

Research Article



CrossMark

Open Access

## 식품 중 제초제 클로피랄리드(Clopyralid)의 잔류 분석법

김지영<sup>1</sup>, 최윤주<sup>2</sup>, 김종수<sup>1</sup>, 김도훈<sup>1</sup>, 도정아<sup>3</sup>, 정용현<sup>3</sup>, 이강봉<sup>3</sup>, 김효진<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전처 서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과, <sup>2</sup>식품의약품안전처 기준기획관실 식품기준과,  
<sup>3</sup>식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

### Study for Residue Analysis of Herbicide, Clopyralid in Foods

Ji-young Kim<sup>1</sup>, Yoon Ju Choi<sup>2</sup>, Jong Su Kim<sup>1</sup>, Do Hoon Kim<sup>1</sup>, Jung Ah Do<sup>3</sup>, Yong Hyun Jung<sup>3</sup>, Kang Bong Lee<sup>3</sup> and Hyo Chin Kim<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Division of Import Food Analysis, Ministry of Food and Drug Safety-Seoul Region, Ministry of Food and Drug Safety, Seoul 07978, Korea, <sup>2</sup>Food Standard Division, Food Standard Planning, Ministry of Food and Drug, Cheongju 28159, Korea, <sup>3</sup>Pesticide 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)

Received: 8 November 2018/ Revised: 14 November 2018/ Accepted: 10 December 2018

Copyright © 2018 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

Hyo Chin Kim

<http://orcid.org/0000-003-4696-7412>

### Abstract

**BACKGROUND:** Pesticide residue analysis is an essential activity in order to establish the food safety of agricultural products. Analytical approaches to the food safety are required to meet internationally the guideline of Codex (Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40). In this study, we developed a liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) method to determine the herbicide clopyralid in food matrixes.

**METHODS AND RESULTS:** Clopyralid was extracted with aqueous acetonitrile containing formic acid and the extracts were mixed in a citrate buffer consisted of magnesium sulfate anhydrous, NaCl, sodium citrate dihydrate and disodium hydrogencitrate sesquihydrate followed by centrifugation. The supernatants were filtered through a nylon membrane filter and used for the analysis of clopyralid. The method was validated by accuracy and precision experiments on the samples fortified at 3 different levels of clopyralid. LC-MS/MS in positive mode was employed to quantitatively determine clopyralid in the food samples. Matrix-matched calibration curves were

inarranged from 0.001 to 0.25 mg/kg with  $r^2 > 0.994$ . The limits of detection and quantification were determined to be 0.001 and 0.01 mg/kg, respectively. Therecovery values of clopyralid for tified at 0.01 mg/kg in the control samples ranged from approximately 82 to 106% with relative standard deviations below 2 0%.

**CONCLUSION:** The method developed in this study meets successfully the Codex guideline for pesticide residue analysis in food samples. This, the method could be applicable to determine pesticides in foods produced domestically and internationally.

**Key words:** Clopyralid, LC-MS/MS, Residue

### 서 론

Clopyralid (3,6-dichloropicolinic acid) (Fig. 1)는 pyridine 계통의 제초제로 침투이행성 기작으로 생장 호르몬을 교란시켜 잎의 기형, 줄기의 꼬임 등 이상 생장 증상 및 나아가 괴사 효과를 나타내고 있다(Cremlyn 1991, Schiütz, 1996). 곡류, 옥수수, 사탕무 등 및 잔디에 발생하는 일년생 및 다년생 광엽잡초를 방제하는데 사용되고 있다.

Clopyralid는 끓는점이 분해점보다 낮고, 분자량은 192 ( $C_6H_5Cl_2NO_2$ )인 흰색의 분말형태이다. 더불어, Clopyralid는 n-octanol/water 분배계수(Log  $P_{ow}$ )와 물에 대한 용해도가 pH에 따라 상이하다(Table 2). 다양한 유기용매(Ethyl acetate:

\*Corresponding author: Hyo Chin Kim  
Phone: +82-2-2640-1494; Fax: +82-2-2640-1364;  
E-mail: hckim77@korea.kr

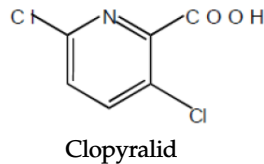


Fig. 1. Molecular structure of Clopyralid.

102 g/L, Acetone: >250 g/L, 1,2-dichlorethane: 20.7 g/L)에 잘 용해되며, 산성을 가지는 특징이 있다(Pohansih, 2015).

2018년 현재 농산물 중 Clopyralid의 국외 잔류허용기준 (MRL, maximum residue limit)은 미국, 유럽, 일본 및 캐나다는 밀을 포함한 농산물과 사료에 등록 및 잔류허용기준이 0.015 ~ 500.0 mg/kg으로 설정되어 관리되고 있다. 작물 잔류 시험 결과, 식물체내의 주요 유효성분은 Clopyralid 뿐 대사산물은 발견되지 않아 미국을 포함한 국외에서는 모화물만으로 잔류물의 정의를 한정하였다(Table 1). 국내의 경우, 미등록 농약이나, 수입식품의 안전성 확보를 위한 수입식품잔류허용기준(Import tolerance) 제도 운영에 따라 밀에 3.0 mg/kg 기준이 신설되어 관리되고 있다(Ministry of Food and Drug Safety, Notice No. 2018-74, 2018.10.12.). 2019년 전면적으로 시행되는 식품의약품안전처 Positive List System 시행(Ministry of Food and Drug Safety, Notice No. 2018-8, 2018. 2.22)을 준비함에 따라 밀에 대한 Clopyralid 잔류허용기준 설정 신청에 따라 농산물 수입에 따른 적부 판정 등에 필요한 시험법 개발이 시급하였다.

따라서, 본 연구에서는 사용 등록 작물 외에 등록되지 않은 농산물의 오남용 예방과 향후 농산물 확대 가능성을 고려한 공정시험법을 개발하고자 하였다. 이에 따라 본 시험법은 밀 외 향후 수입되는 식품에 사용이 확대될 가능성을 고려하여 모든 식품에서 분석이 가능하도록 신속하고 정확한 분석법을 확립하고, 국내 잔류농약 검사 시 적용 가능한 시험법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기구

Clopyralid (99.9%) 표준품은 Dow AgroScience (Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다. Acetonitrile, Acetone, n-Hexane 등 유기용매 및 시약은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하고, NaCl은 Wako (Osaka, Japan), 무수황산나트륨은 Merck (Darmstadt, Germany), C<sub>18</sub> (Waters), Citrat Kit (Bekolut), Alumina

(Wako, Japan)를 각각 구입하여 사용하였다. Formic acids는 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)제품을 구입하여 사용하였다.

### 농산물 시료

본 연구는 Codex의 잔류 분석법 대상 대표농산물군 (Codex, 2003), 국내 식품소비량 및 농약 잔류 허용기준이 설정된 농산물 등을 고려하여 대표농산물 5종, 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류)를 선정하여 실험하였다(Lee et al., 2010). 지역 마트에서 무농약 농산물을 구입하여 식품공전 검체 처리방법(Ministry of Food and Drug Safety, 2012)에 따라 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

### 표준원액 및 표준용액

Clopyralid 표준품 20 mg을 20 mL의 아세토니트릴에 용해하여 1,000 µg/mL의 표준원액을 조제하였다. 표준품의 경우, Clopyralid의 pKa를 고려하여, pH가 낮은 조건을 만들어 비이온상태로 존재하게 해주기 위하여 1% 포름산 함유 아세토니트릴로 희석하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 농산물 검체의 무처리 추출물 900 µL에 10 µg/mL 표준용액 100 µL를 넣어 1.0 µg/mL 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.25 µg/mL의 농도가 되도록 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 추출과 분배

균질화한 검체 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고 5% 포름산을 포함한 아세토니트릴 용액 20 mL를 가한 뒤 10분간 진탕하였다. 무수황산마그네슘 4.0 g, 염화나트륨 1g, 구연산나트륨이수화물 1.0 g, disodium hydrogencitrate sesquihydrate 0.5 g을 넣고 1분간 흔들어 혼합한 후, 4°C, 4,000 G에서 10분간 원심 분리하였다. 10ml의 상등액과 C<sub>18</sub> 350 mg, Alumina 0.1 g을 15ml falcon tube에 넣어 1분간 진탕 후 4°C, 4,000 G에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 멤브레인 필터(nylon, 0.2 µm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

### 기기분석

Clopyralid의 분해점이 164°C이나 끓는점이 이보다 낮은

Table 1. Registration status and MRLs established by overseas countries of Clopyralid

	Korea	EU	Japan	USA	Canada
Registration	pending	O	O	O	O
Commodity	wheat	almond etc.	wheat etc.	apple etc.	wheat etc.
MRLs (mg/kg)	-	0.05~5.0	0.08~10	0.05~500.0	0.08~10
Residue definition	Clopyralid	Clopyralid	Clopyralid	Clopyralid	Clopyralid

Table 2. Physicochemical characteristics of Clopyralid

Property	Clopyralid
CAS no.	1702-17-6
Molecular formula	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
Molecular weight	average: 192.0 exact mass: 190.95
Melting point	149.6°C
Degradation point	164°C (끓기 전에 분해됨)
Density	1.763 g/cm <sup>3</sup> (20.7°C)
Log Pow	1.81(pH 5), 2.63(pH 7), 2.55(pH 9) (at 20°C)
pKa	pH 3.1
Vapor pressure	1.36×10 <sup>-3</sup> Pa(25°C)
Solubility (in water)	118 g/L(pH 5), 143 g/L(pH 7), 157 g/L(pH 9) (at 20°C)
Solubility (in organic solvent)	Hexane: 0.6% Acetonitrile: 12.1% Methanol: 10.4% Ethyl acetate: 102 g/L Acetone: >250 g/L 1,2-dichlorethane: 20.7 g/L (at 20°C)
Hydrolysis & photolysis	Hydrolysis: - Photolysis: DT <sub>50</sub> =271 days

것으로 확인되어 GC (Gas Chromatography) 분석이 어려웠고, 높은 선택성과 분석감도를 확보하고자 LC-MS/MS (Liquid chromatography-Tandem Mass spectrometry) 를 이용하고자 하였다. 분리용 칼럼으로는 극성 물질의 분리 효율이 높은 C<sub>18</sub> column을 선택하였고, 0.1% 포름산 함유 아세트니트릴과 0.1% 포름산 수용액을 이동상으로 사용하였으며, 이온화법으로는 electrospray inization (ESI)법의 positive-ion mode 법을 사용하였다(Table 2).

**정량한계**

분석 정량한계(LOQ, limits of quantization)는 무농약의 농산물 시료로부터 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 뒤, 분석기기의 정량한계 및 시료량 분석과정 중 농축배율을 계산하여 아래의 계산식에 의해 산출하였고(Ahn *et al.*, 2014), 동일 수준으로 Clopyralid를 처리하여 회수율을 검토하였다.

$$\text{정량한계(mg/kg)} = [\text{기기 정량한계(ng)/주입량(}\mu\text{l)}] \times [\text{시료용액(mL)/시료량(g)}]$$

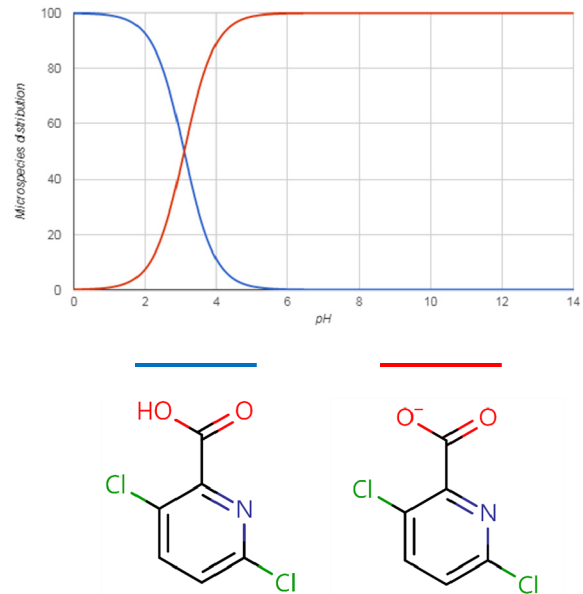


Fig. 2. pKa graph of Clopyralid.

**결과 및 고찰**

**추출 및 분배과정**

Clopyralid는 Log P<sub>ow</sub> 값이 pH 7에서 2.63으로 극성을 띄며 pH 0-3 사이에서 비이온 상태로 존재하는 화합물이다 (Fig. 2). 그러나 수분을 함유하고 있는 검체의 경우, Clopyralid가 검체 입자 표면이나 내부에 존재하고, 그 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 직접 사용 시 검체 내부로의 침투성이 낮아 충분한 추출 효율을 얻을 수 없다. 따라서 검체 내부의 침투성을 향상하기 위해 수용성 유기용매인 아세트니트릴과 아세톤 중 추출 효율이 높은 아세트니트릴을 이용하여 추출 하였다.

**정제과정의 최적화**

Clopyralid는 Log P<sub>ow</sub> 값이 1.81인 극성화합물인 비해리성 화합물이며, pKa < 4의 강한 산성을 가진 화합물이다(Sack *et al.*, 2015). 극성화합물이므로 5% 포름산 함유 아세트니트릴을 첨가하여 혼든 후 황산마그네슘 및 Citrate를 첨가하여 분석한 최종 회수율은 84.1~93.2%로 다음과 같다(Table 3).

Clopyralid의 정제과정을 최적화하고자 농산물 중 QuEChERS 방법에 사용하여 농산물 중 간섭물질을 정제하는 PSA (primary secondary amine), C<sub>18</sub> (octadecylsilane)을 흡착제로 사용하는 방법을 적용하여 정제효율을 비교하였다. 높은 효율성과 단순한 전처리, 다양한 농산물에 적용가능성 등 장점으로

Table 3. Recovery results of extract method for the determination of Clorpyralid

Compounds	Average ± RSD(%)				
	Mandarin	Red pepper	Potato	Soybean	Hulled rice
Chlorpyralid	84.1 ± 7.1	83.8 ± 16.3	93.2 ± 3.4	84.2 ± 6.1	85.9 ± 14.1

Table 4. Recovery results of official analytical method for the determination of Chlorpyralid

Compounds	Average $\pm$ RSD (%)				
	Mandarin	Red pepper	Potato	Soybean	Hulled rice
Chlorpyralid	30.6 $\pm$ 4.9	67.5 $\pm$ 2.4	39.8 $\pm$ 19.6	29.3 $\pm$ 17.3	37.9 $\pm$ 10.4

Table 5. Recovery results of modified analytical method by C<sub>18</sub> amount for the determination of Clorpyralid

Compounds	Average $\pm$ RSD (%)		
	C <sub>18</sub> +0.1 g Alumina		
	150 mg	250 mg	350 mg
Mandarin	42.8 $\pm$ 9.8	87.1 $\pm$ 7.9	97.8 $\pm$ 12.6
Redpepper	16.3 $\pm$ 16.7	71.6 $\pm$ 0.8	86.7 $\pm$ 6.8
Potato	17.9 $\pm$ 9.6	83.5 $\pm$ 6.7	96.2 $\pm$ 10.6
Soybean	57.3 $\pm$ 11.7	81.6 $\pm$ 10.9	87.0 $\pm$ 12.1
Hulled rice	34.5 $\pm$ 13.1	101.4 $\pm$ 3.2	88.5 $\pm$ 10.4

Table 6. Recovery results of modified analytical method by Alumina amount for the determination of Clorpyralid

Compounds	Average $\pm$ RSD (%)		
	No Alumina	0.1 g Alumina	0.25 g Alumina
Mandarin	72.5 $\pm$ 4.4	87.1 $\pm$ 7.9	70.6 $\pm$ 0.6
Redpepper	13.5 $\pm$ 3.8	71.6 $\pm$ 0.8	58.3 $\pm$ 3.7
Potato	85.2 $\pm$ 9.3	83.5 $\pm$ 6.7	84.8 $\pm$ 2.8
Soybean	78.4 $\pm$ 5.2	81.6 $\pm$ 10.9	77.7 $\pm$ 0.6
Hulled rice	28.7 $\pm$ 7.9	101.4 $\pm$ 3.2	68.7 $\pm$ 3.5

QuEChERS를 이용한 전처리 방법을 고려하게 되었다(Mastovska *et al.*, 2010). 클로피랄리드는 카르복실산 그룹을 강한 산성 화합물로 정제과정에서 PSA와 상호작용에 의한 흡착으로 29.3~67.5%의 낮은 회수율을 보였다. C<sub>18</sub>의 경우 회수율에 큰 영향을 미치지 않는다는 점을 확인하여 더욱 효율적인 정제를 위해 C<sub>18</sub> 양의 조건을 변경하고 적용한 정제효율을 비교한 결과는 다음과 같다(Table 5). 그 결과 C<sub>18</sub> 350 mg을 적용하여 정제 시 회수율이 81.7~105.8 %로 전체적으로 양호한 것으로 판단되어 본 조건으로 시험법을 확립하였다. Alumina neutral은 samples 중 지방과 비타민, 미네랄 분류하고 지방 중 유리스테롤(free sterol)과 에스테르화 스테롤(esteried sterol)의 흡착을 돕는 역할을 하고 있으며, pH 6~8의 Alumina neutral을 첨가하여 분석한 결과 100 mg 일 때 중성상태를 유지시킴으로서 모든 시료에서 71.6~101.4%로 가장 높은 효율을 보여주었다(Table 6).

### 기기분석 과정

Clorpyralid는 증기압이  $1.364 \times 10^3$  Pa (25°C), 분해온도 164°C로 GC 및 LC 분석이 가능할 것으로 보았으나 Clorpyralid의 끓는점은 분해온도보다 낮은 것으로 확인되었

다. 따라서 GC를 이용할 경우 휘발되기 전에 분해될 가능성이 있어 GC 분석보다는 LC 분석이 용이할 것으로 판단하였다. LC의 검출기 선택은 Clorpyralid의 낮은 정량한계를 확보하기 위해 비교적 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 분석용 컬럼은 역상인 C<sub>18</sub> 컬럼을 선택하였고, 대상성분의 이온화법으로는 electrospray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였고 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성을 선정하였다(Kwon *et al.*, 2008) 하지만, Clorpyralid 자체가 컬럼 내에서 머무름 시간이 짧아 여러 가지 컬럼을 사용하여 머무름 시간을 최적화 할 수 있는 조건을 확인 해 보았다. pH가 낮은 조건에서 비이온상태로 존재하는 Clorpyralid의 특성을 고려하여, pH를 낮출 수 있는 조건을 맞추어 낮은 pH에서도 분석이 가능한 IMTAKT사의 Cadenza CD C<sub>18</sub> (4.6  $\times$  250 mm, 3  $\mu$ m) 컬럼을 사용해 분석하였으나, 설정한 이온값을 만족하지 못하였다. 또한 농약의 특성을 고려하여 이온교환컬럼을 사용해보았다. 이때, 이온교환컬럼은 IMTAKT사의 Scherzo SM-C<sub>18</sub> (3  $\times$  150 mm, 3.0  $\mu$ m)를 사용하였다. 이온교환원리를 이용하여 컬럼 내에 농약의 머무름 시간을 길게 해줌으로서 원하는 조건을 확립하였다. 하지만 이 역시 Cadenza CD C<sub>18</sub> 컬럼과 같이 설정한 이온값을 얻지 못하여 부적합하다고 판단되었다. 이에 CAPCELL CORE C<sub>18</sub> (2.1  $\times$  150 mm, 2.7  $\mu$ m) 컬럼을 이용하여 관측질량이 190.95인 Clorpyralid의 표준용액(0.1  $\mu$ g/mL)을 일정한 속도(2  $\mu$ L/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 [M+H]<sup>+</sup> 형태인 190 mass 값을 확인하였다. 이 때 cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 Clorpyralid는 14 V에서 최대의 peak 강도가 나타남을 확인하였다. 따라서 최적화된 cone voltage상태에서 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였다. Collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다(Kwon *et al.*, 2008). 이동상에 사용된 formic acid는 이온화를 용이하게 하여 분석물질의 [M+H]<sup>+</sup> 이온생성 및 산성조건을 유지하여 Clorpyralid의 안전성 향상을 돕는 작용을 하였다(Lin *et al.*, 2002). 본 연구의 최적 기기분석 조건은 Table 7에, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 8에 나타내었다.

Table 7. Analytical conditions for the determination of Clopyralid

Condition	Content																		
Instrument	LC: Acquity UPLC (waters, Milford, MA, USA) MS/MS: Xevo TQ-S (waters, MA, USA)																		
Chromatographic separation																			
Column	Capcellcore ADME C <sub>18</sub> (2.1 × 150 mm, 2.7 μm)																		
Flow rate	0.4 mL/min																		
Injection volume	5 μL																		
Oven temp.	40 °C																		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in acetonitrile																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>3.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0.0	95	5	0.5	95	5	3.0	5	95	5.0	5	95	7.0	95	5
Time (min)	A (%)	B (%)																	
0.0	95	5																	
0.5	95	5																	
3.0	5	95																	
5.0	5	95																	
7.0	95	5																	
- Gradient																			
MS/MS condition																			
Capillary	0.5 kV																		
Source temp.	150 °C																		
Desolvation temp.	450 °C																		
Desolvation gas flow	800 L/hr																		
Cone gas flow	150 L/hr																		

Table 8. Selected-ion of LC-MS/MS for Clopyralid

Compound	Molecular weight	Exact mass	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE <sup>a</sup>
Clopyralid	192.0	190.95	192	146 <sup>b</sup>	17
				174	10

<sup>a</sup> Collision energy (eV), <sup>b</sup> Quantification ion

### 시험법의 검증 및 정량한계

Clopyralid의 선택성(selectivity)은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교함으로써 평가할 수 있었다. 무처리 시료와 회수율 시료는 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 농산물 시료 중 Clopyralid의 머무름 시간과 질량 대 전하비(m/z)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않았으므로 검체 중 Clopyralid를 분석하기 위해 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Matrix-matched 표준용액의 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 Clopyralid 표준용액을 농산물 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 그리고 0.25 μg/mL 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과, 표준품 용액과 모든 농산물(감귤, 감자, 고추, 대두, 현미) 시료 표준용액에서 결정계수( $r^2$ ) 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 4).

시험법의 정확성과 재현성 및 효율성을 평가하기 위하여 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배 수준인 0.005, 0.05와 0.25 mg/kg의 처리농도로 Clopyralid의 회수율 실험을 3반복으로 수행하였다. 각 농도에서 Clopyralid의 평균 회수율은 81.7-105.8%이며 정량한계 수준에서는 89.5-105.8%, 정량한계 10배 수준에서는 86.7-97.8%, 정량한계 50배 수준에서

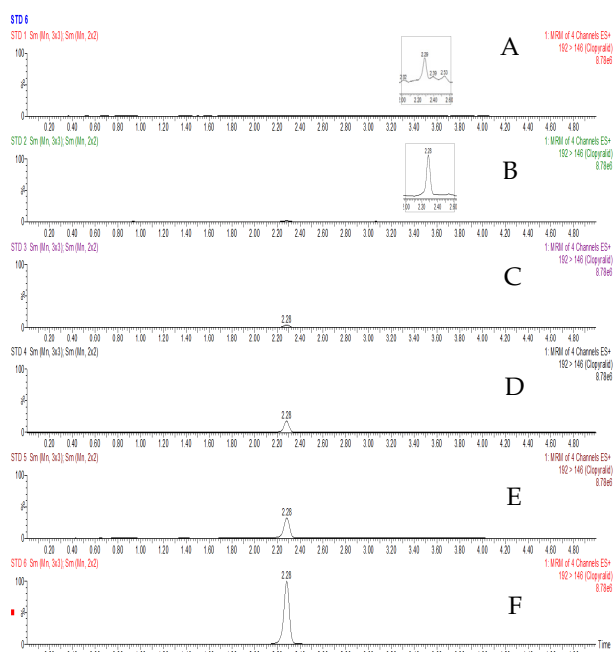


Fig. 3. LC/MSMS chromatograms of Clopyralid stock solution at (A) 0.001 mg/kg, (B) 0.005 mg/kg, (C) 0.01 mg/kg, (D) 0.05 mg/kg, (E) 0.1 mg/kg and (F) 0.25 mg/kg.



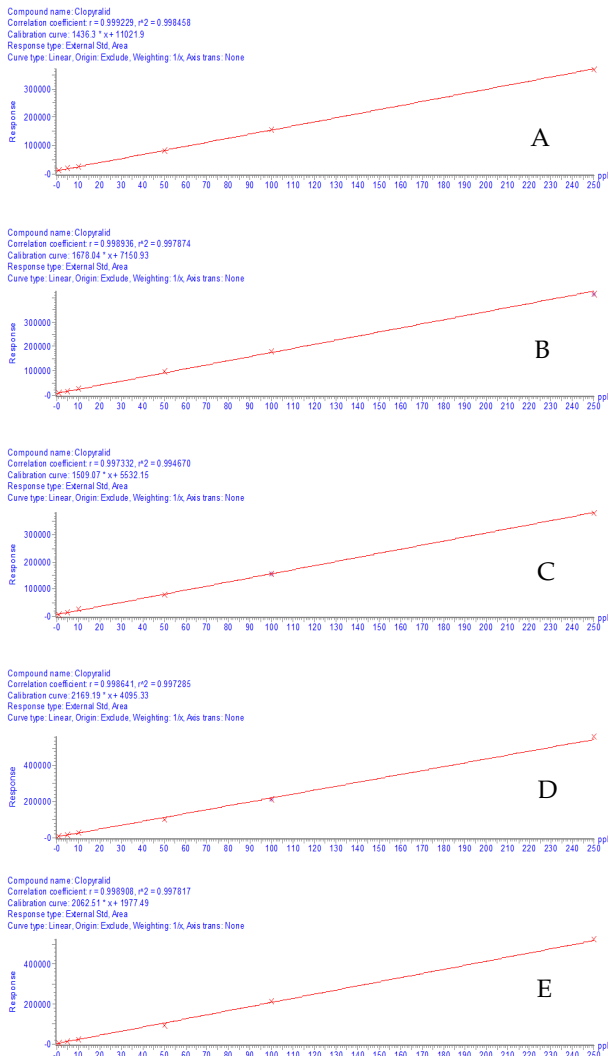


Fig. 4. Matrix-matched calibration curves on corresponding to: Clopyralid in (A) mandarin (B)potato , (C) red pepper, (D) soybean and (E) hulled rice

는 81.7-96.9%의 양호한 회수율을 보이며, 지료 종류에 상관 없이 잔류분석기준인 회수율 70-120% 범위와 상대표준편차는 모두 20% 이하로 조사되었다. Codex 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40, 2003)의 잔류농약 분석 기준에서 상대표준편차가 처리농도  $>0.001$  mg/kg  $\leq 0.01$  mg/kg의 30%,  $>0.01$  mg/kg  $\leq 0.1$  mg/kg의 20%,  $>0.1$  mg/kg  $\leq 1$  mg/kg의 15%보다 낮아 기준에 부합하므로 모든 분석물질에 대한 높은 정확성, 재현성, 효율성 확인 및 잔류농약 분석 기준에 적합을 확인할 수 있었다(Table 9). LC-MS/MS를 이용하여 농산물 5종 중 대두와 현미에 대한 Clopyralid의 회수율시험을 수행하였다(Fig. 5).

본 연구에서 확립한 시험용액 조제 및 기기분석법을 이용하여 검체 중 Clopyralid의 정량한계 및 검출한계를 구한 결과 최소검출량이 0.00125 ng (S/N=3)이었고 검출한계는 0.001 mg/kg으로 나타났다. 정량한계는 정량 가능한 최소량

Table 9. Validation results of analytical method for the determination of Clopyralid residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Ave. $\pm$ RSD (%)	LOQ (mg/kg)
		Clopyralid	
Mandarin	0.01	105.8 $\pm$ 7.4	
	0.1	97.8 $\pm$ 12.6	
	0.5	92.5 $\pm$ 12.9	
Red pepper	0.01	96.4 $\pm$ 15.0	
	0.1	86.7 $\pm$ 6.8	
	0.5	94.5 $\pm$ 9.3	
Soybean	0.01	89.5 $\pm$ 10.5	0.01
	0.1	87.0 $\pm$ 12.1	
	0.5	81.7 $\pm$ 1.0	
Potato	0.01	100.5 $\pm$ 6.0	
	0.1	96.2 $\pm$ 10.6	
	0.5	87.7 $\pm$ 3.1	
Hulled rice	0.01	102.8 $\pm$ 6.6	
	0.1	88.5 $\pm$ 10.4	
	0.5	96.9 $\pm$ 4.9	

이 0.0125 ng (S/N=10)으로 아래의 계산식에 따라 0.01 mg/kg으로 나타났다.

## 요약

본 연구는 LC-MS/MS법을 적용하여 농산물에 함유된 pyridine계통의 제초제 Clopyralid의 잔류분석법을 확립하였다. 대표적인 농산물은 글, 고추, 대두, 감자 및 현미를 선정하였고 acetonitrile에 의해 추출된 성분을 QuEChERS법을 변경하여 정제법으로 사용하고 LC-MS/MS를 사용하여 분석법을 확립하였다. Clopyralid의 정량적 분석을 위한 최적 분석 조건을 확립하였으며, 검출한계는 0.001 mg/kg, 정량 한계(LOQ)는 0.01 mg/kg이었다. 각 대표 농산물에 대한 정량한계, 정량한계의 10배, 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과 모든 처리 농도에서 81.7~105.8 %수준을 나타내었으며, 모든 수준에서 20 % 미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석기준을 만족하였다. 본 연구에서 확립된 Clopyralid분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차에서 국제적 분석기준을 만족하는 분석법으로 농산물에 따라 정량분석법으로 사용 가능할 것으로 사료된다.

## Note

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgement

This study was carried out with the support of Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea (Project No. 18161MFDS013).

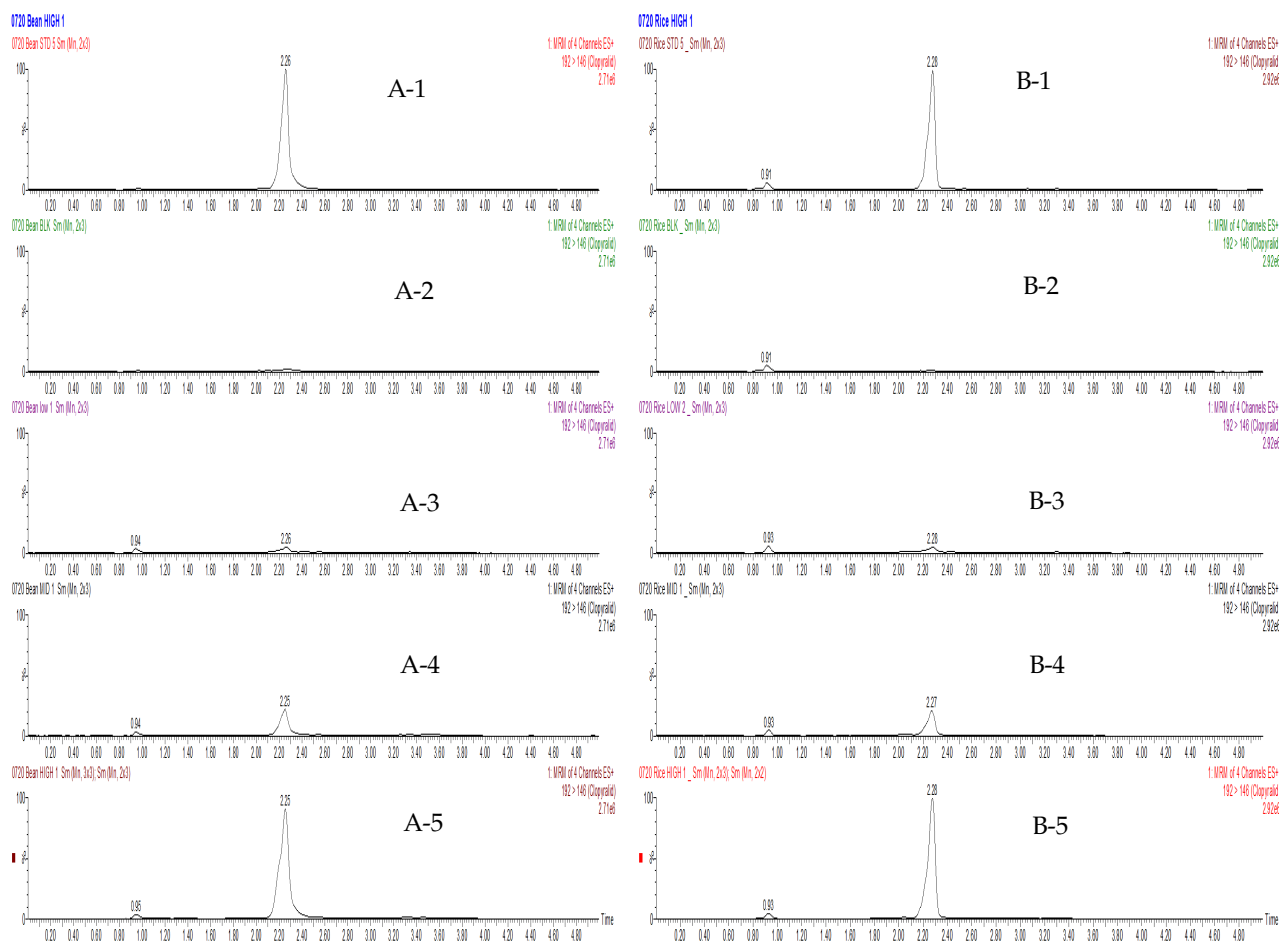


Fig. 5. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of Clopyralid on corresponding to: Soy bean (A), Hulled rice (B) Standard solution at 0.1 mg/kg (1), control (2), spiked at 0.01 mg/kg (3), spiked at 0.1 mg/kg (4), and spiked at 0.5 mg/kg (5).

## References

- Ahn, K. G., Kim, G. H., Kim, G. P., Kim, M. J., Hwang, Y. S., Hong, S. B., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2014). Determination of amisulbrom residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 18(4), 321-329.
- Cremllyn, R. J. (1991). *Agrochemicals: Preparation and mode of action*, pp. 219-227, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepitapiboon, N. (2008). Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 626(1), 10-20.
- Kwon, C. H., Chang, M. I., Im, M. H., Choi, H., Jung, D. I., Lee, S. C., Yu, J. Y., Lee, Y. D., Lee, J. O., & Hong, M. K. (2008). Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *Analytical Science and Technology*, 21(6), 518-525.
- Lee, S. J., Hwang, Y. S., Kim, Y. H., Kwon, C. H., Do, J. A., Im, M. H., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2010). Determination of Captan, Folpet, Captafol and Chlorothalonil residues in agricultural commodities using GC-ECD/MS. *Korean journal of environmental agriculture*, 29(2), 165-175.
- Lin, C. H., Lerch, R. N., Thurman, E. M., Garrett, H. E., & George, M. F. (2002). Determination of isoxaflutole (Balance) and its metabolites in water using solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet or mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5816-5824.
- Mastovska, K., Dorweiler, K. J., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S., & Szpylka, K. A. (2010). Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample

- introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5959-5972.
- Sack, C., Vonderbrink, J., Smoker, M., & Smith, R. E. (2015). Determination of acid herbicides using modified QuEChERS with fast switching ESI+/ESI-LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9657-9665.
- Schütz, S., Vedder, H., Düring, R. A., Weissbecker, B., & Hummel, H. E. (1996). Analysis of the herbicide clopyralid in cultivated soils. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), 265-271.