

Research Article



CrossMark

Open Access

QuEChERS법을 활용한 농산물 중 제초제 Tolpyralate의 최적 분석법 선별 및 검증

이한솔¹, 박지수¹, 이수정¹, 신혜선¹, 김지영², 윤상순^{1*}, 정용현¹, 오재호¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,

²식품의약품안전처 서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과

Application and Validation of an Optimal Analytical Method using QuEChERS for the determination of Tolpyralate in Agricultural Products

Han Sol Lee¹, Ji-Su Park¹, Su Jung Lee¹, Hye-Sun Shin¹, Ji-Young Kim², Sang Soon Yun^{1*}, Yong-hyun Jung¹ and Jae-Ho Oh¹ (¹Pesticide 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, ²Import Food Analysis Division, Seoul Regional Food and Drug Administration, Ministry of Food and Drug Safety, Seoul 07978, Korea)

Received: 18 June 2020/ Revised: 21 July 2020/ Accepted: 11 September 2020

Copyright © 2020 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Han Sol Lee

<https://orcid.org/0000-0003-4455-0381>

Ji-Su Park

<https://orcid.org/0000-0002-0960-4906>

Su Jung Lee

<https://orcid.org/0000-0002-5325-8342>

Hye-Sun Shin

<https://orcid.org/0000-0001-7364-3902>

Ji-Young Kim

<https://orcid.org/0000-0002-6330-6731>

Sang Soon Yun

<https://orcid.org/0000-0002-7920-2232>

Yong-hyun Jung

<https://orcid.org/0000-0002-7789-0836>

Jae-Ho Oh

<https://orcid.org/0000-0002-4298-1965>

Abstract

BACKGROUND: Pesticides are broadly used to control weeds and pests, and the residues remaining in crops are managed in accordance with the MRLs (maximum residue limits). Therefore, an analytical method is required to quantify the residues, and we conducted a series of analyses to select and validate the quick and simple analytical method for tolpyralate in five agricultural products using QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)

method and LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry).

METHODS AND RESULTS: The agricultural samples were extracted with acetonitrile followed by addition of anhydrous magnesium sulfate, sodium chloride, disodium hydrogencitrate sesquihydrate and trisodium citrate dihydrate. After shaking and centrifugation, purification was performed with d-SPE (dispersive-solid phase extraction) sorbents. To validate the optimized method, its selectivity, linearity, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation), accuracy, repeatability, and reproducibility from the inter-laboratory analyses were considered. LOQ of the analytical method was 0.01 mg/kg at five agricultural products and the linearity of matrix-matched calibration were

*Corresponding author: Sang Soon Yun
Phone: +82-43-719-4211; Fax: +82-43-719-4200;
E-mail: yss0520@korea.kr

good at seven concentration levels, from 0.0025 to 0.25 mg/L ($R^2 \geq 0.9980$). Mean recoveries at three spiking levels ($n=5$) were in the range of 85.2~112.4% with associated relative standard deviation values less than 6.2%, and the coefficient of variation between the two laboratories was also below 13%. All optimized results were validated according to the criteria ranges requested in the Codex Alimentarius Commission (CAC) and Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) guidelines.

CONCLUSION: In conclusion, we suggest that the selected and validated method could serve as a basic data for detecting tolpyralate residue in imported and domestic agricultural products.

Key words: Agricultural Products, Analytical Method, Herbicide, HPPD Inhibitor, Tolpyralate

서 론

Tolpyralate ((*RS*)-1-[1-ethyl-4-[4-mesy-3-(2-methoxyethoxy)-*o*-toluoyl] pyrazol-5-yloxy]ethyl methyl carbonate)는 Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.에서 개발한 benzoylpyrazole 계 약제로 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD) 효소 활성을 억제하여 옥수수 재배 시 발생하는 일년생 잡초와 광엽 잡초를 방제하는 발아후 제초제이다. 4-HPPD는 아미노산인 티로신(tyrosine)을 분해하여 광합성에서 전자전달에 관여하는 플라스토퀴논(plastoquinone)과 비타민E의 작용을 갖는 천연물질인 토코페롤(tocopherol) 등을 합성한다. 따라서 4-HPPD의 활성 억제는 간접적으로 카로티노이드(carotenoid) 생합성 경로의 PDS (phytoene desaturase step) 효소에 영향을 주어 카로틴 형성이 억제되고 엽록소인 클로로필(chlorophyll)의 붕괴가 일어나 신엽의 백화(whitening)현상을 보이며 수일 내에 식물체를 고사시킨다[1-3]. 또한 플라스토퀴논 및 토코페롤은 식물체 내에서 항산화제의 역할을 하여 4-HPPD 효소가 저해되면 식물체 내에 일중항 산소와 활성산소가 잔류하게 되고 이로 인해 단백질, 지질 및 광합성 복합체 등이 파괴된다. 국외 연구에서는 tolpyralate를 다른 작용기작을 나타내는 제초제인 chloro-acetamide, dicamba, atrazin 등과 함께 처리하였을 때 더 다양한 잡초를 방제하며 옥수수에 대한 약해도 없는 것을 확인하였다[4, 5].

국외 식품 규제 기관 중 미국(United States Environmental Protection Agency; US EPA)과 캐나다(Pest Management Regulatory Agency; PMRA)는 각각 0.01(옥수수 등 8품목) 및 0.01~0.02(옥수수, 우유 등 23품목) mg/kg의 잔류허용기준을 설정하여 잔류 농약을 관리하고 있다. 농산물 중 잔류물의 정의는 두 국외 기관 모두 모화합물로 정의하고 있고 캐나다의 경우 축산물 중 잔류물의 정의를 모화합물과 대사산물인 MT-2153의 합으로 정하여 관리하고 있다. 농작물 중 잔류물의 정의를 결정하는 데 total radioactive residues

(TRR) 값이 10% 이상이면서 0.01 mg/kg 이상이 잔류할 때 또는 TRR 값이 10% 미만이지만 0.05 mg/kg 이상이 잔류할 때 주요 대사산물로 결정되어 지는데 유럽 식품 규제 기관(European Food Safety Authority; EFSA)의 tolpyralate 잔류 보고서에 따르면 옥수수 중 검출된 MT-2153의 TRR 값이 최대 7.6%이며 0.009 mg/kg이 잔류되는 것으로 나타났다. 따라서 국내에서는 tolpyralate의 농산물 중 잔류물의 정의를 모화합물로 예정하고 있으며, 어떠한 농산물에도 잔류허용기준(maximum residue limits; MRL)이 설정되어 있지 않고 옥수수에 대한 기준 신설이 요청된 상태이다. 현재 국내에 tolpyralate를 유효성분으로 하여 등록된 농약은 한 품목이며 옥수수의 잡초생육초기(3~5엽기)에 경엽처리로 사용되고 있다. 따라서 현재 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 tolpyralate가 옥수수에서 검출될 경우 허용물질목록관리제도(positive list system; PLS)에 따라 0.01 mg/kg 이하가 검출되어야 한다. 그러므로 농산물 유통 시 잔류허용기준의 부적합률을 낮추기 위하여 다양한 농산물에 잔류허용기준을 설정하고, 설정과 동시에 잔류하는 tolpyralate를 분석할 수 있는 신속, 간편한 공정시험법이 마련되어야 한다.

Tolpyralate의 분석법에 관한 국외 연구로는 EFSA에서 옥수수의 낱알과 벚짚, 상추, 포도, 유채씨 중 tolpyralate와 대사산물인 MT-2153을 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 연구 보고가 있다. 전처리 과정에서 유채씨는 오일 함량이 많아 아세톤과 물을 80:20(v/v)으로 혼합하여 추출하였고 그 외 작물은 아세토니트릴과 물을 80:20(v/v)으로 혼합하여 추출하였으며, 정제는 HLB (hydrophilic-lipophilic balance) 카트리지를 이용하였다. 대상 작물의 전체 회수율은 71~105%였으며 시험법 정량한계도 0.01 mg/kg으로 가이드라인에 만족할만한 수준이었지만, 국내 재배 작물과 수입 농산물에 대한 tolpyralate의 잔류량 검사에 따라 분석대상 품목을 확대 적용한 시험법이 필요할 뿐만 아니라 단시간에 여러 시료를 검사할 수 있는 간단한 과정의 시험법 개발이 필요하다. QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)법은 2003년 Anastassiades에 의해 개발되어 농산물 및 축산물 등 여러 가지 시료를 대상으로 전 세계적으로 연구되고 있는 분석법으로 실험절차가 간단하고 대상 성분의 특성에 따라 다양하게 변경하여 적용할 수 있는 폭이 넓다[6-8]. 또한 다성분 분석 뿐만 아니라 식물 또는 동물의 체내에서 생성되는 대사산물을 동시 분석하는 데 응용이 가능한 장점이 있다[9, 10]. 따라서 본 연구에서는 tolpyralate의 잔류량 검사에 필요한 공정 시험법으로 QuEChERS법을 이용하여 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류) 및 고추(채소류) 등 5종 모두에 적용할 수 있도록 개발하고 국내의 잔류허용기준 설정을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Tolpyralate 표준품(99.9%)은 원제회사인 ISK바이오사이언스

코리아(주)에서 제공받아 사용하였으며, 아세토니트릴(acetonitrile)은 HPLC grade를 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 전처리 중 사용된 QuEChERS 추출 시약 키트(Part No. 186006813)는 Waters (Leinster, Ireland)에서 구입하였으며, 정제에 사용된 d-SPE (dispersive-solid phase extraction) 시약 키트(Part No. 5982-0028)는 Agilent Technologies (California, USA)로부터 구입하였다. 기기분석 시 이동상에 첨가하는 폼산(formic acid)은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였고, 실린지 필터(PTFE, 0.2 μm \times 13 mm)는 Teknokroma (Barcelona, Spain)로부터 구입하였다. 시험법 대상 작물인 현미, 감자, 대두, 감귤 및 고추는 각각 식품의약품안전처에서 정한 곡류, 서류, 두류, 과일류 및 채소류의 대표농산물에 해당하며 모두 무농약 농산물을 구입하였다. 현미와 대두는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm 를 통과하도록 분쇄하고 감자와 감귤, 고추는 약 1 kg을 분쇄하여 균질화한 후 폴리에틸렌 지퍼백에 담아 -20°C 이하에서 냉동보관 하였다.

표준검량선 용액 조제

Tolpyralate 표준물질 원제 20.02 mg을 20 mL 부피플라스크에 넣고 아세토니트릴로 용해하여 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표준원액을 조제하였으며, 무처리 시료를 전처리 방법과 동일하게 조제하여 정량을 위한 표준검량선의 희석용액으로 사용하였다. 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표준원액을 아세토니트릴로 희석하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 중간표준용액을 조제한 뒤 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.25 및 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 단계적으로 희석하고, 각각의 표준용액 100 μL 를 다시 무처리 용액 900 μL 로 희석하여 90% 이상의 matrix가 포함된 표준검량선(matrix-matched calibration curve) 용액을 조제하였다. 표준용액은 실험시 즉시 만들어 사용하였으며, 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C 에 보관하여 실험에 사용하였다.

기기분석 조건

Tolpyralate는 Waters사의 MS/MS (Xevo TQ-S, Milford, MA, USA)를 장착한 LC (Acquity UPLC, Milford, MA, USA)로 분석하였고, 내경이 2 mm이며 길이가 50 mm인 C_{18} column을 이용하였다. 이동상 A와 B에 각각 0.1% 폼산이 함유된 아세토니트릴과 물을 사용하여 최적화된 gradient 방식으로 대상 성분을 분리하였다. 기온기 용리 방식은 이동상 A(아세토니트릴)를 초기 조건인 20%에서 2분간 유지한 후 2.5분까지 80%로 올리고 5분까지 유지하며, 다시 5.5분까지 20%로 내린 후 7분까지 초기 조건을 유지하였다. 농산물 시료 중 tolpyralate의 정량 및 정성적 확인을 위하여 MS/MS의 ESI (electrospray ionization) positive mode로 정량이온 및 정성이온을 선택한 후 최적의 cone voltage 및 collision energy 값을 선정하였다. MS/MS의 capillary voltage는 1 kV이며 source 및 desolvation 온도는 각각 150°C 와 500°C 이었다. 또한 desolvation gas 및 cone gas 유량은 각각 550 L/hr과 150 L/hr 이었다.

전처리 시험법

분쇄한 농산물 시료 5 g을 칭량하여 50 mL polypropylene 원심분리관에 넣고 아세토니트릴 20 mL를 가한 뒤 400 rpm으로 10분간 진탕하였다. 이 때, 곡류 및 두류의 경우 추출용매를 넣기 전에 증류수 10 mL를 첨가한 뒤 30분간 습윤화하여 추출 효율을 높였다. 원심분리관에 무수황산마그네슘(anhydrous magnesium sulfate) 4 g과 염화나트륨(sodium chloride) 1 g, 구연산이나트륨-1.5수화물(disodium hydrogencitrate sesquihydrate) 0.5 g, 구연산삼나트륨-2수화물(trisodium citrate dihydrate) 1 g이 포함되어 있는 QuEChERS 추출 시약 키트를 넣고 1분간 손으로 강하게 흔든 뒤 4,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1 mL를 무수황산마그네슘 150 mg과 PSA (primary secondary amine) 50 mg, C_{18} (octadecyl bonded silica) 50 mg, GCB (graphitized carbon black) 7.5 mg의 정제 키트가 포함된 2 mL 원심분리관에 넣어 30초간 와류교반하고 이를 4,000 g에서 10분간 원심분리 하였다. 정제된 상등액을 PTFE 실린지 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

시험법 유효성 검증

확립된 시험법의 유효성을 검증하기 위하여 선택성, 직선성, 기기상 검출한계(limit of detection; LOD)와 정량한계(limit of quantitation; LOQ), 시험법 정량한계(method limit of quantitation; MLOQ), 정확성 및 반복성, 재현성을 검증하였다. 선택성은 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 회수율 시료를 확립된 전처리 시험법으로 조제한 후 각각의 크로마토그램을 서로 비교하고, 직선성은 무처리 용액으로 희석한 표준검량선 용액을 5 μL 씩 주입하고 얻어진 피크의 면적값으로 검량선을 작성하여 결정계수(correlation coefficient, R^2)를 구하였다. 또한 기기상 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 검출된 피크의 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio, S/N)가 각각 3 이상과 10 이상을 나타내는 성분의 농도를 의미하며, 시험법 정량한계는 기기상 정량한계와 시료량 및 추출용매량을 이용하여 산출하였다. 시험법의 정확성 및 반복성은 5종 농산물 시료 5 g에 시험법 정량한계, 정량한계 10배 및 50배 농도에 해당되는 수준인 0.25, 2.5 및 12.5 ppm의 표준용액 200 μL 를 처리하여 분석한 후 5반복 실험의 회수율(recovery) 평균과 상대표준편차(relative standard deviation; RSD)를 구하여 평가하였다. 재현성은 외부기관과 실험실간 검증(inter-laboratory validation)을 실시하고 변이계수(coefficient of variance; CV)를 구하여 확인하였다.

결과 및 고찰

기기분석조건 확립

QuEChERS 분석법은 잔류농약 분석에 흔히 사용되는 액액 추출법(liquid-liquid extraction; LLE)과 고상추출법(solid phase extraction; SPE)에 비하여 단축된 분석과정으로 과도한 간섭물질이 남아있을 수 있는 단점이 있다. 따라서 선택

성이 높고 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보 할 수 있는 고 감도의 검출기가 장착된 LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였다. Tolpyralate의 분리를 위해 컬럼은 입자크기가 3.0 μm 인 C_{18} 역상컬럼을 선택하였고, 0.1% 포름산 함유 아세트니트릴과 0.1% 포름산 함유 물을 이동상으로 하여 gradient 방식으로 분석하였다.

전자분무이온화법(electrospray ionization; ESI)의 positive ion mode에서 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준의 tolpyralate 표준용액을 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 일정한 속도로 질량분석기에 직접 주입하고 mass spectrum을 통해 생성이온(product ion)과 선구이온(precursor ion)을 확인한 후, 분석의 선택성과 검출강도를 극대화하기 위하여 최적의 cone voltage 및 collision energy를 선정하였다. 우선 생성이온을 확인하기 위하여 100~600 m/z 의 범위로 mass scan을 수행하였고 exact mass가 484.15인 tolpyralate에 대하여 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 형태인 485.25 m/z 값을 확인하였다. 이 때 cone voltage를 5~50 V 범위에서 5 V 간격으로 달리하여 찾은 최적의 voltage는 15 V였으며, 다시 10~20 V 범위에서 1 V 간격으로 생성이온의 스펙트럼을 확인한 결과 18 V에서 최대의 스펙트럼 강도가 나타났다. 다음으로 선구이온을 확인하기 위하여 18 V의 cone voltage 조건에서 100~600 m/z 의 범위로 daughter scan을 수행하였고 최대의 감도를 보이는 선구 이온 139.06 m/z 를 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 선구 이온 325.06과 383.11 m/z 를 정성이온(qualification ion)으로 선정하였다. 각각의 선구이온들은 5~50 eV 범위에서 5 eV 간격으로 감도를 측정하고 큰 감도를 나타낸 collision energy를 기준으로 다시 1 eV 간격으로 조절하여 최적의 MRM (multiple reaction monitoring) 조건을 확립하였다(Table 1).

QuEChERS 추출 조건 최적화

Tolpyralate는 Log P_{ow} 값이 1.9로 중간극성을 띄며 pKa 값이 1.33으로 약 pH 3 이상에서는 완전히 비이온화 상태로 존재하는 화합물이다. 따라서 추출 용액의 pH를 조절하여 대상 성분이 비이온화 상태가 되면 유기용매의 추출 효율을 높일 수 있다. 아세트니트릴은 수용성 유기용매로 검체 내부로의 침투 효율이 높고 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 및 아세톤(acetone)과 같은 비극성 유기용매보다 왁스, 지방과 같은 친유성 물질을 더 적게 추출한다. 아세트니트릴을 추

출 용매로 사용하는 QuEChERS 분석법은 시료에 고체상의 분말을 직접 첨가하여 농약성분을 추출하는 쉽고 간단한 실험 방법이다. 대표적으로 QuEChERS original법 중 추출 과정에 첨가되는 분말은 무수황산마그네슘과 염화나트륨으로 각각 시료의 수분을 제거하고 유기용매 층과 물 층을 분리하는 역할을 한다[6]. 또한 기존의 original법을 변형한 The Association of Official Agricultural Chemists (AOAC)에서 개발한 AOAC Official 2007.01법과 British Standards Institution (BSI)에서 개발한 EN 15662법은 pH에 민감한 대상성분을 추출하기 위하여 추출 과정에 acetate 또는 citrate buffer를 사용한다. 본 연구에서는 buffer를 쓰지 않는 original법과 두 가지 buffer를 이용한 QuEChERS법을 비교 실험하였다. Original법은 아세트니트릴로 추출 후 무수황산마그네슘 6 g과 염화나트륨 1.5 g을 넣었으며, AOAC Official 2007.01법은 1% 아세트산이 함유된 아세트니트릴로 추출 후 무수황산마그네슘 6 g과 아세트산나트륨 1.5 g을 넣어 대상 성분을 분배하였다. 각 추출법에 따른 d-SPE 정제 과정에는 무수황산마그네슘 150 mg과 PSA 50 mg, C_{18} 50 mg, GCB 7.5 mg을 사용하는 것을 공통 조건으로 하여 회수율을 구하였다. 이 때, d-SPE 과정에서 사용하는 무수황산마그네슘은 추출 후 시료에 잔존하는 물을 제거하며 극성의 공추출물을 침전시키는 역할을 하고 PSA는 지방산과 같은 (-) 전하를 띠는 유기산 등을 제거한다. 또한 C_{18} 은 비극성 간섭 물질을 제거하며 GCB는 평면 구조를 가진 분자에 친화도가 높아 스테롤이나 클로로필 같은 색소를 효과적으로 제거한다. 하지만 GCB는 thiabendazole, cyprodinil 등과 같은 평면 구조를 가진 농약 성분을 흡착시켜 회수율이 저하되는 결과를 초래하기도 한다[6, 11]. 5종의 농산물 시료에 정량한계 10배의 농도에 해당되는 2.5 ppm 표준용액 200 μL 를 처리하여 세 가지 QuEChERS법으로 추출 및 정제 실험을 한 결과, 모든 시험구에서의 회수율이 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인에 적합하였으며 차이가 크게 나타나지 않았다(Table 2). 하지만 현미 시료의 경우 회수율의 표준편차가 크게 나타났는데 이와 같은 결과로 matrix의 종류에 따라 회수율이 영향을 받고 있으며 AOAC Official 2007.01법으로 현미를 추출할 경우 그 영향이 더 클 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 QuEChERS EN

Table 1. Mass transition parameters of tolpyralate in ESI positive mode using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Compounds	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE ^{a)} (eV)	RT ^{b)} (min)
Tolpyralate	484.15	485.25	139.06 ^{c)}	18	31	3.5
			325.06		20	
			383.11		14	

a) Collision energy

b) Retention time

c) Quantification ion

Table 2. The recovery results of tolpyralate according to three QuEChERS method in five agricultural products

Sample	Recovery \pm RSD ^{a)}								
	Original			AOAC Official 2007.01			EN 15662		
Hulled rice	95.4	\pm	3.5	94.2	\pm	17.4	93.0	\pm	6.4
Potato	91.1	\pm	3.4	95.1	\pm	5.0	93.3	\pm	6.9
Soybean	103.4	\pm	4.8	98.1	\pm	4.2	101.7	\pm	2.7
Mandarin	90.5	\pm	4.2	94.8	\pm	7.3	92.2	\pm	3.6
Green pepper	96.2	\pm	4.4	92.6	\pm	0.7	89.1	\pm	1.6

^{a)} Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

15662법을 이용한 추출과 MgSO₄ 및 PSA, C₁₈, GCB를 이용한 d-SPE 정제 방법을 적용하여 tolpyralate 시험법을 최적화 하였다.

시험법 유효성 검증

본 연구에서 무처리 농산물 시료의 LC-MS/MS 크로마토그램을 확인한 결과 tolpyralate의 머무름 시간(retention

time; RT)인 3.5분에 어떠한 간섭물질도 검출되지 않아 확립된 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1). MS/MS 분석 시 나타나는 matrix-induced ion suppression 또는 enhancement 현상에 대비하기 위해 회수율 시료를 정량할 때에는 matrix-matched calibration curve로 하였으며, 0.0025~0.25 mg/L의 농도로 작성한 5종 농산물 검량선의 결정계수는 0.9980 이상으로 높은 직선성을 나

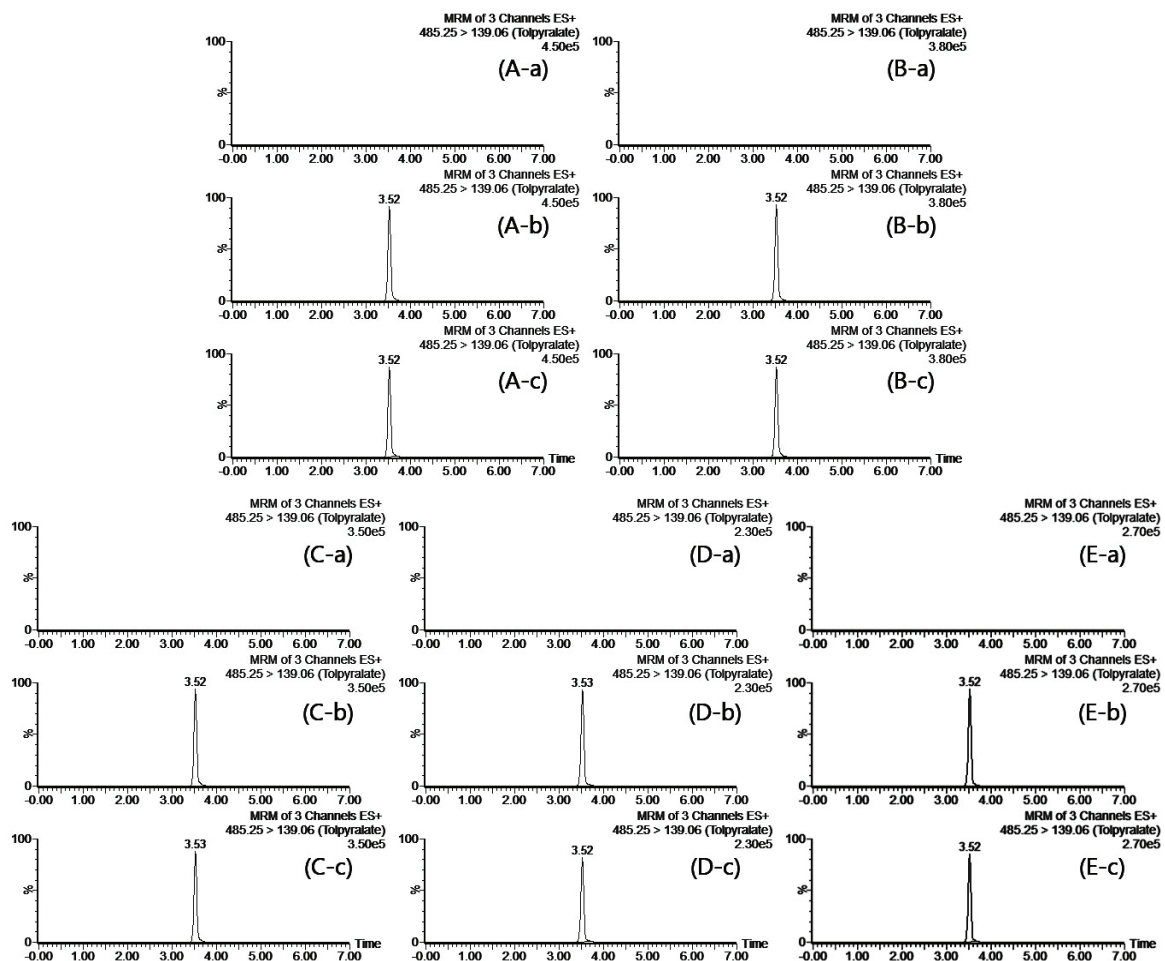


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms of tolpyralate in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper at (a) blank sample, (b) matrix-matched standard at 0.025 mg/L and (c) recovery sample at 10times of LOQ.

Table 3. Inter-laboratory validation results of analytical method for the detection of tolpyralate residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery \pm RSD ^{a)} (%)						Ave. ^{d)} (%)	CV ^{e)} (%)
		Trial 1 ^{b)}			Trial 2 ^{c)}				
Hulled rice	0.01	112.4	\pm	1.4	99.2	\pm	2.9	107.5	6.6
	0.1	97.6	\pm	1.5	92.7	\pm	6.0	95.8	4.3
	0.5	91.6	\pm	0.9	87.4	\pm	4.6	90.0	3.5
Potato	0.01	90.3	\pm	5.0	84.0	\pm	2.0	87.9	5.5
	0.1	91.1	\pm	4.3	89.8	\pm	2.2	90.6	3.5
	0.5	91.2	\pm	3.8	96.4	\pm	6.4	93.2	5.3
Soybean	0.01	95.7	\pm	4.7	112.1	\pm	3.6	101.9	9.2
	0.1	91.5	\pm	6.2	91.3	\pm	5.7	91.4	5.6
	0.5	100.7	\pm	2.3	80.8	\pm	8.7	93.2	11.9
Mandarin	0.01	93.9	\pm	4.7	76.1	\pm	3.5	87.2	11.3
	0.1	85.2	\pm	3.9	87.8	\pm	4.6	86.1	4.1
	0.5	88.2	\pm	4.7	88.9	\pm	1.6	88.4	3.6
Green pepper	0.01	101.5	\pm	1.9	90.9	\pm	7.9	97.6	7.0
	0.1	90.6	\pm	2.4	113.7	\pm	4.0	99.2	12.4
	0.5	90.6	\pm	2.0	112.2	\pm	2.1	98.7	11.5

a) Mean values of 5 (Trial 1) or 3 (Trial 2) times repetitions with relative standard deviation

b) National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

c) Seoul Regional Food and Drug Administration

d) Recovery average of inter-laboratory

e) Coefficient of variation of inter-laboratory

타내었다. 기기상 검출한계와 정량한계는 각각 0.0008 mg/L 과 0.0025 mg/L으로 나타났고, 시험법 정량한계는 기기상 정량한계에 추출용매량을 곱하고 시료량으로 나누어 0.01 mg/kg으로 산출되었다. 이러한 결과는 식품의약품안전처에서 도입한 PLS 제도의 불검출 기준인 0.01 mg/kg에 부합하였다. 각각의 농산물 무처리 시료에 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 수준이 되도록 tolpyralate를 처리하여 5반복 회수율 실험을 한 결과 평균 회수율은 85.2~112.4%이었고, 상대표준편차는 6.2% 이하로 조사되었다. 위의 결과에 따라 본 시험법의 정확성 및 반복성은 Codex 가이드라인 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인에 따른 시험법 검증 기준에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 3).

실험실간 시험법 검증

시험법의 재현성을 검증하기 위해 외부 식품위생검사기관인 서울지방식품의약품안전청에 시험법을 제공하여 동일한 방법으로 분석을 수행하였다. 검증기관이 수행한 3반복 회수율 시험의 회수율 및 표준편차를 구하여 가이드라인에 따른 재현성을 평가하였으며, 검증 결과 검증기관의 각 농도별 tolpyralate의 평균 회수율은 76.1~113.7%이었고 상대표준편차는 8.7% 이하로 조사되었다. 또한 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 86.1~107.5%이며 변이계수는 처리농도 0.01 mg/kg에서 11.3% 이하, 0.1 mg/kg에서 12.4% 이하, 0.5 mg/kg에서 11.9% 이하로 모든 처리군에서 Codex 가이드라인 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인이 제시한 처리농도 별 기준보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Table 3).

드라인 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인이 제시한 처리농도 별 기준보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Table 3).

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledment

This research was financially supported by the Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea, and we are grateful this support.

References

- Xu K, Racine F, He Z, Juneau P (2019) Impacts of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor (mesotrione) on photosynthetic processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution*, 244, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.121>.
- Kim SY, Oh SH, Lee JY, Yeo US, Lee JH, Cho JH, Song YC, Oh MK, Han SI et al. (2012) Differential sensitivity of rice cultivars to HPPD-inhibiting herbicides and their influences on rice yield. *Korean Journal of*

- Crop Science, 57(2), 160-165.
<https://doi.org/10.7740/kjcs.2012.57.2.160>.
3. Kim SS, Park JE, Kim YJ, Lee YH, Lee IY, Lee J, Moon BC, Ihm YB (2016) Characteristics of Sensitive HIS1 Genes to the 4-HPPD Inhibiting Rice Herbicides Isolated from Several Rice Cultivars. *Weed and Turfgrass Science*, 5(4), 187-190.
<https://doi.org/10.5660/WTS.2016.5.4.187>.
 4. Lee IY, Kim JW, Kim SS, Yoo HJ, Hwang IS, Lee KH, Cho NG, Lee DG, Hwang KH et al. (2017) Current status and perspectives of weed science in Asia-Pacific area. *Weed and Turfgrass Science*, 6(4), 292-305.
<https://doi.org/10.5660/WTS.2017.6.4.292>.
 5. Osipitan OA, Scott JE, Knezevic SZ (2018) Tolpyralate applied alone and with atrazine for weed control in corn. *The Journal of Agricultural Science*, 10(10), 32-39.
<https://doi.org/10.5539/jas.v10n10p32>.
 6. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
 7. Lopes RP, de Freitas Passos ÉE, de Alkimim Filho JF, Vargas EA, Augusti D.V, Augusti R (2012) Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control*, 28(1), 192-198.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.026>.
 8. Lopes RP, Reyes RC, Conzalez RR, Frenich AG, Vidal JLM (2012) Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 89, 201-208.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.082>.
 9. Lehotay SJ, Kok AD, Hiemstra M, Bodegraven PV (2005) Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 88(2), 595-614.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.595>.
 10. Seo EK, Kim TK, Hong SM, Kwon HY, Kwon JH, Son KA, Kim JE, Kim DH (2013) Analysis of systemic pesticide imidacloprid and its metabolites in pepper using QuEChERS and LC-MS/MS. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 17(4), 264-270.
<https://doi.org/10.7585/kjps.2013.17.4.264>.
 11. Wilkowska A, Biziuk M (2011) Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803-812.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094>.