ESI (electro-spray ionization) 법의 positive-ion mode를 사용하였다. LC-MS/MS 분석조건은 Table 2와 같다.

시험법의 검증

확립된 isoxaflutole 및 diketonitrile 동시시험법의 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 회수율(recovery), 재현성(reproducibility)에 대해 유효성을 검증하였다. 직선성의 확인을 위하여 isoxaflutole 및 diketonitrile을 각 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준 용액 0.02-2.0 μ g/mL의 농도 범위에 대한 각각의 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 각 무처리 시료에 isoxaflutole 및 diketonitrile의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 처리농도는 대표농산물 5종에 대하여 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도로 수행하였으며 각각의 농도 및 시료에 대하여 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)를 계산하여 시험법의 정확성과

Table 2. Analytical conditions for the determination of isoxaflutole and diketonitrile

Instrument	LC: Acquity UPLC (Waters, MA, USA) MS/MS: US/Quattro Premier XE (Waters, MA, USA)		
UPLC conditions			
Column	XBridge® C ₁₈ (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 μm)		
Column temperature	40°C		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in methanol B: 0.1% formic acid in distilled water		
Gradient table	Mobile phase		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	10	90
	4	10	90
	9	90	10
	10	90	10
	12	10	90
	16	10	90
MS/MS conditions			
Ion mode	ESI positive mode		
Capillary voltage	4.5 kV		
Source temperature	150°C		
Desolvation temperature	350°C		
Desolvation gas flow	600 L/h		
Cone gas flow	50 L/h		

정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한 서울지방식품의약품 안전청과 실험실간 검증을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

결과 및 고찰

최적기기분석조건 확립

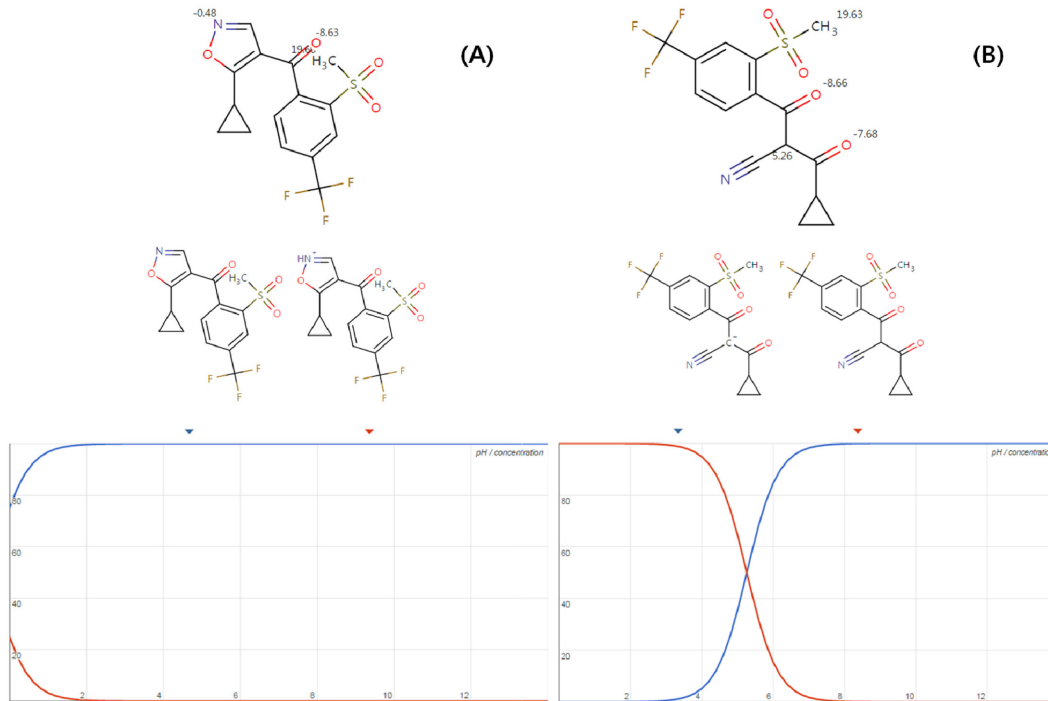
Isoxaflutole과 diketonitrile의 Low P_{ow}는 각각 2.34, 2.04로 중간극성을 띄며, isoxaflutole의 증기압이 1×10^{-3} mPa (25°C)으로 휘발성이 낮고 200°C 이상에서 분해되는 특성을 갖는 열불안정성 화합물로 기체크로마토그래프(GC, Gas Chromatograph)를 이용한 분석은 어렵고 액체크로마토그래프(LC, Liquid Chromatograph)를 이용한 분석이 가능하다. 현행 식품공전에서는 isoxaflutole을 포함하는 3종의 농약을 LC-MS를 이용하여 분석하는 다성분 시험법(4.1.3.38)을 고시하고 있으나(Korean Food Standards Code, 2014) 대사산물을 포함하지 않는 시험법이므로 LC-MS/MS를 이용하여 isoxaflutole 및 대사산물을 동시에 분석하였다. LC-MS/MS에 의한 분석은 최적 이온화조건에서 첫 번째 precursor ion을 선정하고, ion-focusing을 거쳐 product ion을 선정하며 각 선발전 이온과 일치하는 이온만을 검출하므로 LC-MS로

분석하는 것에 비해 선택성이 우수하고 검출감도를 극대화시킬 수 있다. 이동상에 사용한 formic acid는 protonation enhancer로서 분석물질의 [M+H]⁺ 이온 생성에 용이하게 작용하고 산성조건을 유지하여 isoxaflutole 분자 내 isoxazole ring의 N-O 결합이 분해되는 것을 억제해 isoxaflutole의 안정성을 향상시키는 작용을 하였다(C.H. Lin, 2002). 최적 특성 이온 선정을 위해서는 질량이 359.3인 isoxaflutole과 diketonitrile 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입하여 [M+H]⁺ 이온인 360.2 mass 값을 확인하였고, cone voltage는 두 화합물 모두 20 V에서 최대의 peak 강도가 나타남을 확인하였다. 또한 분석의 선택성과 검출감도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였는데 collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하고 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 설정하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 2에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 이온과 머무름 시간은 Table 3에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는

Table 3. Selected-ion of LC-MS/MS for isoxaflutole and diketonitrile

Compound	Retention time (min)	Molecular weight	Precursor ion (m/z)	Fragment monitored (m/z)	CE ^a
Isoxaflutole	9.4	359.3	360.2	220	30
				251 ^b	20
Diketonitrile	8.8	359.3	360.2	69 ^b	10
				251	20

^a Collision energy (eV), ^b Quantitation ion.

**Fig. 2.** pKa graph of (A) isoxaflutole and (B) diketonitrile.

증강현상이 나타날 수 있으므로 대상 시료별로 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

추출 및 정제조건 확립

Isoxaflutole 및 diketonitrile은 중간극성 화합물로 수용성 유기용매 사용 시 추출효율이 높을 것으로 판단하여 methanol과 acetonitrile의 추출효율을 확인하였다. 그 결과, methanol로 추출 시 isoxaflutole의 회수율 및 재현성이 현저히 낮았고 acetonitrile 추출 시 isoxaflutole의 회수율은 90%로 양호하였으나, diketonitrile의 회수율이 76%로 비교적 낮은 것으로 확인되었다. isoxaflutole의 추출효율은 용매 별 용해도의 차이에 의한 것으로 methanol (용해도 13.8 g/L)보다 acetonitrile (용해도 233 g/L)에 용해도가 월등하게 높기 때문에 acetonitrile의 추출효율이 높은 것으로 판단되었다. 반면 diketonitrile은 pKa 값이 5.2인 약산성 화합물로 pH 3 이하일 때 비해리 상태로 존재하는 특성을 갖는 것으로 보아(Fig. 2) 추출효율의 향상을 위해 유기용매에 산성 수용액

을 첨가한 뒤 산성조건에서의 추출효율을 확인하였다. 추출용매에 첨가한 산 용액으로는 1% formic acid 용액과 1% acetic acid 용액을 비교하였는데, isoxaflutole은 acetonitrile에 두 산 용액을 첨가하였을 때 모두 유사한 추출효율을 보였고, diketonitrile의 경우 1% acetic acid 용액을 첨가한 acetonitrile에서 높은 추출효율을 보여 추출용매로는 acetonitrile, 산 용액은 acetic acid를 선정하였다. 최적의 acetic acid 농도 설정을 위하여 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1%의 acetic acid 농도에 대한 회수율을 비교한 결과, isoxaflutole은 산의 농도가 증가할수록 회수율이 점차 감소하였고, diketonitrile은 산의 농도가 증가할수록 회수율이 증가하는 경향을 보였다. 이는 isoxaflutole의 경우 pH 2-14 범위에서는 비해리 상태로 존재하지만 pH 2 이하의 강산성 조건에서 일부가 해리되는 특성이 있어 유기용매에 대한 추출효율이 감소하는 것으로 보이며, diketonitrile의 경우 산의 농도가 높아질수록 이온화가 억압되어 유기용매에 대한 추출효율이 증가하는 것으로 판단된다. 등록예정인 대두를 포함한 시험법 적용

대표농산물 5종 중 감귤의 경우, 0.1% acetic acid 수용액을 사용했을 때 두 화합물 모두 95% 이상의 높은 회수율이 나타났다(Table 4). 그러나 수분함량이 낮은 대두(수분함량 8.5%)와 현미(수분함량 11.4%) 시료에서 상대적으로 저조한 회수율 결과가 나타나 감귤시료를 제외한 감자, 고추, 대두, 현미 시료에 0.1% acetic acid 용액의 양을 더한 뒤 추출 효율을 확인하였다(Table 5). 고추와 감자시료에서는 용매 조성의 변화에 회수율이 크게 영향을 받지 않았고 대두와 현미시료에서는 0.1% acetic acid in water/acetonitrile (2/8, v/v)에서 가장 높은 회수율을 얻어 이를 최적 추출용매의 조성을 확인하였다. 그러나 0.1% acetic acid in water/acetonitrile (2/8, v/v)의 용매를 사용하여도 대두, 현미시료에서 diketonitrile의 회수율이 72.8-76.0%로 나타나, 보다 추출효율을 높이기 위해 습윤화 단계에서 0.1% acetic acid 수용액을 사용하였을 때의 회수율을 확인하였다. 그 결과, 증류수를 이용하는 것 보다 acetic acid 수용액으로 습윤화 후 추출 시 더욱 효과적으로 diketonitrile을 추출할 수 있었는데, 이는 대두와 현미시료를 약산성 조건에서 습윤화하면 diketonitrile의 이온화를 억압하여 유기용매 가용성 형태를 유지시켜 추출효율을 높일 수 있는 것으로 판단되었다(Fig. 3).

현행 식품공전 isoxaflutole 시험법(4.1.3.38)에서는 활성탄/아미노프로필 카트리지를 이용하여 acetonitrile/toluene (75/25, v/v) 15 mL를 용출시키는 정제방법이 고시되어 있는데(Korean Food Standards Code, 2014), 이 방법을 isox-

aflutole과 diketonitrile에 모두 적용하였을 때 diketonitrile이 거의 회수되지 않는 것을 확인하였다. 이는 isoxaflutole에 비해 diketonitrile의 극성도가 높아 카트리지에 더욱 강하게 흡착하여 acetonitrile/toluene (75/25, v/v)의 사용으로는 용출이 되지 않는 것으로 보인다. 이에 기존 공전시험법으로는 isoxaflutole 및 diketonitrile을 동시분석하기에 적합하지 않아 동시분석이 가능한 정제방법이 필요하였다. 본 연구에서는 시료 추출물로부터 불순물을 제거하기 위하여 액-액 분배법을 적용하였는데, isoxaflutole과 diketonitrile의 특성을 살펴보면 두 화합물 모두 pH 2-3 범위에서 이온화가 억압되어 비해리 상태로 존재하므로(Fig. 2) 추출액을 1 N HCl을 이용하여 pH 2, 2.5, 3으로 조절한 뒤 dichloromethane으로 액-액분배를 수행하여 분배율을 비교하였다. 회수율이 가장 저조했던 대두, 현미시료에 적용하여 각각의 pH에 대한 회수율을 확인했으며, 가장 높은 회수율을 얻었던 pH 2 조건을 액-액분배 시 pH 조건으로 설정하였다(Table 6). 선정된 pH 조건에서 isoxaflutole과 diketonitrile을 비이온 상태로 전환한 뒤 NaCl을 첨가하여 수용액 층의 이온강도를 증대시켜 dichloromethane으로 2회 분배할 경우 우수한 효율로 회수가 가능하였으며, 시료 중 간섭물질을 충분히 제거할 수 있어 추가적인 정제 없이 효율적으로 분

Table 4. Effects of acetic acid concentration on isoxaflutole and diketonitrile extraction efficiency in mandarin

Acetic acid conc* (%)	Recovery (%)	
	Isoxaflutole	Diketoneitrile
0.0	90.4	76.3
0.05	92.7	86.1
0.1	95.0	99.4
0.2	75.5	90.0
0.5	83.8	98.9
1.0	77.4	97.3

* Acetic acid concentration (%) in distilled water/ACN (1:9, v/v).

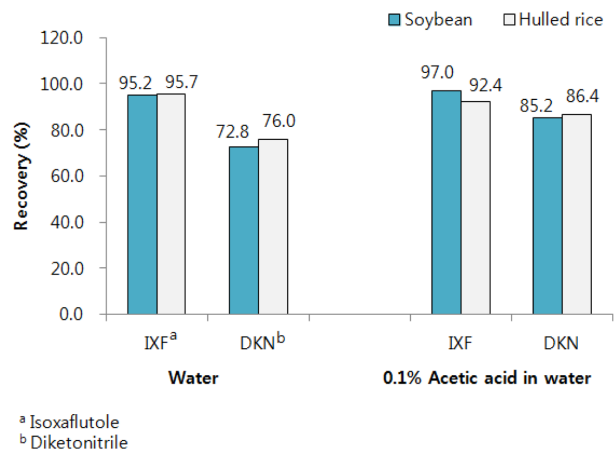


Fig. 3. Effects of hydration solution for isoxaflutole and diketoneitrile extraction efficiency in samples.

Table 5. Comparisons of extraction solvents for isoxaflutole and diketoneitrile analysis

Sample	Extraction efficiency (%)					
	1/9 ^a		2/8 ^b		3/7 ^c	
	Isoxaflutole	Diketoneitrile	Isoxaflutole	Diketoneitrile	Isoxaflutole	Diketoneitrile
Potato	-	-	93.2	102.4	88.9	95.2
Pepper	91.3	75.8	91.7	96.4	96.1	94.9
Soybean	86.2	71.6	95.2	72.8	80.8	64.2
Hulled rice	80.2	54.1	95.7	76.0	85.2	70.1

^a 0.1% acetic acid in distilled water/ACN (1/9, v/v), ^b 0.1% acetic acid in distilled water/ACN (2/8, v/v), ^c 0.1% acetic acid in distilled water/ACN (3/7, v/v).

Table 6. Effects of extract pH on isoxaflutole and diketonitrile liquid-liquid partition efficiency

Sample	Recovery (%)					
	pH 2.0		pH 2.5		pH 3.0	
	IXF ^a	DKN ^b	IXF	DKN	IXF	DKN
Soybean	87.1	105.5	92.8	78.0	88.0	74.4
Hulled rice	101.5	97.1	92.4	81.1	82.7	63.5

^a Isoxaflutole, ^b Diketonitrile.

Table 7. Validation results of analytical method for the determination of isoxaflutole and diketonitrile residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Mean* ± RSD (%)		LOQ (mg/kg)
		Isoxaflutole	Diketonitrile	
Mandarin	0.01	84.0 ± 8.0	93.9 ± 9.2	0.01
	0.1	94.2 ± 1.1	92.1 ± 6.7	
	0.5	96.6 ± 1.8	94.2 ± 1.6	
Potato	0.01	78.9 ± 6.5	84.2 ± 8.1	
	0.1	94.1 ± 6.1	78.1 ± 4.5	
	0.5	90.9 ± 4.4	88.6 ± 2.3	
Pepper	0.01	76.1 ± 5.9	84.5 ± 4.0	
	0.1	77.6 ± 4.5	77.5 ± 3.4	
	0.5	79.9 ± 3.0	81.9 ± 2.1	
Soybean	0.01	72.9 ± 8.7	107.3 ± 9.2	
	0.1	87.4 ± 4.0	97.4 ± 0.7	
	0.5	75.5 ± 3.1	86.8 ± 2.3	
Hulled rice	0.01	89.8 ± 7.9	107.0 ± 5.0	
	0.1	90.1 ± 5.8	85.9 ± 4.5	
	0.5	86.1 ± 5.1	85.9 ± 3.6	

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

석 가능하였다. 다만, 추출액 중 유지성분을 함유하고 있는 지방성 시료인 대두, 현미의 경우 추출 시 다량의 유지성분이 동시에 추출되어 농축 후 잔여물이 남기 때문에 유지 및 비극성 성분의 제거를 위해 *n*-hexane과 acetonitrile을 이용한 정제법을 추가 적용하였다.

시험법의 검증

선택성 및 직선성

Isoxaflutole 및 diketonitrile은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 평가하였다. 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 시료를 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 무처리 시료 중 isoxaflutole과 diketonitrile의 머무름 시간과 질량 대 전하비 (*m/z*)가 같은 어떠한 간섭물질도 검출되지 않아 확립된 본 시험법의 높은 선택성을 확인할 수 있었다. 또한, 직선성 (linearity)을 확인하기 위하여 표준원액을 무처리 추출물로 희석하여 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 1.0 그리고 2.0 µg/mL 5 µL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 결정계수(*r*²)가 0.997

이상으로 높은 직선성을 보였다(Fig. 4).

검출한계와 정량한계

isoxaflutole 및 diketonitrile의 검출한계는 기기 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 3 이상으로 결정하여 분석기기의 최소검출량 0.03 ng에 따른 검출한계는 0.003 mg/kg이었고, 정량한계는 신호 대 잡음비(S/N ratio) 10 이상으로 결정하여 0.01 mg/kg이었다. 본 시험법의 정량한계는 국내에서 수입식품 중 잔류허용기준으로 설정예정인 대두에 대한 0.02 mg/kg의 1/2 이하로 본 시험법으로 잔류허용기준 준수여부를 판별하기에 적합 할 것으로 판단된다. 검출한계 및 정량한계의 산출식은 아래와 같다.

$$\text{검출한계(mg/kg)} = \frac{\text{최소검출량(ng)} \times 1}{\text{시료량(g)}} \times \frac{\text{최종희석부피(mL)}}{\text{시료 주입량(µL)}} \quad (1)$$

$$= 0.03 \text{ (ng)} \times \frac{1}{10 \text{ (g)}} \times \frac{5 \text{ (mL)}}{5 \text{ (µL)}} = 0.003 \quad (2)$$

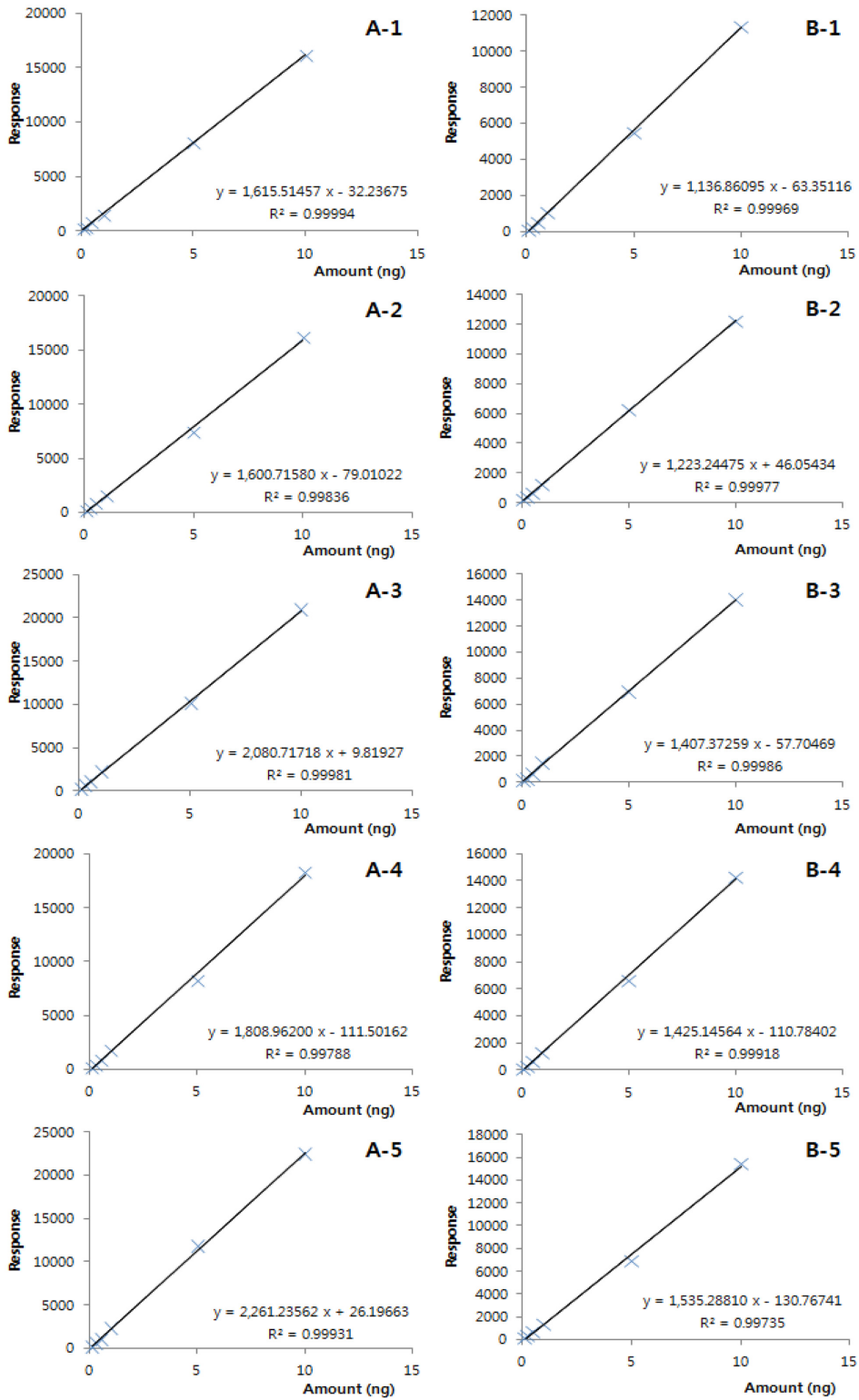


Fig. 4. Matrix-matched calibration curves of (A) isoxaflutole and (B) diketonitrile in (1) mandarin, (2) potato, (3) pepper, (4) soybean, and (5) hulled rice.

$$\frac{\text{정량한계 (mg/kg)}}{\text{시료량 (g)}} = \frac{\text{최소검출량 (ng)} \times \frac{1}{\text{최종 희석부피 (mL)}}}{\text{시료 주입량 (\mu L)}} \quad (3)$$

$$= 0.1 \text{ (ng)} \times \frac{1}{10 \text{ (g)}} \times \frac{5 \text{ (mL)}}{5 \text{ (\mu L)}} = 0.01 \quad (4)$$

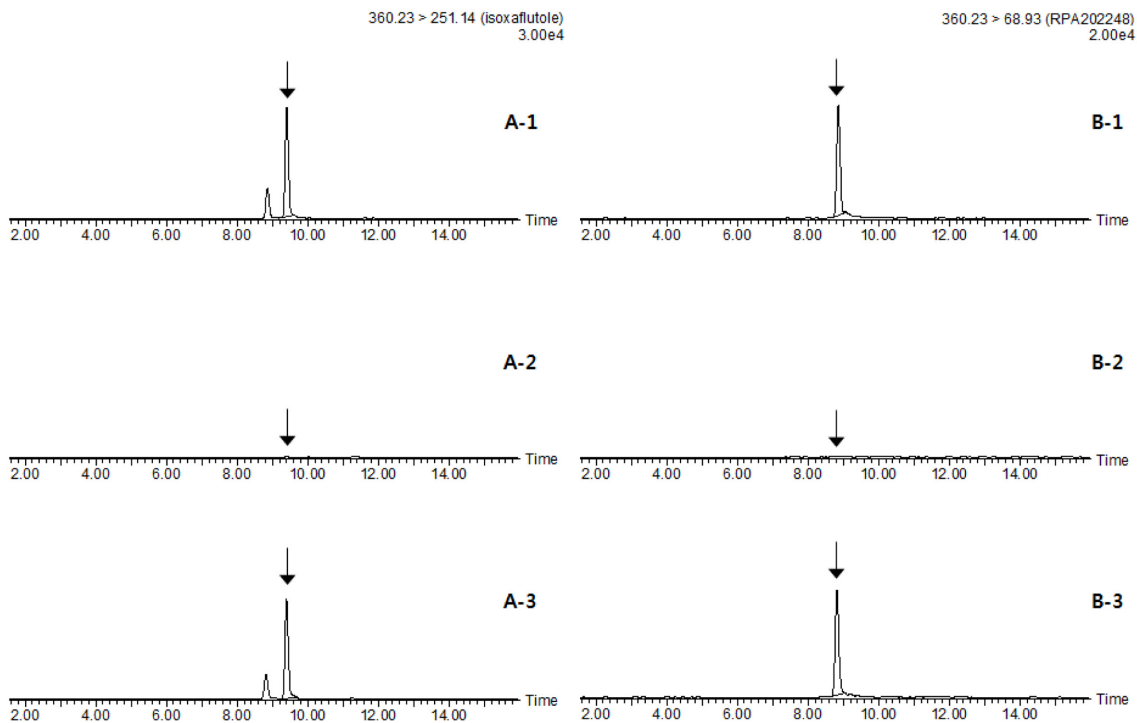


Fig. 5. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms (fortification concentration: 0.1 mg/kg) of (A) isoxaflutole and (B) diketonitrile in (1) matrix-matched standard, (2) soybean control, (3) recovery in soybean.

Table 8. Inter-laboratory validation results of analytical method for isoxaflutole and diketonitrile in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Isoxaflutole				Diketonitrile			
		Recovery ± RSD (%)		Average (%)	CV ^c (%)	Recovery ± RSD (%)		Average (%)	CV ^c (%)
		LAB1 ^a	LAB2 ^b			LAB1 ^a	LAB2 ^b		
Mandarin	0.01	93.9 ± 9.2	102.3 ± 6.1	93.1	0.4	84.0 ± 8.0	94.1 ± 5.7	94.0	2.4
	0.1	92.1 ± 6.7	94.4 ± 4.9	94.3	0.1	94.2 ± 1.1	108.4 ± 1.8	100.2	11.5
	0.5	94.2 ± 1.6	91.8 ± 2.8	94.2	3.6	96.6 ± 1.8	108.6 ± 6.5	101.4	10.0
Potato	0.01	84.2 ± 8.1	85.8 ± 9.2	82.4	5.9	78.9 ± 6.5	113.2 ± 3.9	98.7	20.8
	0.1	78.1 ± 4.5	95.5 ± 2.2	94.8	1.0	94.1 ± 6.1	92.8 ± 2.9	85.4	12.2
	0.5	88.6 ± 2.3	99.8 ± 6.2	95.3	6.6	90.9 ± 4.4	98.7 ± 2.5	93.6	7.7
Pepper	0.01	84.5 ± 4.0	76.2 ± 6.1	76.2	0.1	76.1 ± 5.9	84.1 ± 8.6	84.3	0.4
	0.1	77.5 ± 3.4	90.9 ± 3.4	84.3	11.2	77.6 ± 4.5	98.0 ± 1.9	87.7	16.5
	0.5	81.9 ± 2.1	89.2 ± 2.4	84.5	7.8	79.9 ± 3.0	101.6 ± 3.0	91.8	15.2
Soybean	0.01	107.3 ± 9.2	71.9 ± 2.8	72.4	0.9	72.9 ± 8.7	114.7 ± 2.4	111.0	4.7
	0.1	97.4 ± 0.7	103.1 ± 5.1	95.2	11.7	87.4 ± 4.0	113.1 ± 2.5	105.3	10.5
	0.5	86.8 ± 2.3	86.1 ± 2.4	80.8	9.2	75.5 ± 3.1	97.7 ± 2.6	92.3	8.3
Hulled rice	0.01	107.0 ± 5.0	91.8 ± 6.8	90.8	1.6	89.8 ± 7.9	113.7 ± 7.3	110.4	4.6
	0.1	85.9 ± 4.5	95.1 ± 2.7	92.6	3.8	90.1 ± 5.8	94.6 ± 1.3	90.2	6.9
	0.5	85.9 ± 3.6	92.4 ± 2.9	89.3	5.0	86.1 ± 5.1	98.1 ± 0.9	92.0	9.4

^a Ministry of Food and Drug Safety

^b Seoul Regional Food and Drug Administration

^c Coefficient of variation of inter-laboratory.

시험법의 회수율
시험법의 정확성을 평가하기 위하여 5종의 농산물 시료에

정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배 수준인 0.01, 0.1과 0.5 mg/kg의 농도로 회수율 실험을 5회 반복하여 수

행하였다. 시험 결과 각 농도에서 isoxaflutole과 diketonitrile의 평균 회수율은 각각 72.9-96.6%, 77.5-107.3%이었고, 이때 상대표준편차는 9.2% 미만으로 조사되어 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인(CODEX Alimentarius Commission, CAC/GL 40, 2003)의 잔류농약 분석 기준에서 상대표준편차가 처리농도 $>0.001 \text{ mg/kg}$ $\leq 0.01 \text{ mg/kg}$ 의 30%, $>0.01 \text{ mg/kg}$ $\leq 0.1 \text{ mg/kg}$ 의 20%, $>0.1 \text{ mg/kg}$ $\leq 1 \text{ mg/kg}$ 의 15%보다 낮아 기준에 부합하므로 모든 분석물질에 대한 높은 정확성, 재현성, 효율성 확인 및 잔류농약 분석 기준에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 7). LC-MS/MS를 이용하여 분석한 isoxaflutole과 diketonitrile 회수율 크로마토그램은 Fig. 5에 제시하였다.

실험실간 검증

시험법의 유효성 입증을 위해 서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 서울지방식품의약품안전청에 제공하고 동일한 방법으로 분석을 수행한 후 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 isoxaflutole과 diketonitrile의 평균 회수율은 각각 71.9-103.1%, 84.1-114.7%이고 표준편차는 10% 미만으로 측정되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 72.4-111.0%, 변이계수(CV%) 또한 21% 미만으로 모든 처리구에서 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)에서 제시한 기준 처리농도 $>1 \text{ mg/kg}$, $\leq 0.01 \text{ mg/kg}$ 의 45%, $>0.01 \text{ mg/kg}$, $\leq 0.1 \text{ mg/kg}$ 의 32%보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Table 8).

결 론

이 연구는 농산물 중 isoxaflutole 및 대사산물(diketoneitrile)의 안전관리를 위한 공정시험법 확립을 위해 수행하였으며 시험법의 선택성, 검출한계 및 정량한계, 회수율에 대한 검증을 통하여 공정시험법으로의 유효성을 확인하였다. isoxaflutole 및 diketoneitrile를 효과적으로 동시에 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 사용하였고, 0.1% acetic acid in water/acetonitrile (2/8, v/v) 혼합액으로 추출 후 dichloromethane을 이용한 액-액 분배법으로 시료의 불순물을 정제하였다. 개발된 isoxaflutole 및 diketoneitrile 시험법의 회수율은 각각 72.9-96.6%, 77.5-107.3%였으며, 분석오차는 9.2% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 서울지방식품의약품안전청과의 실험실간 검증 결과도 농산물 시료 및 처리수준에 관계없이 평균 회수율 결과 72.4-111.0%, 변이계수(CV%) 21% 미만을 나타내어 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 1993)의 조건을 만족하는 수준임을 확인하였다. 개발된 시험법은 국제적 잔류농약 분석 가이드라인에 적합한 수준이었으며 농산물 중 isoxa-

flutole 및 diketoneitrile 잔류검사를 위한 식품공전 공정시험법으로 활용하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처의 연구개발비(15161식품안042)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Literature Cited

- CAC/GL 40 (1993) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis.
- Lin, C. H., R. N. Lerch, E. M. Thurman, H. E. Garrett and M. F. George (2002) Determination of isoxaflutole (balance) and its metabolites in water using solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet of mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 50:5816-5824.
- Lin, C. H., R. N. Lerch, H. E. Garrett, V-X. Li and M. F. George (2007) Improved HPLC-MS/MS method for determination of isoxaflutole (balance) and its metabolites in soils and forage plants. *J. Agric. Food Chem.*, 55:3805-3815.
- CODEX (2014), Pesticide residue in food and feed <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticide/en>
- EPA(United states Environmental Protection Agency) (2011) <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/ECFR?SID=69440ce5a203b1b965485809036fa4d0&mc=true&page=simple>
- Vivani, F., J. P. Little and K. E. Pellett (1998) The Mode of action of isoxaflutole II. Characterization of the inhibition of carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketoneitrile derivative of isoxaflutole. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62:125-134.
- Pallett, K. E., J. P. Little, M. Sheekey, P. Veerasekaran and F. Viviani (1997) Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: The mode of action of the herbicide RPA 201772 (Isoxaflutole). *Pestic. Sci.* 50:83-84.
- Pallett, K. E., J. P. Little, M. Sheekey, and P. Veerasekaran (1998) The mode of action of isoxaflutole I. physiological effects, metabolism, and selectivity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62:113-124.
- Nandihalli. U.B., (1994) EXP 30953B/Field Corn/Magnitude of Residue (US93702R): Analytical method for the determination of residue of RPA 201772, RPA 202248, and RPA 203328 in corn forage, silage, grain, and fodder. pp 1-41, RPAC File No. 44663.
- Macbean, C. (2012) The pesticide manual sixteenth ed, BCPC, pp. 680-681.
- Meyer, M. T., E. A. Lee and E. A. Scribner (2007) Methods of Analysis by the U.S. geological survey organic geochemistry research group-determination of dissolved isoxaflutole and its sequential degradation products, diketoneitrile and benzoic

acid, in water using solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass Spectrometry. U.S. Geological survey techniques and methods, book 5, A9. <http://pubs.usgs.gov/tm/2007/tm5a9/pdf/TM5A9.pdf>

Plaisance, R. S. (1995) Method of determination for isoxaflutole (RPA 201772), and its metabolites RPA 202248, RPA

203328, and RPA 205834 in/on agricultural soil. Soil method of determination-version 2.0. pp 1-36, RPAC File No.44650

Ministry of Food and Drug Safety (2014) Korean Food Standards Code.

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Isoxaflutole과 대사산물(Diketonitrile)의 동시시험법 개발

고아영¹ · 김희정¹ · 도정아¹ · 장 진¹ · 이은향¹ · 주윤지¹ · 김지영² · 장문의^{1,*} · 이규식¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, ²서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과

요 약 Isoxaflutole은 isoxazole계 화합물로 광엽잡초의 체내로 흡수되어 plastoquinone의 합성에 관여하는 4-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase (HPPD)를 저해하거나 carotenoid의 생합성을 억제하는 이행성 체초제이다. 본 연구에서는 국내 신규농약 isoxaflutole에 대한 안전관리를 위해 농산물 중 isoxaflutole 및 diketonitrile의 잔류시험법을 개발하였다. 농산물 시료(감귤, 감자, 고추, 현미, 대두) 중 isoxaflutole 및 diketonitrile을 0.1% acetic acid in water/acetonitrile (2/8, v/v)으로 추출한 뒤 dichloromethane을 이용해 분배한 후, LC-MS/MS로 분석하였다. 시험법의 직선성은 농도 대비 피크면적과의 결정계수(r^2)가 0.997 이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.003, 0.01 mg/kg으로 높은 감도를 나타냈다. 농산물 시료 중 모든 처리구에서 평균 회수율은 72.9%-107.3% (RSD 9% 이내)였고, 타실험실과의 실험실간 검증 결과에서도 72.4-111.0%를 나타내어 검증 결과는 모두 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)의 기준이내를 만족하는 값으로 확인되었다. 따라서 개발된 시험법의 낮은 검출한계 및 정량한계, 우수한 직선성, 회수율 시험을 통한 양호한 정밀성 및 재현성 등이 입증되어 농산물 중 isoxaflutole 및 diketonitrile을 분석하기 위한 식품공전 공정시험법으로 활용하고자 한다.

색인어 농산물, 시험법, diketonitrile, isoxaflutole, LC-MS/MS