

Research Article



CrossMark

Open Access

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 DichlobentiazoX 시험법 개발 및 검증

구선영¹, 이한솔¹, 박지수¹, 이수정¹, 신혜선¹, 강성은¹, 정윤미²,
최하나², 윤상순^{1*}, 정용현¹, 윤혜정¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,

²식품의약품안전처 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Determination and Validation of an Analytical Method for DichlobentiazoX in Agricultural Products with LC-MS/MS

Sun Young Gu¹, Han Sol Lee¹, Ji-Su Park¹, Su Jung Lee¹, Hye-Sun Shin¹, Sung Eun Kang¹, Yun Mi Chung², Ha Na Choi², Sang Soon Yoon^{1*}, Young-Hyun Jung¹ and Hae Jung Yoon¹ (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, Chungcheongbuk-do, 28159, Korea., ²Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju, Korea)

Received: 29 March 2021/ Revised: 10 May 2021/ Accepted: 22 June 2021

Copyright © 2021 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

Sun Young Gu
<https://orcid.org/0000-0002-0070-2462>

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>

Sung Eun Kang
<https://orcid.org/0000-0002-2660-1301>

Yun Mi Chung
<https://orcid.org/0000-0001-5118-5197>

Ha Na Choi
<https://orcid.org/0000-0001-8556-1357>

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

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

Hae Jung Yoon
<https://orcid.org/0000-0003-4973-1659>

Abstract

BACKGROUND: DichlobentiazoX is a newly registered pesticide in Korea as a triazole fungicide and requires establishment of an official analysis method for the safety management. Therefore, the aim of this study was to determine the residual analysis method of dichlobentiazoX for the five representative agricultural products.

METHODS AND RESULTS: Three QuEChERS methods were applied to establish the extraction method, and the EN method was finally selected through the recovery test. In addition, various adsorbent agents were applied to establish the clean-up method. As a result, it was found that the recovery of the tested pesticide was reduced when using the d-SPE method with PSA and GCB, but C₁₈ showed an excellent recovery. Therefore this method was established as the final analysis method. For the analysis, LC-MS/MS was used with consideration of the selectivity and sensitivity of the target pesticide and was operated in MRM mode. The

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

results of the recovery test using the established analysis method and inter laboratory validation showed a valid range of 70-120%, with standard deviation and coefficient of variation of less than 3.0% and 11.6%, respectively.

CONCLUSION: Dichlobentiazox could be analyzed with a modified QuEChERS method, and the method determined would be widely available to ensure the safety of residual pesticides in Korea.

Key words: Agricultural Product, Analytical Method, Dichlobentiazox, LC-MS/MS, Pesticide Residue

서론

디클로벤티아족스(Dichlobentiazox)는 사카린유도체에서 발견한 thiazole계 살균제로 식물의 살리실산 경로를 활성화시켜 병해 저항성을 유도함으로써 방제효과를 나타내며 도열병에 효과적이다[1]. Dichlobentiazox는 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 3.4로 비극성 화합물이며 분자 구조 및 물리·화학적 특성은 Table 1과 같다.

Dichlobentiazox의 주된 부작용은 일본(Food Safety Commission of Japan, FSCJ)에서 빈혈(개), 간장의 담관비대와 과형성(hyperplasia and hypertrophy) 및 십이지장 용모상피비대/과형성(hypertrophy/hyperplasia)이 있으며 발암성(carcinogenicity), 생식독성(reproductive toxicity), 최기형성(teratogenicity) 및 유전독성(genotoxicity)을 나타

내지 않는다고 보고하였다. 래트에 대해 2년간 만성독성/발암성 연구에서 최저 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)을 5.03 mg/kg bw/day로 설정하였고, NOAEL에 안전계수 100을 적용하여 일일섭취허용량(Acceptable Daily Intake, ADI)를 0.05 mg/kg bw/day로 설정하였다[2].

Dichlobentiazox에 대한 국외 농산물 중 잔류허용기준(Maximum Residue Limits, MRL)은 일본에서 현미에 대하여 0.01 mg/kg으로 설정되어 있으며, 모화합물만을 잔류물의 정의로 설정하여 관리하고 있다. 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex), 유럽(European Commission, EC), 미국(The Electronic Code of Federal Regulations, ECFR)에서는 dichlobentiazox에 대한 별도의 기준과 잔류물의 정의가 설정되어 있지 않다. 농작물 중 잔류물의 정의를 결정하는데 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 결정되어지는데 일본 식품안전위원회의 식품안전평가서에 따르면 대사산물인 M1, M2, M3는 정량한계 미만이었으며, M4와 M14는 급성독성이 약하고 복귀 돌연변이 시험결과 음성으로 나타났다. 이에 따라 국내의 경우 잔류물의 정의를 dichlobentiazox 모화합물로 정하여 관리할 예정으로 안전 관리를 위하여 시험법 마련이 필요하다.

최근 국내외 동향에 따르면 방법이 간단하며 다양한 매질에서 동시 시험법 개발을 하는데 QuEChERS법(quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)이 사용되고 있다[4-10]. QuEChERS법은 아세토니트릴을 추출 용매로 사용하며, 무

Table 1. Physicochemical characteristics of dichlobentiazox

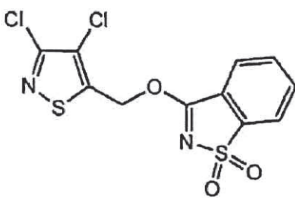
Property	Dichlobentiazox
Structure	
IUPAC name	3-(3,4-dichloro-1,2-thiazol-5-ylmethoxy)-1,2-benzothiazole 1,1-dioxide
CAS no.	957144-77-3
Molecular formula	$C_{11}H_6Cl_2N_2O_3S_2$
Molecular weight (g/mol)	349.2
Exact mass (g/mol)	347.91
Melting point (°C)	172.5-175
Log P_{ow}	3.4
Vapor pressure	7×10^{-9} Pa (25°C)
Solubility in water (mg/L)	0.36
Solubility in organic solvent (g/L, 20°C)	acetone : 45 methanol : 1.6 ethyl acetate : 23 acetonitrile : 24

Table 2. The list of collected agricultural products and results of residual analysis

Type	Agricultural product	No. of analyzed samples	Residue (mg/kg)
Citrus fruits	Mandarin	9	<LOQ ¹⁾
Leafy vegetables	Chinese cabbage	10	<LOQ
Grains	Hulled rice	10	<LOQ
Beans	Soybean	6	<LOQ
	Chick pea	2	<LOQ
	Kidney bean	3	<LOQ
	Black soybean	1	<LOQ
	Rhynchosia nulubilis	1	<LOQ
Root vegetables	Radish	10	<LOQ
	Onion	10	<LOQ
Fruit vegetables	Green pepper	10	<LOQ
	Tomato	10	<LOQ
Root and tuber crop	Potato	10	<LOQ
Pome fruits	Persimmon	7	<LOQ
	Apple	10	<LOQ
	Soft persimmon	5	<LOQ
Drupes	Peach	9	<LOQ

¹⁾ Limit of quantification

수황산마그네슘과 염화나트륨을 첨가하여 검체 중 수분과 간섭물질을 제거하고 salting out 원리로 추출용액과 물 층을 분리하여 추출 효율을 높이는 방법이다. 또한 pH에 민감한 성분들을 효율적으로 추출하기 위하여 아세트산을 함유한 아세토니트릴과 acetate 염을 넣어 추출하는 AOAC 2007.01 법과 citrate 염을 첨가하여 추출하는 CEN 15662법이 있다. 분산상 SPE법(dispersive-solid phase extraction, d-SPE)에서 사용되는 무수황산마그네슘(MgSO₄)은 추출 후 시료에 남아있는 수분을 제거하여 추출액의 극성도를 낮아지게 하며 primary secondary amine (PSA)은 추출액 중 (-) 전하를 띠는 유기산 등을 제거한다[3]. 또한 octadecyl (C₁₈)은 지질과 같은 비극성 간섭 물질을 제거하고, graphitized carbon black (GCB)은 스테롤뿐만 아니라 클로로필, 카로티노이드 같은 색소를 제거한다[14].

따라서 본 연구에서는 식품 중 잔류할 수 있는 dichlobentiazox의 안전관리를 위해 대표 농산물 5품목(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대한 시험법을 개발하여 dichlobentiazox의 잔류허용기준 신설 및 잔류농약검사를 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다. 또한 전국 7개 지역(서울, 인천, 대전, 수원, 청주, 전주, 원주) 11개 대형마트로부터 수거한 농산물 123건을 대상으로 dichlobentiazox에 대한 잔류실태를 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Dichlobentiazox(99.8%) 표준품은 구미이화학공업주식회사에서 제공받아 사용하였고, 아세토니트릴은 HPLC 등급

으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 포름산은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 추출에 사용된 시약kit (Part No. 186006813)는 Waters (Leinster, Ireland)로부터 구입하여 사용하였으며, 정제에 사용된 시약kit (Part No. QM9AC)는 CHROMAtific (Cacilienweg, Germany)에서 구입하였다. 멤브레인 필터 (PTFE, 0.2 µm × 13 mm)는 Teknokroma (Barcelona, Spain)에서 구입하였으며 검체는 식품공전에서 규정하는 대표 농산물 5품목 현미(곡류, hulled rice), 감자(서류, potato), 대두(두류, soybean), 감귤(과일류, mandarin), 고추(채소류, green pepper) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C 이하에 보관하고 실험에 사용하였다. 수거한 모니터링 시료는 곡류 23건, 감귤류 9건, 결구엽채류 10건, 근채류 20건, 박과이외과채류 20건, 서류 10건, 인과류 22건, 핵과류 9건으로 전국 7개 지역 11개 대형마트에서 유통되고 있는 농산물 8품목을 수거하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C 이하에 보관하고 실험에 사용하였다 (Table 2).

표준원액 및 표준용액의 조제

Dichlobentiazox 표준품 20.04 mg을 20 mL의 아세토니트릴 : 물(90 : 10, v/v)에 용해하여 1,000 mg/L의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 검체의 무처리 추출액 900 µL에 2.5 mg/L 표준용액 100 µL를 넣어 0.25 mg/L 표준용액을 조제한 뒤 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.125 mg/L의 농도가 되도록 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병

에 담아 4℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

검체를 분쇄하여 균질화한 후 5 g(곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준제 420 µm를 통과하도록 분쇄한 후 5 g, 서류, 과일류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄한 후 5 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류 및 두류의 경우 물 5 mL 첨가 후 30분간 방치) 아세트니트릴 20 mL를 가한 뒤 10분간 진탕하였다. 진탕 후 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g을 추가하여 1분간 혼든 후 4℃, 4,000 g에서 10분간 원심 분리하여 상정액 1 mL를 취하였다. 무수황산마그네슘(MgSO₄) 150 mg과 octadecyl (C₁₈) 25 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 상정액 1 mL를 가하고 30초간 와류교반기 등을 이용하여 충분히 혼합한 후 이를 4℃, 4,000 g에서 10분간 원심 분리하였다. 정제된 상정액은 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 µm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

LC-MS/MS 분석조건

Dichlobentiazox를 분석하기 위하여 LC-MS/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다. 분석용 컬럼으로 Luna[®] Omega Polar C₁₈ (2.1 mm I.D. × 100 mm L.,

3.0 µm)을 선택하였으며, 이동상으로 0.1% 포름산이 함유된 아세트니트릴과 0.1% 포름산이 함유된 물을 사용하여 최적의 기울기 용리 방식을 적용하였다. 정량 분석을 위한 이온화 방식은 ESI (Electro-spray ionization)법의 positive-ion mode를 사용하였으며 LC-MS/MS의 분석조건은 Table 3과 같다.

시험법 유효성 검증

확립된 dichlobentiazox의 시험법은 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마린 표준절차에 관한 가이드라인(MFDS, 2016)'과 'CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)'에 근거로 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확성(accuracy), 반복성(repeatability), 회수율(recovery)에 대해 유효성을 검증하였다. 선택성은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 확인하였다. 직선성 확인은 표준용액을 0.0025-0.25 mg/L의 농도가 되도록 검체의 무처리 추출액으로 희석하여 각 농도 범위에 대한 peak의 면적으로 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였으며, 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, r²)를 구하였다. 또한 크로마토그램 상에서 신호(signal) 내

Table 3. LC-MS/MS parameters for the analysis of dichlobentiazox

Condition	Content		
Instrument	LC: Nexera X2 UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) MS/MS: LCMS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan)		
<i>Chromatographic separation</i>			
Column	Luna [®] Omega Polar C ₁₈ (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3.0 µm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 µL		
Column temp.	40℃		
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in acetonitrile B: 0.1% Formic acid in water		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	50	50
	1.0	50	50
- Gradient	2.0	70	30
	7.0	100	0
	8.0	100	0
	8.1	50	50
	10.0	50	50
<i>MS/MS condition</i>			
Interface temp.	150℃		
Heating block temp.	400℃		
Desolvation line temp.	250℃		
Heating gas flow	10.0 L/min		
Nebulizer gas flow	3.0 L/min		

잡음(noise)비(S/N ratio)가 각각 3과 10 이상이 되는 농도를 LOD와 LOQ로 설정하였다. 시험법의 정확성과 반복성은 대표 농산물 5종에 대하여 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배의 농도가 되도록 무처리 시료에 5반복 처리한 후 시료분석과 동일한 방법으로 분석하여 평균 회수율과 표준편차(standard deviation, SD)를 계산하여 평가하였다. 시험법의 재현성은 광주지방식품의약품안전청과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 실시하고 변이계수(coefficient of variance, CV)를 구하여 확인하였다.

결과 및 고찰

추출 및 정제조건 확립

Dichlobentiazox는 Log P_{ow} 의 값이 3.4인 비극성 화합물로 pH 4-10에서 비해리 상태로 존재한다. 잔류농약은 검체 입자 표면이나 내부에 존재하고, 검체 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 이를 추출하기 위해서는 검체 내부로의 침투가 용이한 수용성 유기용매를 사용한다[3]. 추출 및 정제 과정에서 검체의 유기산과 색소를 제거할 수 있는 분산상 SPE법을 적용하는 것이 좋을 것으로 판단되었으며, 이를 적용하는 QuEChERS 법을 검토하였다. Anastassiades 등[3]이 개발한 original법과 acetate 또는 citrate 버퍼를 이용하여 추출하는 AOAC법과 CEN 15662법[11-13]을 비교하였다. 대표 농산물 5종(건조 시료의 경우 물 5 mL 첨가 후 30분

방치)을 이용하여 QuEChERS법 세 가지의 회수율과 matrix effect를 비교한 결과 전체적으로 만족할만한 추출 효율을 보였으며, matrix effect는 작물간 차이를 보이지 않았다(Table 4, 5). 따라서 최근 농산물품질관리원에서 CEN 15662법을 이용한 동시다성분 시험법을 사용하고 있고, 식약처가 고시하고 있는 동시다성분 시험법의 통일성을 위하여 CEN 15662법을 추출 방법으로 확립하였다.

정제조건 확립을 위해 표준용액을 이용하여 $MgSO_4$ 와 PSA, C_{18} , GCB를 각각 혼합한 조건으로 정제 효율을 비교하였다. $MgSO_4$ 와 PSA, C_{18} , GCB를 모두 혼합한 경우 회수율은 5.3%로 매우 낮았고 가장 보편적으로 사용하는 $MgSO_4$ 와 PSA를 혼합한 조건에서는 회수율이 16.4%로 낮아 적합하지 않은 것으로 확인되었다. $MgSO_4$ 와 C_{18} 을 혼합한 조건에서 100.8%로 가장 우수한 회수율을 보였으며, $MgSO_4$ 와 PSA, C_{18} 을 혼합한 경우 33.7%로 적합하지 않아 $MgSO_4$ 와 C_{18} 을 혼합한 조건을 최종 정제조건으로 확립하였다(Table 6).

기기분석조건 확립

Dichlobentiazox의 구조를 보면(Table 1) 방향족 탄화수소인 벤젠고리와 -O-, C=N과 같은 발색단을 포함하고 있어 HPLC-UV를 이용한 분석이 가능하나, 비교적 선택성이 높고 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 농약허용물질목록관리제도(positive list system, PLS) 도입에 따른 0.01 mg/kg 수준의 LOQ를 확보할 수 있는 LC-MS/MS를

Table 4. Comparisons of QuEChERS extraction for the determination of dichlobentiazox in samples

Sample	Mean recovery \pm SD ^a (%)		
	Original	AOAC 2007.01	CEN 15662
Hulled rice	78.2 \pm 1.5	77.5 \pm 0.7	74.9 \pm 0.3
Potato	82.4 \pm 0.4	85.6 \pm 1.1	82.4 \pm 0.8
Soybean	89.1 \pm 3.9	92.0 \pm 1.2	86.1 \pm 2.5
Mandarin	103.9 \pm 0.7	105.9 \pm 2.0	99.2 \pm 0.3
Green pepper	84.8 \pm 2.0	86.0 \pm 1.0	83.5 \pm 2.8

^a Mean values of 3 times repetitions with standard deviation.

Table 5. Comparisons of matrix effect between QuEChERS extractions for the determination of dichlobentiazox in samples

Sample	Matrix effect ^a		
	Original	AOAC 2007.01	CEN 15662
Hulled rice	-11.0	-19.5	-9.6
Potato	1.1	-2.2	-0.5
Soybean	-48.8	-48.7	-56.6
Mandarin	-48.4	-45.1	-45.2
Green pepper	-73.4	-75.3	-74.4

^a Matrix effect(%) = ((Peak area of standard in matrix - peak area of standard in solvent) / peak area of standard in solvent) \times 100.

Table 6. The clean-up efficiency of dichlobentiazox according to adsorbent composition

Sorbent	Mean recovery \pm SD ^a (%)
MgSO ₄ 150 mg + PSA 25 mg	16.4 \pm 0.8
MgSO ₄ 150 mg + C ₁₈ 25 mg	100.8 \pm 1.1
MgSO ₄ 150 mg + GCB 2.5 mg	61.5 \pm 2.1
MgSO ₄ 150 mg + PSA 25 mg + C ₁₈ 25 mg	33.8 \pm 1.7
MgSO ₄ 150 mg + PSA 25 mg + GCB 2.5 mg	16.5 \pm 0.6
MgSO ₄ 150 mg + C ₁₈ 25 mg + GCB 2.5 mg	59.3 \pm 0.5
MgSO ₄ 150 mg + PSA 50 mg + C ₁₈ 50 mg + GCB 7.5 mg	5.3 \pm 0.3

^a Mean values of 3 times repetitions with standard deviation.

Table 7. MRM (multiple reaction monitoring) conditions of dichlobentiazox for analysis in ESI positive mode

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	CE ^b (eV)
Dichlobentiazox	3.4	349.2	347.91	349	166 ^a	22
					196	12

^a Quantification ion, ^b Collision energy.

분석기기로 선정하였다. 잔류분석법에 많이 이용하고 비극성 물질과 극성물질 모두 분리가 가능한 C₁₈ 역상 컬럼을 선택하였고, 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 아세트니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다[15]. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 dichlobentiazox 분자의 [M+H]⁺ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 ESI법의 positive-ion mode를 사용하였고, 확립한 분석조건을 바탕으로 TIC (total ion chromatogram)와 mass spectrum을 통해 최적 특성이온을 선정하고 SIM (selected-ion monitoring)으로 분석하였다. dichlobentiazox의 관측 질량은 347.91 g/mol이며 표준용액(0.1 mg/L)을 일정한 속도(10 μ L/min)로 질량 검출기에 직접 주입한 결과 [M+H]⁺ 형태인 질량을 349 *m/z* 값으로 확인하였다. 분석의 선택성과 검출 강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였다. 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 설정하였다. 분석조건에서 선정된 특성 이온과 최적의 collision energy는 Table 7에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 5종의 농산물 검체에 대해 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

시험법 유효성 검증

시험법의 선택성을 표준용액, 무처리시료, 표준용액을 첨

가한 회수율 시료의 크로마토그램을 비교한 결과 dichlobentiazox의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 방해 물질이 검출되지 않아 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 농산물 5종의 무처리 추출액으로 희석한 표준용액 0.0025-0.25 mg/L의 농도로 matrix-matched 검량선으로 정량하여 *r*²를 확인한 결과 0.9980-0.9996으로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 2). 설정한 LOD와 LOQ로 계산한 결과 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg로 나타났다. 이러한 결과는 PLS 도입으로 인한 잔류허용기준이 정하여 있지 않은 농산물의 불검출 기준인 0.01 mg/kg 수준에 만족할 수 있는 감도이다. 시험법의 정확성과 반복성은 대표 농산물 5종에 대하여 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg의 농도로 처리한 후 5반복 실험을 수행한 결과 평균 회수율은 79.8-100.7%이었고, 표준편차는 3.0% 이하로 확인하였다(Table 8). 본 결과는 CODEX 가이드라인(codex alimentarius commission, CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 적합함을 확인할 수 있었다.

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성을 검증하기 위해 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 타 실험실에 동일하게 제공한 후 분석한 회수율 및 표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 dichlobentiazox의 평균 회수율은 75.6-99.5%, 표준편차는 4.7%이하로 확인되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 78.2-98.5%, 변이계수(CV)는

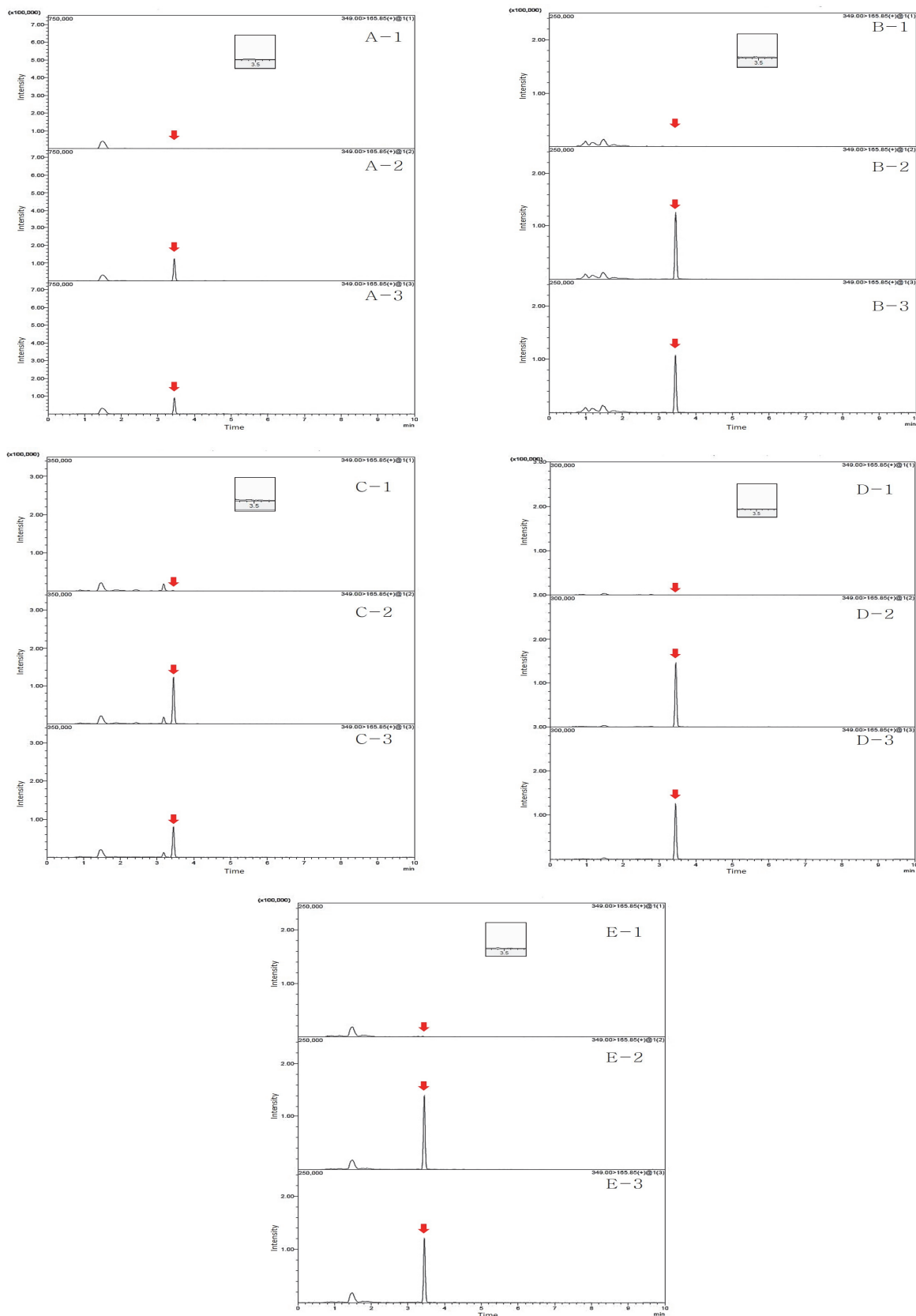


Fig. 1. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms of dichlobentazox (349>166) corresponding to; (1) matrix-matched control, (2) standard solution at 0.025 mg/L, and (3) recovery test (fortification : 0.025 mg/kg) in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin, and (E) green pepper.

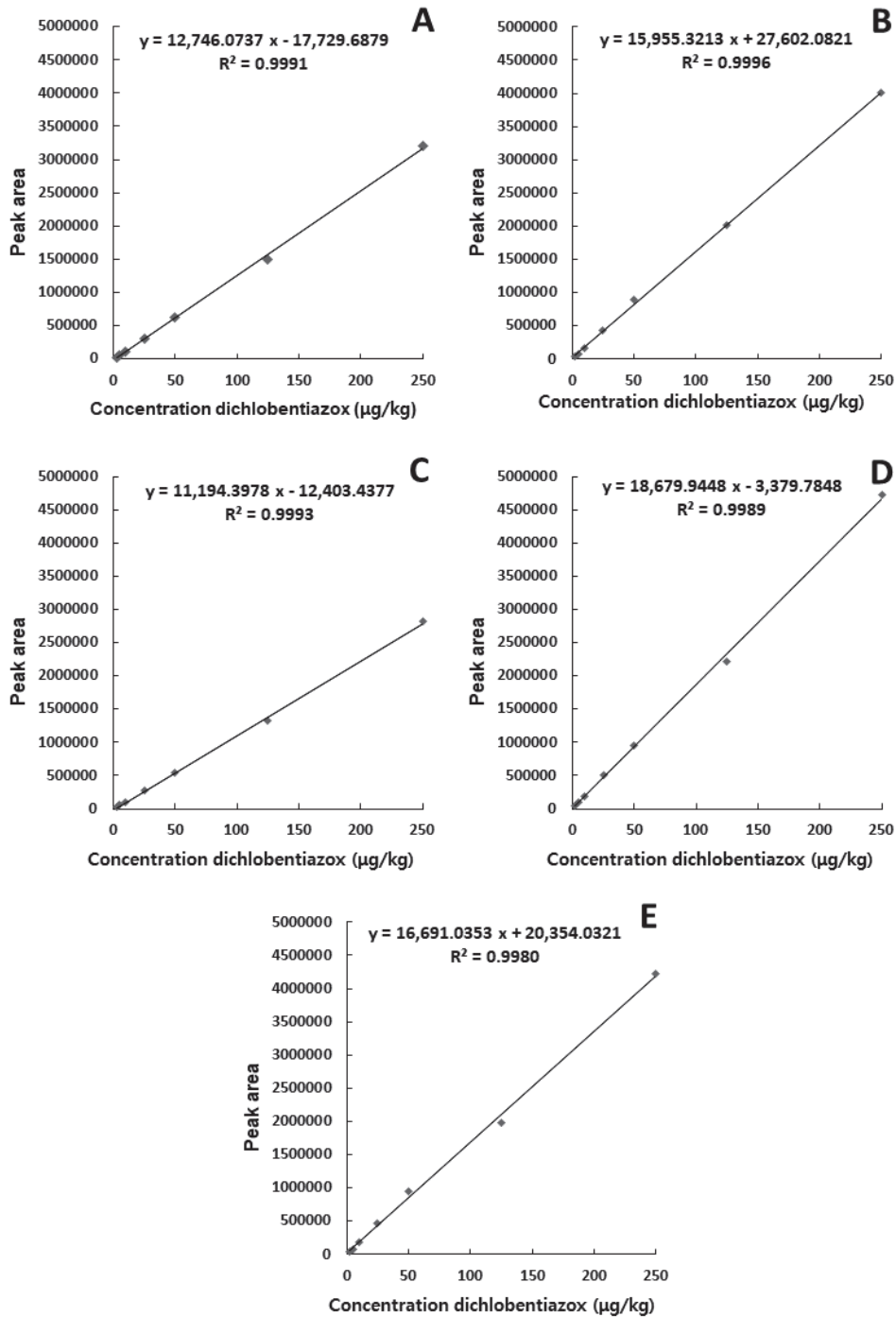


Fig. 2. Matrix-matched calibration curves of dichlobentiazox in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

11.6%이하로 나타났다(Table 8). 따라서 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)에서 제시한 실험실간 검증 기준 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)에서 제시한 검증 기준에 만족함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 시험법은 잔류허용기준을 통한 안전관리 및 적부판정을 위한 시험법으로 적합할 것으로 확인된다.

잔류농약 모니터링 결과

본 연구에서 개발한 시험법에 대해 전국 7개 지역 대형마트에서 수거한 농산물 123건을 대상으로 잔류농약 모니터링을 한 결과 dichlobentiazox의 잔류량이 확인되지 않았다(Table 2). 이는 dichlobentiazox가 국내 등록 예정 농약으로 아직까지 농가에서 사용하지 않아 검출되지 않은 것으로 사료된다.

Table 8. Validation results of analytical method for the determination of dichlobentiazox residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery \pm SD ^a (%)		Ave ^d (%)	CV ^e (%)	LOQ ^f (mg/kg)
		Lab. A ^b	Lab. B ^c			
Hulled rice	0.01	100.7 \pm 0.7	82.1 \pm 4.7	91.4	11.6	0.01
	0.1	93.9 \pm 1.4	81.0 \pm 2.7	87.5	8.4	
	0.5	86.2 \pm 0.7	82.6 \pm 2.2	84.4	2.9	
Potato	0.01	89.9 \pm 1.7	92.3 \pm 1.5	91.1	2.2	
	0.1	79.8 \pm 1.9	86.9 \pm 0.5	83.4	5.0	
	0.5	87.0 \pm 1.8	87.8 \pm 1.8	87.4	2.1	
Soybean	0.01	84.2 \pm 2.0	75.6 \pm 4.2	79.9	7.0	
	0.1	86.7 \pm 1.7	76.1 \pm 0.4	81.4	7.3	
	0.5	80.4 \pm 1.6	75.9 \pm 1.4	78.2	3.7	
Mandarin	0.01	98.9 \pm 1.0	98.1 \pm 3.3	98.5	2.3	
	0.1	94.7 \pm 1.1	99.5 \pm 3.7	97.1	3.7	
	0.5	91.1 \pm 1.0	97.2 \pm 4.2	94.2	4.6	
Green pepper	0.01	98.7 \pm 1.4	95.1 \pm 3.8	96.9	3.3	
	0.1	85.4 \pm 3.0	87.7 \pm 1.4	86.6	3.1	
	0.5	90.8 \pm 1.0	87.6 \pm 2.2	89.2	2.6	

^a Mean values of 5 or 3 times repetitions with standard deviation

^b Ministry of Food and Drug Safety

^c Gwangju Regional Food and Drug Administration

^d Recovery average of inter-laboratory

^e Coefficient of variation of inter-laboratory

^f Limit of quantification

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was supported by the Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Republic of Korea under the paradigm of a study on risk assessment and establishment of new analytical method for safety management of pesticide residues in food (20161MF DS606).

References

- Umetsu N, Shirai Y (2020) Development of novel pesticides in the 21st century. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 45(2), 55-74.
<https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-201>.
- Food Safety Commission of Japan (FSCJ) (2020) Dichlobentiazox (Pesticides). *Food Safety*, 8(1), 6-7.
<https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.D-20-00002>.
- Anastassiades M, Lehoutay SJ, Tajnbaher 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, 412-431.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
- Rahman MM, Kim SW, Na TW, Abd El-Aty AM, Lee YJ, Park JS, Shim JH et al. (2016) QuEChERS method for the simultaneous quantification of phorate and its metabolites in porcine and chicken muscle and table eggs using ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 39(11), 2079-2086.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201600151>.
- Harischandra NR, Pallavi MS, Bheemanna M, PavanKumar K, Reddy VCS, Udaykumar NR, Paramasivam M, Yadav S (2021). Simultaneous determination of 79 pesticides in pigeonpea grains using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 347, 128986.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128986>.
- Naik RH, Pallavi MS, Kumar KP, Vanitha BK, Reddy VCS, Shwetha A, Bheemanna M et al. (2021). Deter-

- mination of 72 chemical pesticides and estimation of measurement of uncertainty in rice using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02000-9>.
7. Zheng W, Park JA, Abd El-Aty AM, Kim SK, Cho SH, Choi JM, Shin HC et al. (2018). Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 1072, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.011>.
 8. Melo MG, Carqueijo A, Freitas A, Barbosa J, Silva AS (2020). Modified QuEChERS Extraction and HPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of 155 Pesticide Residues in Rice (*Oryza sativa* L.). *Foods*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.3390/foods9010018>.
 9. Huang Y, Shi T, Luo X, Xiong H, Min F, Chen Y, Xie M et al. (2019). Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 275, 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.094>.
 10. Hu M, Qiu J, Zhang H, Fan X, Liu K, Zeng D, Tan H (2018). Method development and validation of indaziflam and its five metabolites in soil, water, and fruits by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10300-10308. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04186>.
 11. Lehotay SJ, Maštovská K, Lightfield AR (2005) Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88(2), 615-629. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.615>.
 12. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukiwat U, Fu W, Mastovska K, Leepipatpiboon N et al. (2010) Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2548-2560. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>.
 13. Rejczak T, Tuzimski T (2015). A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 1(open-issue). <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>.
 14. Wilkowska A, Biziuk M (2011) Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125, 803-812. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094>.
 15. Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR (2004) A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(1), 49-58. <https://doi.org/10.1002/rcm.1276>.