

Research Article



CrossMark

Open Access

컬럼 비교를 통한 Ferimzone Z 및 E 입체 이성질체의 물질 분리 및 HPLC-MS/MS를 활용한 현미 중 미량잔류분석법 개발

정문주, 김소희, 은혜란, 이예진, 김수민, 백재운, 이윤희, 신용호*

동아대학교 생명자원과학대학 응용생명과학과

Column Comparison for the Separation of Ferimzone Z and E Stereoisomers and Development of Trace Residue Analysis Method in Brown Rice Using HPLC-MS/MS
Mun-Ju Jeong, So-Hee Kim, Hye-Ran Eun, Ye-Jin Lee, Su-Min Kim, Jae-Woon Baek, Yoon-Hee Lee, Yongho Shin*
(Department of Applied Bioscience, Dong-A University, Busan 49315, Korea)

Received: 9 August 2023/ Revised: 29 August 2023/ Accepted: 30 August 2023

Copyright © 2023 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

Mun-Ju Jeong

<https://orcid.org/0000-0002-4270-6138>

So-Hee Kim

<https://orcid.org/0000-0003-3103-1099>

Hye-Ran Eun

<https://orcid.org/0000-0002-7768-0644>

Ye-Jin Lee

<https://orcid.org/0000-0001-9883-4641>

Su-Min Kim

<https://orcid.org/0000-0001-7529-6596>

Jae-Woon Baek

<https://orcid.org/0009-0004-5511-9022>

Yoon-Hee Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7896-7743>

Yongho Shin

<https://orcid.org/0000-0001-5942-7154>

Abstract

Ferimzone Z is a fungicide for effectively controlling rice blast. Under light irradiation conditions, it undergoes a rapid conversion to its E-stereoisomer. Given the importance of isomers in risk assessments of residues in crops, an analytical method was developed for individual isomer quantification. A comparative analysis performed using two columns in HPLC-MS/MS demonstrated that the isomers were successfully separated using the Cadenza column. For the brown rice sample preparation, 5 g of the homogenized sample was saturated with 7 mL of water. The sample was then extracted with a 10 mL mixed solvent of acetonitrile and ethyl acetate (1:1, v/v) that contained 0.1% formic acid,

and it was subsequently partitioned with magnesium sulfate and sodium chloride. The upper layer was purified using dSPE containing C₁₈ and PSA sorbents. The established method was subjected to method validation, and it showed recovery rates of 90.6-98.8% (RSD ≤ 3.9%) at concentrations of 0.01, 0.1, 2 mg/kg, with a soft matrix effect (%ME) ranging from -3.1% to +6.5%. This method can be employed in monitoring studies of brown rice to determine the conversion ratio from the Z isomers to the E isomers.

Key words: Brown rice, Column, Ferimzone, HPLC-MS/MS, Stereoisomer

서론

Ferimzone은 pyrimidine 계열 살균제로 벼의 도열병(rice blast), 갈색점무늬병(leaf brown spot), 검은무늬병(stem rot),

*Corresponding author: Yongho Shin

Phone: +82-51-200-7584; Fax: +82-51-200-7505;

E-mail: yong6103@dau.ac.kr

잎집무늬마름병(sheath blight) 등에 탁월한 효과를 보인다 [1]. Ferimzone은 도열병균인 *Pyricularia oryzae*의 균사체에 전해질 누출(electrolyte leakage)을 일으켜 세포막 기능을 방해하는 것으로 보이나, 그 작용기작은 아직 명확하게 밝혀진 바가 없다[2,3]. 도열병에 대한 방제효과를 극대화하고 저항성 종의 발달을 막고자 phthalide 또는 tricyclazole와 혼용하기도 한다[4].

Ferimzone의 화학 구조에는 이중결합 탄소 두 개가 포함되어 있으며, 각각의 sp^2 혼성 오비탈 탄소는 서로 다른 우선 순위(priority)의 치환체가 공유결합하고 있어 Z 및 E 형태의 입체이성질체(stereoisomer)로 구분할 수 있다(Fig. 1). 이중살균제 유효성분으로 활용하는 물질은 Z 이성질체이며, 광 노출(light irradiation) 조건에서 빠르게 E 이성질체로 전환된다[5].

고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography; HPLC)의 검출기(detector)나 질량분석기(mass spectrometer; MS)의 선택이온분석법(selected ion monitoring; SIM) 및 다중반응모니터링(multiple reaction monitoring; MRM)만으로는 화학식과 원자 배열이 동일한 입체이성질체의 구분이 어렵다. 이성질체의 개별 정량을 위해서는 검출기에서의 반응 전 이성질체의 물질 분리가 필수적이다. 광학 물리성을 제외한 물리화학적 성질이 동일한 거울상 이성질체와는 달리, 이중결합에 의한 입체이성질체는 물리화학적 성질이 다르므로 일반 크로마토그래피 컬럼(column)을 통한 물질 분리가 가능하다.

벼의 병해에 최적인 ferimzone의 특성에 따라 현미 또는 곡류 중 잔류농약 분석과 관련된 연구가 확인된 바 있다. Min

(2012) 등은 1% formic acid를 acetonitrile (MeCN)에 첨가하여 추출용매로 하고 C_{18} 및 primary secondary amine (PSA)를 정제 sorbent로 한 QuEChERS 전처리법을 개발하여 72 농약 다성분 분석을 현미에 적용하였으며, 모니터링 결과 7개 시료에서 ferimzone은 0.009-0.448 mg/kg 수준으로 잔류됨을 확인하였다[6]. Saito-Shida (2021) 등은 전처리 과정에서 graphitized carbon black (GCB)/PSA cartridges를 사용하여 추출물을 정제하였으며, LC-QTOF-MS를 활용하여 ± 5 mDa 이내의 정확 질량 범위에서 곡물과 두류 중 ferimzone을 포함한 152 농약 다성분 분석을 수행한 바 있다 [7]. 그러나 유효성분인 ferimzone Z와 환경전환산물(environmental transformation product)인 ferimzone E를 개별 정량 분석한 사례는 발견된 바 없다. 입체이성질체에 대한 동시 개별 분석이 가능할 경우, 시료 모니터링과 동시에 모화합물의 환경 중 전환 비율을 확인할 수 있다. 따라서 정량 결과 및 이성질체의 개별 독성 연구자료를 바탕으로 작물 중 잔류물에 대한 보다 정교한 위해성 평가를 수행할 수 있다.

본 연구에서는 HPLC를 활용하여 입체이성질체인 ferimzone Z와 E 이성질체를 효율적으로 분리한 후 정량하는 방법을 찾고자 하였다. 이후 HPLC-탠덤 질량분석기(HPLC-MS/MS)를 활용하여 현미 중 ferimzone 이성질체에 대한 동시 미량잔류분석법을 개발하였다. 현미의 매트릭스(matrix) 특성을 고려하여 시료 습윤화, 농약 추출, 분배, 정제 과정에 사용되는 여러 가지 시약에 대해 비교 검토하였으며, 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 각 처리군들의 유의성을 통계적인 방법으로 결정하여 최적 전처리법을 확인하였다. 확립된 분석법은 검증 과정을 거쳐 유효성을 입증하였다.

재료 및 방법

시험약제 및 시약

Ferimzone Z (순도 98.0%) 표준물질은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, ferimzone E (1000 mg/L)의 표준원액은 AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA)에서 구입하였다. HPLC급 acetonitrile (MeCN)과 ethyl acetate (EA)는 Samchun Chemical (Seoul, Korea) 및 Duksan Pure Chemical (Seoul, Korea)에서 각각 구입하였다. LC-MS급 methanol과 formic acid (>99%)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고 LC-MS급 water는 Merck에서 구입하였다. QuEChERS extraction Original pouch (magnesium sulfate; $MgSO_4$ 4 g, sodium chloride; NaCl 1 g) 및 EN 15662 pouch ($MgSO_4$ 4 g, NaCl 1 g, sodium citrate 1 g 및 sodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 g), 그리고 dispersive SPE (dSPE) 튜브 중 Part No. 5982-5021 (PSA 25 mg, $MgSO_4$ 150 mg), 5982-4921 (C_{18} 25 mg, $MgSO_4$ 150 mg), 5982-5121 (PSA 25 mg, C_{18} 25 mg 및 $MgSO_4$ 150 mg), 5982-5122 (PSA 50 mg, C_{18} 50 mg 및 $MgSO_4$ 150 mg)는 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)에서 구입

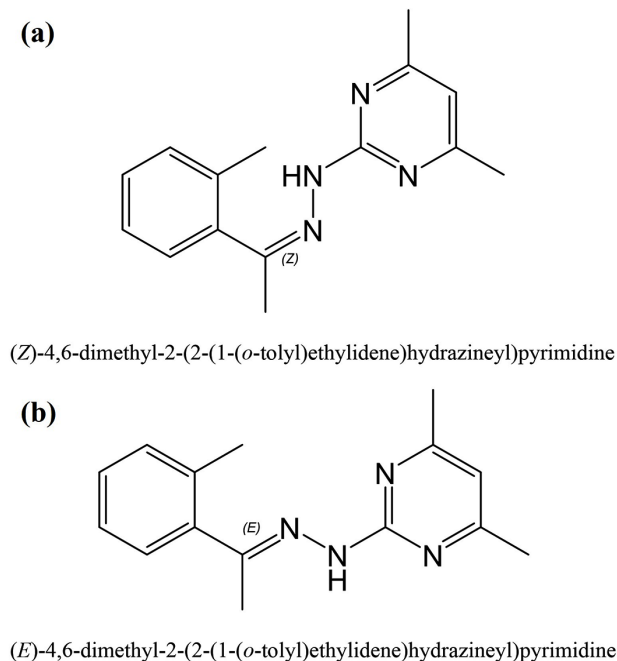


Fig. 1. Structural formulas and IUPAC names of the active ingredient (a) ferimzone Z isomer and its transformation product (b) ferimzone E isomer.

하였다. 분석법 개발을 위한 현미 시료는 시중에서 판매되는 제품 중에서 ferimzone이 검출되지 않은 것을 선정하였으며, blender에 넣고 마쇄한 현미를 전처리 전까지 -20°C 에서 냉동보관하였다.

표준용액 및 매질보정 표준용액(matrix-matched standard) 제조

Ferimzone Z 표준물질의 순도를 고려하여 5.10 g을 정확히 칭량한 후 5 mL 부피플라스크에 넣고 MeCN을 눈금까지 채워 1000 mg/L의 표준용액을 제조하였다. 이후 ferimzone Z와 E 표준용액을 혼합하여 200 mg/L의 혼합표준용액을 만든 후, MeCN을 사용하여 단계적으로 희석하여 표준용액의 농도가 각각 10000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ng/mL가 되도록 제조하였다. 매질보정 표준용액을 제조하기 위해 농약 무처리 현미 추출물 300 μL 와 혼합표준용액 300 μL 를 혼합하여 그 비율이 1:1 (v/v)이 되게 하였으며, 검량선 작성을 위한 매질보정 표준용액의 농도는 각각 1.25, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 125, 250 ng/mL (현미 시료 중 잔류량 5-1000 mg/kg에 해당)이었다.

HPLC 기기조건 및 컬럼 선택에 따른 입체 이성질체 분리

농약 분석을 위한 고성능 액체 크로마토그래피-탠덤 질량분석기(HPLC-MS/MS)로 LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) 및 Nexera liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다. 이동상 A는 0.1% formic acid가 함유된 water였고, 이동상 B는 0.1% formic acid가 함유된 methanol이었다. 이동상 B에 대한 농도구배(gradient) 조건은 다음과 같다; 초기 % B는 0.2분간 80%이었으며, 이후 3.3분간 92%로 상승시켜 물질분리한 다음 0.1분 동안 98%로 급격하게 상승시킨 후 2.4분간 흘러 컬럼 내 불순물을 제거하였다. 마지막으로 0.1분 동안 이동상을 98%에서 80%로 바꾼 후 추가 시료 분석을 위한 컬럼 내 이동상 평형을 맞추기 위해 3.4분간 흘러 주었다. 총 분석 시간은 9.5분이었으며, 컬럼 오븐 온도는 40°C 였으며, 이동상의 유속은 0.2 mL/min, 그리고 주입량(injection volume)은 1 μL 이었다.

HPLC에서의 ferimzone E 및 Z 이성질체의 물질 분리는 Kinetex PS C_{18} 컬럼(2.6 μm , 3×100 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)과 Cadenza CD- C_{18} 컬럼(3 μm , 2×150 mm; Imtakt Corp., Kyoto, Japan)을 사용하여 수행하였으며, 크로마토그램(chromatogram) 분석 결과를 바탕으로 최적 컬럼을 선택하였다.

탠덤 질량분석기 분석 조건

질량분석기는 양극의 전자분무이온화(positive electrospray ionization; ESI+) 방식을 사용하였다. Collision-induced dissociation (CID) 가스로는 99.999% 순도의 argon을 사용하였다. 이온원(ion source) 내의 desolvation line (DL) 및 heat block의 온도는 각각 250 및 400°C 였고, drying gas와

nebulizing gas의 유속은 각각 15와 3 L/min이었다. 분석 결과의 처리는 Shimadzu LabSolutions 소프트웨어(version 5.60 SP2)를 사용하여 수행하였다.

MRM을 통한 농약 분석을 위해 다음과 같이 각 성분의 최적 MRM 조건을 확립하였다. 먼저 full scan 분석을 통해 precursor ion의 질량 대 전하비(mass to charge ratio; m/z)를 추적하였다. 이후 product ion scan을 통한 다양한 collision energy (CE)에서의 precursor ion의 개열(fragmentation)을 수행하여 product ion들을 확인하고, 이중 선택성 및 감도가 높은 product ion 2개를 정량 및 정성 이온으로 각각 선정하였다.

현미 시료 습윤화를 위한 최적 수분량 결정

마쇄한 시료 5 g을 50-mL 원심분리 튜브에 넣고 물을 3, 5, 7, 10 mL씩 각각 넣고 15분간 습윤화하였다. 이후 시료에 MeCN을 10 mL씩 각각 넣고 1,300 rpm에서 2분간 진탕추출한 후, QuEChERS 염을 넣고 다시 1,300 rpm에서 1분간 진탕한 다음 원심분리하였다. 이후 시료의 습윤화 정도와 분배 후 시료의 상태 등을 고려하여 시료 습윤화에 최적인 수분의 양을 결정하였다.

시료 추출 및 분배조건 비교

습윤화한 시료 5 g에 10 mg/L 혼합표준용액 50 μL 를 첨가하여 시료 중 농약 농도를 0.1 mg/kg으로 처리하였다. 이후 formic acid 0.1%가 첨가된 2종류의 용매 MeCN, MeCN/EA (1:1, v/v)를 각각 10 mL씩 넣고 추출한 다음 추출액을 QuEChERS original 염(MgSO₄ 4 g, NaCl 1 g) 또는 EN 15662 염(MgSO₄ 4 g, NaCl 1 g, sodium citrate 1 g 및 sodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 g)을 사용하여 분배하였다. 별도의 정제 과정 없이 상등액인 유기용매층 300 μL 를 취하여 MeCN 300 μL 와 섞어 매질보정(matrix-matching)한 후, 질량분석기에 1 μL 에 주입하여 얻은 피크(peak)의 신호(area)를 동일 농도의 매질보정 표준용액의 신호 세기와 비교하여 회수율(n=3)을 구하였다. 해당 회수율 결과는 통계처리 프로그램인 R (version 4.3.1)을 사용하여 처리된 간 유의성 검정을 수행하였다.

시료 정제조건 비교

습윤화한 시료 5 g에 농약을 첨가하여 0.1 mg/kg가 되도록 처리한 후, 0.1% formic acid가 함유된 MeCN/EA (1:1, v/v) 10 mL로 추출하고 QuEChERS original 염으로 분배 후, 다음의 정제법을 사용하여 추출물을 정제하였다; dSPE의 경우 (1) PSA 정제(PSA 25 mg, MgSO₄ 150 mg), (2) C_{18} 정제(C_{18} 25 mg, MgSO₄ 150 mg), (3) PSA(25)+ C_{18} (25) (PSA 25 mg, C_{18} 25 mg 및 MgSO₄ 150 mg), (4) PSA(50)+ C_{18} (50) (PSA 50 mg, C_{18} 50 mg 및 MgSO₄ 150 mg)이었으며, 상등액 1 mL를 dSPE 튜브에 넣고 혼합하여 정제한 추출액을 MeCN과 1:1 비율로 매질보정하여 회수율을 비교하였다(n=3).

확립된 전처리 조건

마쇄된 현미 시료 5 g을 50-mL 원심분리 튜브에 넣고 물 7 mL를 가하여 15분간 습윤화 한 후 0.1% formic acid가 함유된 MeCN/EA (1:1, v/v) 10 mL를 넣고 Geno/Grinder (1600 Mini-G, SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ, USA)를 사용하여 1,300 rpm에서 2분간 진탕추출하였다. 이후 MgSO₄ 4 g 및 NaCl 1 g를 넣고 1,300 rpm에서 1분간 진탕한 후 원심분리기(M15R, Hanil Scientific, Gimpo, Korea)를 사용하여 3,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 분배하였다. 상등액 1 mL를 취하여 PSA 25 mg, C₁₈ 25 mg 및 MgSO₄ 150 mg이 담긴 dSPE 튜브에 넣고 1분간 섞어준 후, 마이크로원심분리기(1248, Labogene, Lillerød, Denmark)를 이용하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 고형물을 침전시킨 다음 상등액 300 µL를 MeCN 300 µL와 혼합하여 매질보정한 후 LC-MS/MS 1 µL 주입하여 시료 중 ferizome Z, E 이성질체를 각각 분석하였다.

분석법 검증

확립된 분석법의 분석법상 정량한계(method limit of quantitation; MLOQ)를 확인하기 위해 매질보정 표준용액의 신호 대 노이즈 비율(signal to noise ratio; S/N)이 10 이상이 되는 최소 농도를 찾고 해당 농도의 회수율 및 재현성(n=3)을 확인하였다. 검량선의 직선성(linearity)은 1차회귀곡선의 상관계수(correlation coefficient; r^2)로 판단하였다. 회수율 시험을 위해 시료 5 g에 1 및 10 mg/L 혼합표준용액 50 µL를 각각 첨가하여 시료 중 분석성분의 농도가 0.01 및 0.1 mg/kg이 되도록 처리한 후, 상기의 확립된 전처리법으로 농약을 추출하여 MeCN과 1:1 부피 비율로 매질보정한 후, 농도별 회수율을 산출하였다(n=3). 검량선 범위를 초과하는 분석물에 대한 회석 시 정량성을 검증하기 위해 시료 5 g에 200 mg/L 혼합표준용액 50 µL를 첨가하여 시료 중 분석성분의 농도가 2 mg/kg이 되도록 처리한 후, 전처리하여 얻은 추출물 30 µL을 농약 무처리 시료 추출물 270 µL 및 MeCN 300 µL와 혼합하여 매질보정한 다음 회수율을 산출하였다(n=3). Matrix effect는 매질보정 표준용액의 검량선과 용매 표준용액의 검량선의 기울기의 비율로 산출하였으며, 그 값(ME%)은 아래의 수식 (1)을 통해 구하였다.

$$ME(\%) = \left(\frac{\text{매질보정표준용액의 검량선의 기울기}}{\text{용매표준용액의 검량선의 기울기}} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

결과 및 고찰

분석대상성분의 질량분석기 MRM 조건 확립

탠덤질량분석기(tandem mass spectrometer)는 기존의 단일질량분석기(single mass spectrometer)와는 다르게 precursor ion과 product ion을 동시에 선택할 수 있다는 장점이 있다. 이를 활용한 질량분석기의 다중반응모니터링(multiple reaction monitoring; MRM)은 full scan 분석이나 선택이온모니터링(selected ion monitoring; SIM) 대비 향상된 선택성과 감도를 나타내는 것이 특징으로, 농작물을 포함한 다양한 시료에서 MRM을 통한 미량잔류농약분석이 이루어지고 있다[8,9].

본 연구에서는 ferimzone의 최적 MRM 조건을 확립하였다(Table 1). 분석성분 모두 ESI+로 이온화되었으며, 양성자(H⁺)가 adduct로 결합하여 [M+H]⁺의 형태로 이온화하였다. 따라서 precursor ion m/z는 monoisotopic mass보다 1이 큰 255.2으로 각각 확인되었다. Product ion은 ferimzone에서 m/z 132.2, 124.2, 117.1, 91.1 등이 검출되어 EURL-DataPool의 자료와 일치하는 것으로 나타났다(EURL-Data Pool. <https://www.eurl-pesticides-datapool.eu>). 이중 최적 CE에서 감도 및 선택성이 가장 높은 m/z 132.2을 정량이온으로 선정하였고, 정성이온은 m/z 91.1으로 각각 선정하였다.

컬럼 선택에 의한 ferimzone Z 및 E 이성질체의 HPLC 상에서의 물질 분리

Ferimzone은 이중결합에 의한 입체 이성질체가 존재한다(Fig. 1). 이중 유효성분인 Z 이성질체는 광 노출하에 빠르게 E 이성질체로 전환되므로 작물 잔류 분석 시 이를 구분하여 그 잔류량을 결정할 필요가 있다[5]. 입체 이성질체끼리는 product ion이 동일한 패턴으로 생성되므로, MRM을 통한 선택성 확보가 불가하다. 따라서 HPLC를 활용하여 크로마토그램 상 분석물 피크의 분리가 선행되어야 한다. 피크의 분리는 이동상 종류, 이동상의 농도구배 조건 및 시간, 컬럼 온도, 컬럼의 종류 등에 영향을 받는다. 본 연구에서는 신속한 농약 분석을 위해 3.5분에 불과한 농도구배 구간 내에서도 이성질체의 분리가 충분히 진행될 수 있는 조건을 찾고자 하였으며, 두 종류의 컬럼인 Kinetex 및 Cadenza를 선택하여 이성질체 분리 유무를 확인하였다.

Kinetex (2.6 µm, 3 × 100 mm) 컬럼을 사용한 결과 ferimzone Z 및 E 이성질체는 전혀 분리되지 않은 채 하나의 피크로 검출되어 개별 성분의 정량 평가가 불가능하였다(Fig. 2a). 동일 모델의 다른 내경(2.6 µm, 2.1 × 100 mm)에서도

Table 1. Multiple reaction monitoring (MRM) conditions and retention time (t_R) for ferimzone Z and E stereoisomers

Pesticide	t_R	Monoisotopic mass	Ionization type	MRM transition	
				Precursor ion > Product ion (CE, V)	
				Qualifier	Qualifier
Ferimzone Z	1.99	254.2	[M+H] ⁺	255.2 > 132.2 (20)	255.2 > 91.1 (31)
Ferimzone E	2.55	254.2	[M+H] ⁺	255.2 > 132.2 (20)	255.2 > 91.1 (31)

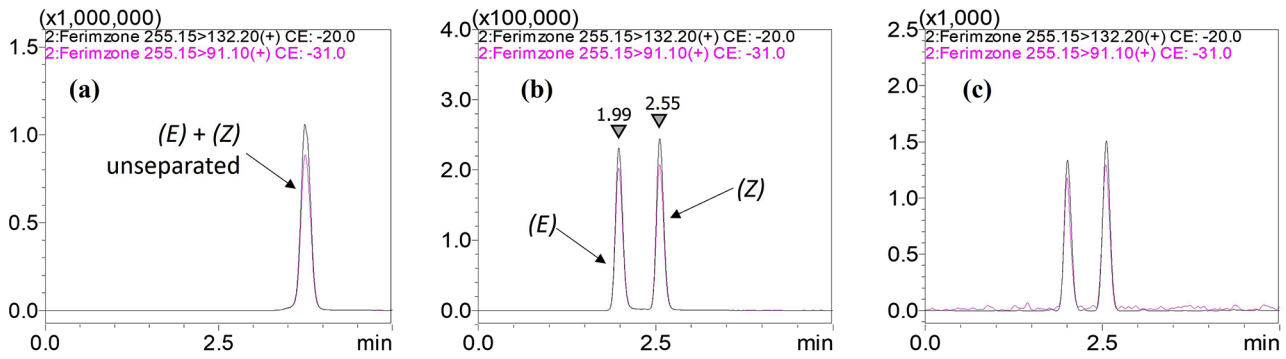


Fig. 2. Chromatograms for the comparative analysis of peak separation for ferimzone Z and E stereoisomers (100 ng/mL each) on (a) Kinetex (2.6 μm , 3 \times 100 mm) and (b) Cadenza columns (3 μm , 2 \times 150 mm), and (c) chromatogram at instrumental limit of quantitation (ILOQ; 1.25 ng/mL) using Cadenza.

비슷한 결과를 얻었다(data not shown). 반면 Cadenza 컬럼(3 μm , 2 \times 150 mm)을 사용하였을 때는 이성질체가 완전히 분리되어 각 피크의 머무름시간(t_R)을 확보할 수 있었다 (Fig. 2b).

컬럼상에서 E형(t_R 1.99 min)이 Z형(t_R 2.55 min) 이성질체보다 먼저 용출되었다. 분자량이 비슷한 물질들은 역상(reverse) 크로마토그래피에서 극성이 높은 물질이 먼저 용출되는 경우가 일반적이다. 이중결합의 sp^2 탄소들과 결합한 치환체들의 배치에 따라 E형이 Z형보다 더 긴 직선의 형태를 띠며(Fig. 1), 따라서 쌍극자 모멘트의 합이 E가 더 크다. 결론적으로 분자 극성은 E형이 Z형보다 더 높으므로 역상 컬럼 내에서 먼저 용출된 것으로 사료된다.

시료의 최적 습윤화 및 용매량 조건

곡류, 두류, 찻잎과 같은 수분 함량이 적은 건고물 중 농약 분석 시에는 전처리 전 충분한 양의 물을 가하여 시료를 습윤화시켜 시료 내부에 존재하는 농약이 용이하게 추출될 수 있도록 유도한다[10-12]. 현미 또한 수분 함량이 적어 시료의 습윤화가 필수적이다. 본 연구에서는 시료량 5 g을 기준으로 물 3, 5, 7, 10 mL를 각각 가하여 QuEChERS 전처리 시 적합한 수분량을 탐색하였다. 물의 부피가 3 mL인 경우 시료의 일부가 습윤화되지 않았으며, 5 mL를 사용하였을 경우 충분한 습윤화가 가능하였으나 QuEChERS 전처리를 통한 분배 시 물

층이 완벽하게 나타나지 않았다(Fig. 3a and b). 액체-액체 분배과정에서 물층은 시료 중 극성 분자와 염을 포함하여 상등액으로부터 이들을 제거하는 역할을 하므로 일정량 필요하다 [13]. 물의 부피가 7 mL 이상이었을 때, 건고물과 물층이 분리되는 모습을 보였다(Fig. 3c and d). 과량의 물이 첨가되면 물에 용해되는 MeCN의 부피가 증가하여 MeCN 상등액의 부피가 감소되며, 따라서 분석성분의 회수율에 영향을 미칠 수 있으므로, 시료 습윤화를 위한 물의 최적 부피는 7 mL로 결정하였다.

최적 추출 및 분배조건 확립

QuEChERS 전처리법은 MeCN를 기본 추출용매로 사용한다[14]. 농약다성분분석법에서는 또한 EA를 용매를 활용하여 다양한 계열의 농약을 동시 추출하기도 하며[15], formic acid를 용매에 첨가하여 분석물질의 추출효율을 높이기도 한다[16]. 최적 추출/분배조건을 확인하기 위해 0.1% formic acid이 포함된 조건에서 MeCN 또는 MeCN/EA (1:1, v/v) 혼합용매 및 QuEChERS 염(Original vs EN15662)의 종류에 따른 ferimzone의 회수율을 비교하였다(Fig. 4, x-z).

처리군 (x), (y), (z)의 평균 회수율($n=3$)은 ferimzone Z에서 각각 90.6 \pm 1.7%, 91.8 \pm 2.8%, 92.3 \pm 3.1%이었으며, ferimzone E에서 각각 86.4 \pm 0.7%, 86.1 \pm 1.8%, 90.9 \pm 1.4%으로 두 성분 모두 (z) 방법에서의 회수율이 가장 높았다. 모든 조건에

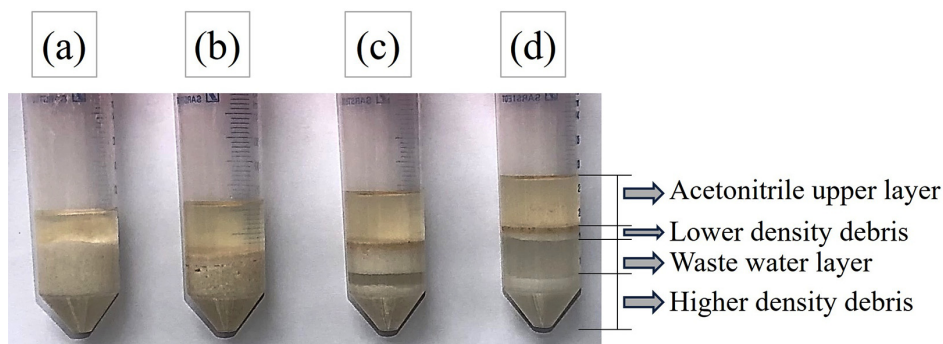


Fig. 3. QuEChERS extraction/distribution results from a 5 g brown rice sample with different water saturation volumes: (a) 3 mL, (b) 5 mL, (c) 7 mL, and (d) 10 mL.

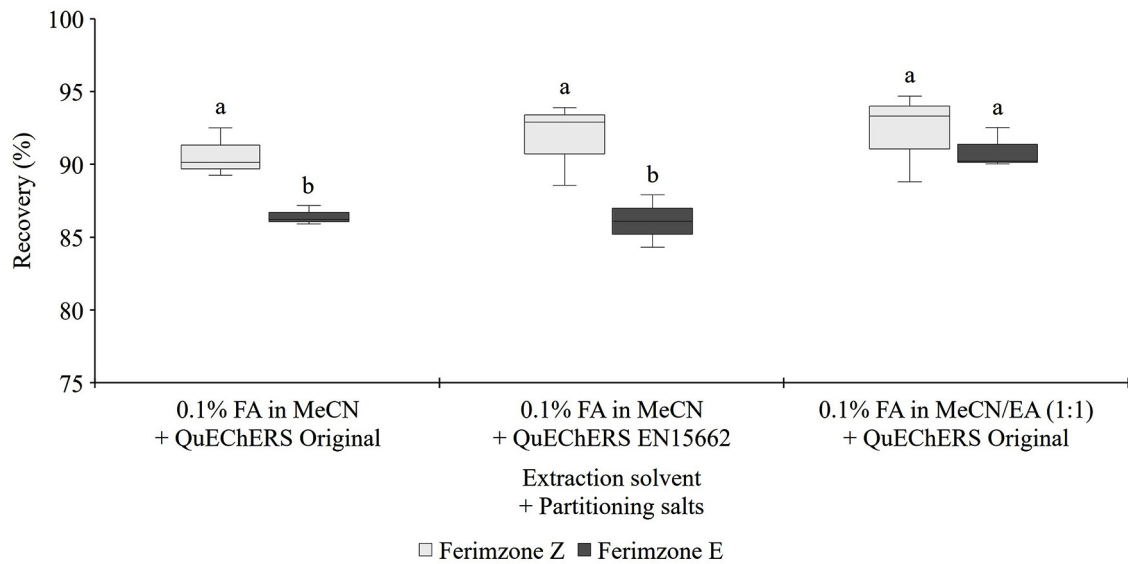


Fig. 4. Boxplot representing the recovery rates ($n=3$) of ferimzone isomers, based on the extraction solvents (where FA stands for formic acid) and QuEChERS distribution salts. Significant differences ($p<0.05$) are indicated by differing letters (a and b) above the boxes.

서 회수율은 70-120%의 허용 범위 이내였으며, 따라서 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 각 처리군들의 유의성을 확인하였다. 분산 분석을 수행하기 위한 전제 조건으로 처리구의 정규성 및 등분산성을 검토하였으며, 각 성분별로 모든 처리구에서 해당 기준을 충족하는 것을 확인하였다. 통계 처리 결과 모화합물인 ferimzone Z (Fig. 3, gray boxes)에서는 각 처리군별 유의미한 차이가 없었으나, ferimzone E (black boxes)의 경우 MeCN/EA 혼합용매를 추출용매로 한 QuEChERS Original 추출/분배법(z)이 MeCN만을 사용한 추출법(x, y) 대비 유의미하게 회수율이 증가하였다($p<0.05$). 따라서 해당 전처리법을 최적 추출/분배법으로 선정하였다.

최적 정제조건 확립

최적 정제조건을 확립하기 위해 앞서 확립한 추출/분배법 (0.1% FA in MeCN/EA (1:1, v/v) + QuEChERS Original)을 거친 추출물에 dSPE의 주요 sorbent인 PSA, C₁₈ 및 PSA+C₁₈을 각각 처리하여 회수율을 비교하였다(Table 2, No. 1-4). 모든 조건에서 회수율은 70-120%의 허용 범위 이내였으며, PSA와 C₁₈를 혼합하여 각각 25 mg 처리할 경우 (No. 3) 두 성분 모두에서 회수율이 가장 높았다(96.9-98.7%).

분산 분석(ANOVA)을 사용하여 각 처리군들의 유의성을 확인하였으며, ferimzone Z에서 No. 3 정제법이 유의미하게 회수율이 가장 높았고, C₁₈ 25 mg만을 사용하였을 경우(No. 2) 회수율이 가장 낮았다($p<0.05$). 현미는 당질(전분)이 70% 이상 차지하고 있어 극성 물질 제거에 유리한 PSA의 사용이 필수적이며, 지질 또한 1-3%로 채소류에 비해 많이 포함되어 있어 비극성 물질 제거에 유리한 C₁₈을 사용하는 것이 좋다 [17]. PSA와 C₁₈만을 처리하는 것보다 두 sorbent를 동시에 처리하는 것이 정제 효율이 좋으나, 처리량을 각각 25 mg에서 50 mg으로 늘릴 경우, 일부 성분이 sorbent에 의해 제거되는 것으로 판단된다. Ferimzone E에서도 명확한 유의성은 나타나지 않았으나, ferimzone Z 회수율 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 PSA 25 mg 및 C₁₈ 25 mg을 혼합 처리한 dSPE를 본 분석법의 최종 정제법으로 선정하였다.

분석법 검증 결과

현미 중 ferimzone의 두 이성질체에 대해 확립된 분석법의 분석법상 정량한계(MLOQ), 검량선의 직선성, 회수율 및 matrix effect를 확인하여 분석법을 검증하였다(Table 3).

MLOQ의 경우 0.01 mg/kg으로 농약 허용물질목록 관리

Table 2. Recovery rates ($n=3$) of ferimzone isomers, based on the dSPE sorbents which are PSA, C₁₈, and PSA+C₁₈

No.	dSPE sorbent	Recovery \pm sd ^{a)} (%)	
		Ferimezone Z	Ferimzone E
1	PSA (25 mg)	92.6 \pm 1.5 bc ^{b)}	94.5 \pm 2.3 ab
2	C ₁₈ (25 mg)	89.2 \pm 0.7 c	93.2 \pm 0.4 b
3	PSA (25 mg) + C ₁₈ (25 mg)	98.7 \pm 1.9 a	96.9 \pm 0.5 a
4	PSA (50 mg) + C ₁₈ (50 mg)	93.9 \pm 1.4 b	93.7 \pm 1.4 ab

^{a)} Standard deviation, ^{b)} Significant differences ($p<0.05$) are indicated by differing letters (a to c).

Table 3. Validation results for ferimzone stereoisomers

Compound	MLOQ (mg/kg)	Linearity (r^2)	Recovery (RSD) (%)			ME (%)
			0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	2 mg/kg	
Ferimzone Z	0.01	0.9998	90.6 (3.9)	95.9 (2.3)	94.9 (2.6)	+6.5
Ferimzone E	0.01	0.9998	92.3 (3.0)	96.5 (1.2)	98.8 (2.2)	-3.1

제도(Positive List System)에 부합하는 최소 분석 농도를 충족하였다. 검량범위 1.25-250 ng/mL에서의 직선성 확인 결과 상관계수(r^2) 0.9998로 검량선은 농도와 크로마토그램 signal 사이의 연관성을 잘 설명하였다. 처리 농도 0.01, 0.1 및 2 mg/kg 상에서의 회수율은 모화합물인 ferimzone Z의 회수율은 90.6-95.9% (RSD \leq 2.6%)이며, ferimzone E의 회수율은 92.3-98.8% (RSD \leq 3.0%)으로 양호한 회수율 및 재현성을 나타내었다.

Matrix effect는 수치화된 값(ME)의 범위에 따라 \pm 20% 이내일 경우 soft effect, -50%에서 -20% 또는 +20%에서 +50%의 범위에서는 medium effect, -50% 미만 또는 +50% 초과 수치에서는 strong effect로 분류한다[18,19]. 특히 soft effect 범위에서는 시료 매질에 의한 영향이 없는 것으로 간주하여, 매질보정 표준용액 대신 용매 표준용액을 사용하여 정량이 가능한 것으로 본다[18,20].

Ferimzone Z 및 ferimzone E의 ME는 각각 +6.5%, -3.1%를 나타내어 soft effect 범위에 해당하며, 따라서 매질에 의한 영향이 없는 것으로 확인되었다. 이는 현미의 70% 이상 차지하는 당류를 QuEChERS 분배과정을 통해 물층으로 용해시켜 버리고 유기용매층의 잔여 당류 및 지방을 PSA 및 C₁₈ sorbent으로 제거하면서 분석에 영향을 미치는 matrix 대부분이 대폭 감소된 것으로 보인다. 본 연구에서는 1종의 현미에 대해서만 matrix effect를 확인하였으나, 실제로 동일 작물일지라도 품종, 생육 환경에 따라 ME 수치가 다른 경우가 있다[20,21]. 따라서 분석법의 견고성(ruggedness)을 확인하기 위해 여러 종의 현미 시료에 대한 추가적인 matrix effect 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 HPLC-MS/MS를 활용하여 현미 중 농약 유효성분인 ferimzone Z 및 환경전환산물인 E 입체이성질체에 대한 동시 분석법을 개발하였다. Cadenza 컬럼을 사용할 경우 10분 미만의 짧은 분석 시간 내에서도 이성질체 분리가 가능하였다. 시료 습윤화를 위해 물 7 mL를 사용하는 것이 가장 이상적이었으며, MeCN 및 EA의 혼합용매를 추출용매로 사용하는 것이 MeCN을 단독 용매로 사용하는 것보다 분석물질의 회수율이 향상됨을 확인하였다. 현미는 당질 및 지질이 풍부한 작물로 이를 제거하기 위해 PSA 및 C₁₈ dSPE sorbent를 사용하는 것이 효율적이었다. 확립된 분석법을 바탕으로 유효성 검증을 수행하여 MLOQ 0.01 mg/kg에서 정확/정밀도가 보장되는 미량잔류분석이 가능함을 확인하였다. 이번 연구

는 ferimzone 이성질체의 개별 정량법에 대한 최초 사례이며, 작물 중 모화합물과 환경전환산물의 전환 비율을 확인하는데 유용하다. 해당 분석법은 농약 살포 방식에 따른 현미 중 ferimzone 잔류량 연구 또는 시중에 유통되는 현미에 대한 ferimzone 잔류 모니터링 등에 활용할 수 있다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ017000)”, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Konishi K, Kuragano T (1989) Fungicidal activity of aromatic ketone pyrimidinylhydrazones. *Journal of Pesticide Science*, 14(2), 211-221. <https://doi.org/10.1584/jpestics.14.211>.
- Okuno T, Furusawa I, Matsuura K, Shishiyama J (1989) Mode of action of ferimzone, a novel systemic fungicide for rice diseases: Biological properties against *Pyricularia oryzae* in vitro. *Phytopathology*, 79(8), 827-832.
- Zhang Y, Li J, Liu X, Gao W, Song S, Rong Y, Tan L, Glukhareva TV, Bakulev VA et al. (2023) Exploration of fungicidal activity and mode of action of ferimzone analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(8), 3705-3718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08504>.
- Matsuura K, Ishida Y, Kuragano T, Konishi K (1994) Development of a new fungicide, ferimzone. *Journal of Pesticide Science*, 19(4), 325-325. https://doi.org/10.1584/jpestics.19.4_325.
- Nagai T (2020) Sensitivity differences among five species of aquatic fungi and fungus-like organisms for seven fungicides with various modes of action. *Journal of Pesticide Science*, 45(4), 223-229.

- <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-035>.
6. Min ZW, Hong S-M, Yang I-C, Kwon H-Y, Kim T-K, Kim D-H (2012) Analysis of pesticide residues in brown rice using modified QuEChERS multiresidue method combined with electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(6), 769-775. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2153-y>.
 7. Saito-Shida S, Nemoto S, Akiyama H (2021) Quantitative and confirmatory analysis of pesticide residues in cereal grains and legumes by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Foods*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.3390/foods10010078>.
 8. Andrade GCRM, Monteiro SH, Francisco JG, Figueiredo LA, Botelho RG, Tornisiello VL (2015) Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato. *Food Chemistry*, 175, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.105>.
 9. Park E, Lee J, Lee HS, Kim J-H, Shin Y (2022) Simple and rapid method for 336 multiresidual pesticide analysis in saliva, determination of their chemical stabilities, and biomonitoring of farmers. *Chemosphere*, 309, 136725. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136725>.
 10. Dušek M, Jandovská V, Olšovská J (2018) Analysis of multiresidue pesticides in dried hops by LC-MS/MS using QuEChERS extraction together with dSPE clean-up. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(3), 222-229. <https://doi.org/10.1002/jib.490>.
 11. Shin YH, Lee JW, Kim J-H (2018) A simultaneous multiresidue analysis for 203 pesticides in soybean using florisil solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Applied Biological Chemistry*, 61(5), 543-548. <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0388-y>.
 12. Huang Y, Shi T, Luo X, Xiong H, Min F, Chen Y, Nie S, Xie M (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>.
 13. Wang L-H, Mei Y-H, Wang F, Liu X-S, Chen Y (2011) A novel and efficient method combining SFE and liquid-liquid extraction for separation of coumarins from *Angelica dahurica*. *Separation and Purification Technology*, 77(3), 397-401. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.12.020>.
 14. 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>.
 15. Sánchez-Brunete C, Albero B, Tadeo JL (2004) Multi-residue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1445-1451. <https://doi.org/10.1021/jf0354646>.
 16. Lee JW, Kim LS, Shin YH, Lee JH, Lee JH, Kim EH, Moon J-K, Kim J-H (2017) Rapid and simultaneous analysis of 360 pesticides in brown rice, spinach, orange, and potato using microbore GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(16), 3387-3395. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00576>.
 17. Choe JS, Ahn HH, Nam HJ (2002) Comparison of nutritional composition in Korean rices. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31(5), 885-892. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2002.31.5.885>.
 18. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR (2011) Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7634-7639. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.033>.
 19. Kmellár B, Fodor P, Pareja L, Ferrer C, Martínez-Uroz MA, Valverde A, Fernandez-Alba AR (2008) Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1215(1), 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.121>.
 20. Kim S-H, Lee Y-H, Jeong M-J, Gwon D-Y, Lee J-H, Shin YH, Choi H (2023) LC-MS/MS method minimizing matrix effect for the analysis of bifenthrin and butachlor in Chinese chives and its application for residual study. *Foods*, 12(8), 1683. <https://doi.org/10.3390/foods12081683>.
 21. Damale RD, Dutta A, Shaikh N, Pardeshi A, Shinde R, Babu KD, Gaikwad NN, Banerjee K (2023) Multi-residue analysis of pesticides in four different pomegranate cultivars: Investigating matrix effect variability by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 407, 135179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135179>.