

## Development and validation of an analytical method for the determination of lepidimectin residues by HPLC-PDA

Jung-Ah Do<sup>1</sup>, Ji-Eun Kwon<sup>1</sup>, Mi-ra Kim<sup>2</sup>, Eun-mi Lee<sup>2</sup>, Ju-hee Kuk<sup>3</sup>,  
Kisung Kwon<sup>4</sup> and Jae-Ho Oh<sup>1</sup>, ★

<sup>1</sup>Food Chemical Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,  
KFDA, Osong, Cheongwon, Chungbuk 363-700, Korea

<sup>2</sup>Daejeon Regional KFDA, Daejeon 302-828, Korea

<sup>3</sup>Gwangju Regional KFDA, Gwangju 500-480, Korea

<sup>4</sup>Busan Regional KFDA, Busan 608-080, Korea

(Received November 21, 2012; Revised January 22, 2013; Accepted March 5, 2013)

## HPLC-PDA를 이용한 lepidimectin 잔류량 분석법 개발 및 확인

도정아<sup>1</sup> · 권지은<sup>1</sup> · 이은미<sup>2</sup> · 김미라<sup>2</sup> · 국주희<sup>3</sup> · 권기성<sup>4</sup> · 오재호<sup>1</sup>, ★

<sup>1</sup>식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 화학물질과

<sup>2</sup>대전지방식품의약품안전청 유해물질분석과

<sup>3</sup>광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

<sup>4</sup>부산지방식품의약품안전청 시험분석센터

(2012. 11. 21. 접수, 2013. 1. 22. 수정, 2013. 3. 5. 승인)

**Abstract:** A new, rapid, and simple analytical method was developed and validated using high performance liquid chromatograph-photodiode array detector (HPLC-PAD) for the determination of lepidimectin residues in agricultural commodities. The lepidimectin residues in samples were extracted with methanol, partitioned with dichloromethane, and then purified with glass column filled with subsequently to aminopropyl (NH<sub>2</sub>) solid phase extraction (SPE) cartridge. The purified samples were detected using HPLC-PAD. Correlation coefficient (R<sup>2</sup>) of both lepidimectin A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub> solutions were 0.9999. The method was validated using cucumber spiked with lepidimectin at 0.02 and 0.2 mg/kg and pepper, mandarin, hulled rice, potato, soybean at 0.02 and 0.5 mg/kg. Average recoveries were 76.0~114.8% with relative standard deviation less than 10%, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.005 and 0.01 mg/kg, respectively. The result of recoveries and overall coefficient of variation of a laboratory results in Gwangju regional KFDA and Daejeon regional KFDA was followed with Codex guideline (CAC/GL 40). Therefore, developed method in this study is accurate, rapid, and appropriate for lepidimectin determination and will be used to keep safety of lepidimectin residues in agricultural products.

**요 약:** Milbemycin계 속효성 살충제인 lepidimectin의 국내 잔류허용기준이 신설 고시됨에 따라 농산물 중 lepidimectin 잔류량을 측정하기 위해 고성능 액체크로마토그래프를 이용한 신속, 정확한 분석법을 개발하

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-4207 Fax : +82-(0)43-719-4200

E-mail : jado@korea.kr

였다. Lepidectin 잔류물은 메탄올로 추출하여 포화식염수와 디클로로메탄을 이용한 액액분배를 수행하였고, 플로리실로 충전한 유리칼럼 및 아미노프로필 카트리지를 이용하여 두 번의 정제 과정을 거친 후 HPLC-PAD (High performance liquid chromatograph-photodiode array detector)를 통해 기기분석을 수행하였으며, LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer)로 재확인하였다. Lepidectin 표준품의 직선성은 lepidectin A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> 모두에서 상관계수(R<sup>2</sup>)가 0.9999로 우수하였다. 개발한 분석법으로 오이, 고추, 현미, 감귤, 감자, 대두에 대한 lepidectin의 회수율을 측정된 결과, 76.0~114.8% 범위로 10% 미만의 표준오차를 나타내었으며, 분석법의 검출한계는 0.005 mg/kg, 정량한계는 0.01 mg/kg이었다. 또한 광주지방식약청, 대전지방식약청의 분석법 검증 결과, 각각 70.3~108.8%, 80.5~95.6%의 회수율과 10% 미만의 표준 오차를 나타내었다. 분석법에 대한 각 실험실의 회수율과 표준오차 및 실험실간 표준 오차(RSD<sub>R</sub>; Relative Standard Deviation on Reproducibility)는 코덱스 기준(CAC/GL 40)에 적합함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 분석법은 lepidectin 잔류물의 안전관리를 위한 최적의 분석법으로 판단된다.

**Key words:** lepidectin, HPLC-PDA, agricultural commodities, LOD, LOQ

## 1. 서 론

Lepidectin은 2010년 일본 Mitsui Chemical Agro, Inc에서 개발한 macrocyclic lactone, 밀베마이신(Milbemycin)계 속효성 살충제로서 접촉독, 섭식독으로 나방, 총채벌레, 잎굴파리 등의 응애류를 방제한다. Lepidectin이 식품에 존재할 수 있는 형태는 lepidectin A<sub>3</sub>(E-241)와 lepidectin A<sub>4</sub>(E-909)의 두 형태이며(Fig. 1), 화학식은 C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>10</sub>(6'-methyl)과 C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>10</sub>(6'-ethyl)이다. 분자량은 각각 705.83, 719.86으로 lepidectin A<sub>4</sub>가 major component, lepidectin A<sub>3</sub>가 minor component이다. Lepidectin의 물리화학적 특징을 살펴보면 n-octanol/water 분배계수(logP<sub>ow</sub>, 25 °C)가 lepidectin A<sub>3</sub>는 6.5이고 lepidectin A<sub>4</sub>는 7.0으로 비극성 화합물의 특성을 나타낸다. Lepidectin과 동일한 밀베마이신(Milbemycin)계 농약에는 밀베멕틴(Milbemectin), 밀베마이신 옥심(Milbemycin oxime), 아바멕틴(Abamectin) 등이 있고 밀베멕틴과 아바멕틴은 기존의 식품공전에 단성분 분석법(individual residue methods)으로 등재되어 있으며,<sup>1</sup> 또한 살응애제로 쓰이는 농약으로 크로펜테진(Clofentazine), 프로파자이트(Propargite) 등은 단성분 분석법이 식품공전에 각각 제시되어 있다.<sup>2</sup> 시중에 유통되는 lepidectin 유제는 미생물의 대사과정에서 얻어진 자연농약의 유도체로 분해속도가 빠르고 인체독성이 낮다.<sup>3</sup> Lepidectin에 대한 JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 국제잔류농약전문위원회)의 독성평가는 아직 이루어지지 않았지만, 국내에서 수행한 lepidectin에 대한 독성평가 결과, 만성독성은 나타났으나 급성독성, 변식독성, 발암

성, 기형독성은 없는 것으로 평가되었으며,<sup>4</sup> 현재 한국(2011년)과 일본(2009년)에서 0.02 mg/kg b.w./day의 동일한 ADI (Acceptable daily intake, 일일섭취허용량)가 설정되어 있다.<sup>5</sup> Lepidectin 잔류에 대한 Codex (Codex Alimentarius Commission, 국제식품규격위원회) 기준은 아직 없으나, 고추와 오이에 대한 lepidectin의 국내 잔류허용기준이 각각 0.5 mg/kg, 0.2 mg/kg으로 신설되어 고시되었고(식품의약품안전청 고시 제2011-23호) 또한, 2011년 국내에서 처음으로 lepidectin을 유효 성분으로 한 원예용 살충제가 시판됨에 따라 국내 유통 농산물의 안전한 관리를 위해 lepidectin 잔류량을 측정할 수 있는 신속하고 정확한 분석법이 필요하여 본 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 재료

Lepidectin 표준품 A<sub>3</sub>(98.14%)와 A<sub>4</sub>(99.27%)는 (주)동부한농에서 제공받아 사용하였고, HPLC grade의 methanol, dichloromethane, ethyl acetate, hexane, acetonitrile 등 용매는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. Florisil은 Fluka (St. Louis, Mo, USA)로부터, SPE-NH<sub>2</sub> 카트리지(6 cc, 1 g)는 Waters (U.S. Silica corporation, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 검체는 국내 유통 중인 고추, 오이, 감귤, 감자, 현미, 대두를 구입하여 균질화한 후 -50 °C에서 보관하여 사용하였다. 표준원액은 lepidectin 표준품 A<sub>3</sub>, 12.77 mg을 methanol 25 mL에 용해하고, 표준품 A<sub>4</sub>, 12.59 mg을 methanol 25 mL에 용해하여 500 µg/mL

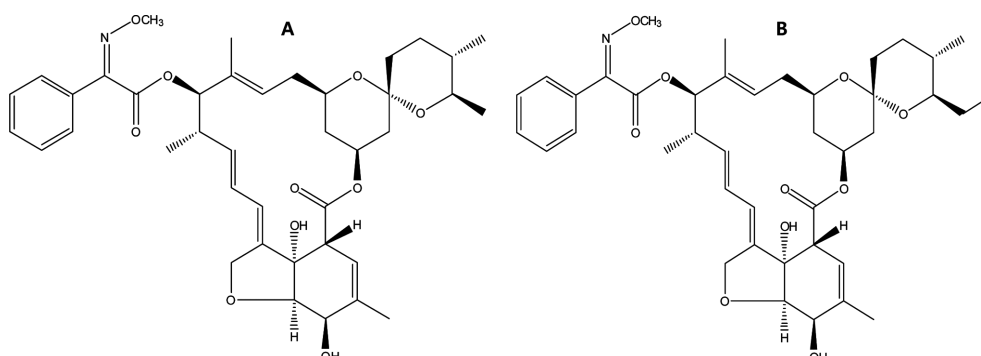


Fig. 1. Structure of lepimectin A<sub>3</sub>(A) and lepimectin A<sub>4</sub>(B).

(500 ppm)으로 제조하였으며, 이를 methanol로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 µg/mL의 표준용액을 제조하여 실험에 사용하였다.

## 2.2. 추출 및 정제

검체 20 g에 methanol 100 mL를 가하여 추출한 후 부흐너 깔때기로 흡인여과하였으며, methanol 40 mL로 씻어내려 상기 여액과 합친 후 1-L 분액깔때기에 옮겼다. 여기에 포화식염수 50 mL, distilled water 450 mL, dichloromethane 50 mL를 가한 후 5분간 진탕하고 유기용매층을 sodium sulfate anhydrous 15 g에 통과시켜 탈수하였고, 위의 과정을 2회 반복하여 등근 플라스크에 취한 후 감압 농축하였다. 곡류, 콩류 등 지방성 검체의 경우 상기 건고물을 acetonitrile 포화 hexane 50 mL로 녹이고 500 mL 분액깔때기로 옮기고 hexane 포화 acetonitrile 50 mL로 2회 분배 추출하여 acetonitrile층을 40 °C 이하 수욕상에서 감압 농축하였다.<sup>6,7</sup> 농축하여 건고한 검체를 dichloromethane 10 mL로 용해하여 정제과정에 사용하였으며, 고추와 같이 불순물이 많은 시료는 syringe filter (PTFE, 0.45 µm)로 여과한 후 사용하였다. Florisil 5 g과 2 cm 높

이의 sodium sulfate anhydrous를 충전한 glass column을 dichloromethane 50 mL로 활성화시킨 후 dichloromethane 10 mL로 용해한 용액을 loading하였다. 이를 ethyl acetate/dichloromethane 혼합액(10/90, v/v) 50 mL로 씻어내고, methanol/ethyl acetate 혼합액(0.5/99.5, v/v) 50 mL로 용출시켜 받은 후 40 °C 이하에서 감압 농축하였다. 이를 hexane 10 mL로 용해하고 hexane 10 mL로 활성화한 SPE-NH<sub>2</sub> 카트리지에 loading하였다. 이를 toluene 5 mL를 가하여 씻어내고 dichloromethane 10 mL와 acetone/dichloromethane 혼합액

Table 1. HPLC-PDA operating conditions for the determination of lepimectin residues

Instrument	HPLC-PDA (Waters Alliance, USA)
Column	Capcell Pak C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm i.d, 5 µm, Shiseido, Japan)
Mobile phase	Water/acetonitrile (30/70, v/v)
Column temperature	40 °C
Wavelength	245 nm
Injection volume	30 µL
Flow rate	1 mL/min

Table 2. LC-MS conditions for the determination of lepimectin residues

Instrument	UPLC-MS (Quattro Premier XE, Waters, USA)
Column	Acquity UPLC™ Beh C <sub>18</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)
Flow	0.2 mL/min A/B (10/90, v/v)
Mobile phase	A: 5 mM ammonium formate + 0.1% formic acid in water B: 5 mM ammonium formate + 0.1% formic acid in acetonitrile/water (90/10, v/v)
Column temperature	40 °C
Ionization mode	ESI positive-ion mode
Cone voltage	50 V
Injection volume	10 µL

(20/80, v/v) 10 mL를 차례로 용출하여 받아 40 °C 이하 수욕상에서 감압 농축한 후 water/methanol 혼합액 (30/70, v/v) 2 mL로 재용해하여 시험용액으로 사용하였다.

### 2.3. 기기분석

Lepimectin 분석을 위해 HPLC-PAD (High performance liquid chromatograph-photodiode array detector)를 사용하였으며, 최대흡수파장이 245 nm로 확인되어 이를 분석 파장으로 선택하여 분석하였다. Table 1에 기기 분석 조건을 나타내었으며, 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC-MS (Liquid chromatograph-mass spectrometer)을 이용하여 Table 2에 나타낸 기기분석 조건에서 재확인 과정을 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. HPLC 분석조건 확인

Lepimectin에 대한 최적 분석 파장을 선택하기 위해서 210 nm에서 400 nm까지 HPLC-PDA로 스캔한 결과, 245 nm가 최대흡수파장( $\lambda_{max}$ )으로 확인되어 이를 분석파장으로 선택하였다(Fig. 2). 또한 이동상인 water와 acetonitrile 혼합용매의 비율을 달리하여 lepimectin에 대한 분리능과 머무름 시간을 비교한 결과, 30/70 (v/v)의 isocratic 조건에서 lepimectin 이성질체의 우수한 분리능을 확인할 수 있었으며, lepimectin A<sub>3</sub>는 17 분대, lepimectin A<sub>4</sub>는 22 분대의 안정적인 머무름 시간을 확인할 수 있었다.

### 3.2. 추출, 분배 및 정제과정의 확립

동일한 macrocyclic lactone계 농약인 abamectin과 milbemectin에 대한 시험법은 식품공전 제 10. 일반 시험법 중 식품 중 잔류농약 분석법의 다성분 분석법 4-1-3-12에 제시되어 있다. 본 연구에서는 같은 계열의 농약인 lepimectin이 이들과 비슷한 물리화학적 특성을 가질 것으로 판단되어 abamectin과 milbemectin에 높은 효율을 보인 methanol을 동일한 추출용매로 선택하였다. 또한 lepimectin이 비극성인 특성을 고려하여 분배 시 dichloromethane을 이용하여 수용층에 존재하는 극성의 간섭물질을 제거하였다. 제 1 정제 과정에서는 glass column을 이용하여 magnesia (MgO)와 silica (SiO<sub>2</sub>)를 혼합하여 제조한 합성 흡착제로서 유지 및 색소의 비용출성이 우수하고 극성물질을 넓은 범위에서 흡착할 수 있는 florisil을 사용하였다. Lepimectin의 n-octanol/water 분배계수(logP<sub>ow</sub>, 25 °C)가 lepimectin A<sub>3</sub>는 6.5이고 A<sub>4</sub>는 7.0의 비극성 물질임을 고려하여 용출용매 선택 시 비극성 정도를 증가시키면서 확인한 결과, methanol/ethyl acetate 혼합액 0.5/99.5 (v/v)의 비율에서 가장 높은 효율을 나타내었다. 제 2 정제과정으로 약산성의 물질을 잘 흡착하는 성격을 가진 SPE-NH<sub>2</sub> 카트리지를 선택하였는데, 이는 NH<sub>2</sub> 카트리지가 산성의 특성을 가지는 lepimectin을 강하게 흡착하여 효율적 정제가 가능하다고 판단되었기 때문이다. 두 번째 정제과정에서 용매 선택에서도 lepimectin이 비극성에 가까운 물질임을 고려하여 용매의 극성도를 순차적으로 조절하여 acetone/dichloromethane 20/80 (v/v)을 최종 용출 용매로 선

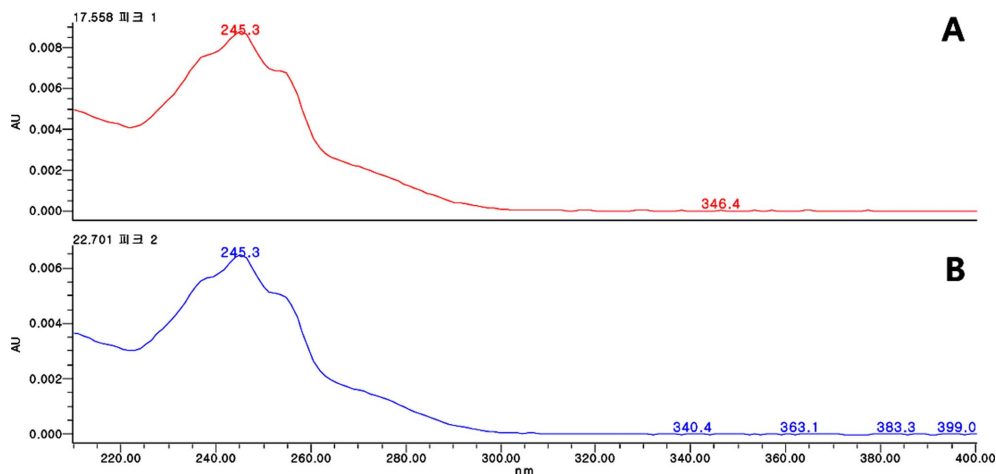


Fig. 2. HPLC-PDA spectrum of lepimectin A<sub>3</sub>(A) and A<sub>4</sub>(B).

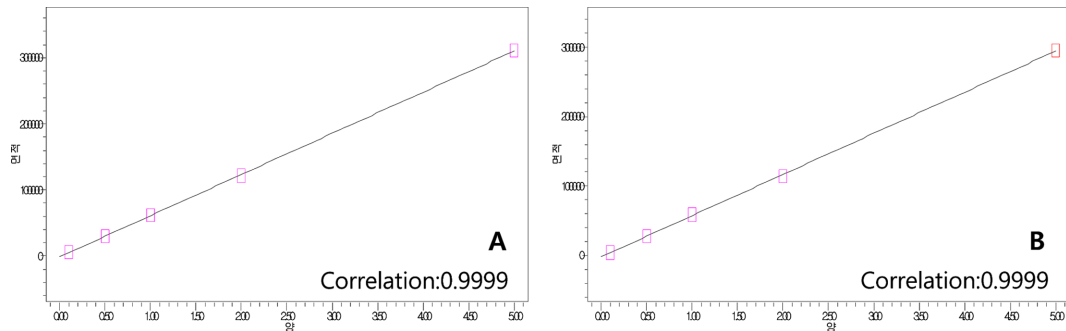


Fig. 3. Calibration curve of lepimectin A<sub>3</sub>(A) and A<sub>4</sub>(B) standard solution.

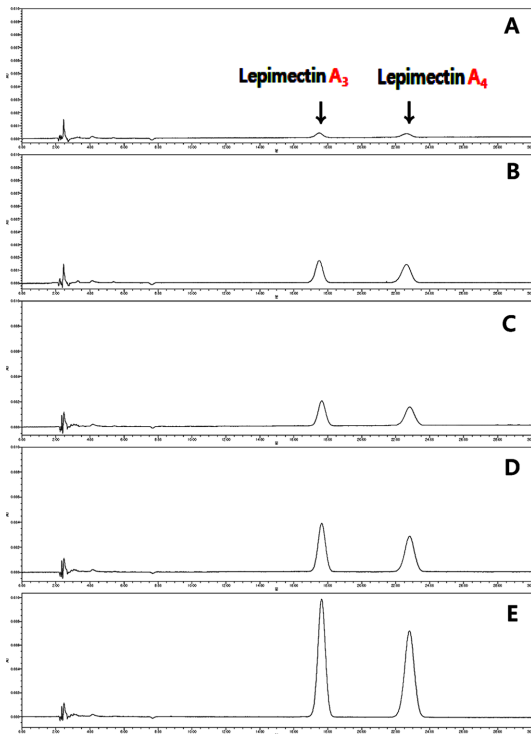


Fig. 4. Chromatogram of lepimectin standard at A; 0.1 mg/kg, B; 0.5 mg/kg, C; 1.0 mg/kg, D; 2.0 mg/kg, E; 5.0 mg/kg.

택하였다.

### 3.3. 표준곡선의 직선성 및 상관계수

Methanol로 희석하여 제조한 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 표준용액을 위에서 제시한 HPLC 분석조건으로 측정 한 결과, 표준곡선의 상관계수( $R^2$ )는 lepimectin A<sub>3</sub>, lepimectin A<sub>4</sub> 모두 0.9999로 양호한 직선성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 3, 4).

### 3.4. 검출한계와 정량한계

본 연구에서 확립한 분석조건에서의 lepimectin에 대한 분석기기의 검출한계(LOD, Limit of Detection)와 정량한계(LOQ, Limit of Quantitation)를 구하였다. 검출한계는 최소 검출량이 1.5 ng (S, signal/N, Noise=3) 이었고 아래의 계산식에 따라 0.005 mg/kg으로 나타났다, 정량한계는 최소 검출량이 6 ng (S/N=10)으로 아래의 계산식에 따라 0.02 mg/kg으로 나타났다. 국내 정량한계 범위는 국제기준을 수용하고 있으며, 유럽연합에서 규정하고 있는 분석법의 정량한계 기준에 따르면 본 시험법의 정량한계인 0.02 mg/kg이 국제 기준에 적합함을 확인할 수 있었다.<sup>8</sup>

$$\text{LOD 및 LOQ(mg/kg)} = \frac{[\text{최소검출량(ng)}]}{[\text{주입량}(\mu\text{L})]} \times \frac{[\text{최종희석부피(mL)}]}{[\text{시료량(g)}]}$$

### 3.5. 분석법 확립을 위한 회수율 확인

분석법의 정확성과 재현성 및 효율성을 확인하기 위해 국내 잔류허용기준이 각각 0.5 mg/kg, 0.2 mg/kg으로 신설 고시된 고추, 오이를 포함하여 농산물 대표 시료인 곡류 중 현미, 과일류 중 감귤, 서류 중 감자, 콩류 중 대두에 대해 본 연구에서 개발한 분석법에 의한 회수율 실험을 수행하였다. 실험에 적용한 모든 시료에서 lepimectin의 머무른 시간대에 방해 peak가 존재하지 않아 본 분석법은 방해물질에 대한 간섭을 받지 않는 것으로 확인되었으며(Fig. 5), 이러한 결과는 lepimectin 회수율에 영향을 주지 않으면서 방해물질을 제거할 수 있는 최적의 2회 clean-up 과정을 선택하였기 때문이라고 판단된다. 측정 결과, 76~114.8% 범위의 회수율과 9.4 미만의 분석오차를 나타냄으로써(Table 4) 코텍스 가이드라인(CAC/GL 40)인 회수율 70~120%, 분석오차 10 미만에 적합함을 보여주었다.<sup>9</sup>

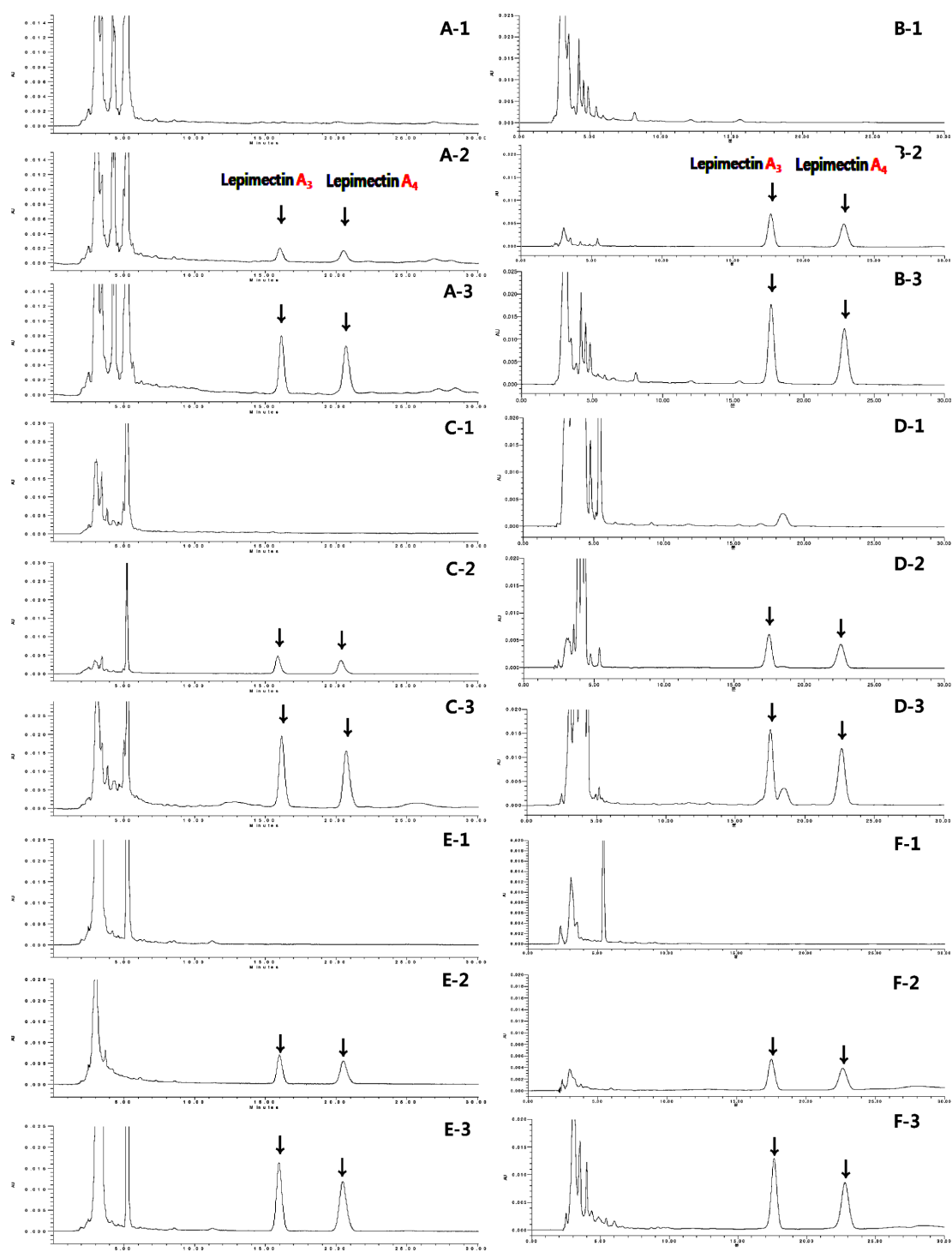


Fig. 5. Chromatograms of cucumber A-1; control, A-2; at 0.02 mg/kg, A-3; 0.2 mg/kg, pepper B-1; control, B-2; at 0.02 mg/kg, B-3; 0.5 mg/kg, hulled rice C-1; control, C-2; at 0.02 mg/kg C-3; 0.5 mg/kg mandarin D-1; control, D-2; at 0.02 mg/kg D-3; 0.5 mg/kg potato E-1; control, E-2; at 0.02 mg/kg E-3; 0.5 mg/kg, soybean F-1; control, F-2; at 0.02 mg/kg F-3; 0.5 mg/kg.

### 3.6. LC-MS를 이용한 분석법의 재확인

LC-MS 분석은 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 정확한 정성확인을 가능하게 한다.<sup>10,11</sup> 따라서 본 연구에서 개발한 분석법에 대한 신뢰성과 lepimectin에 대한 선택성을 검증하기 위해 LC-MS를 이용하여 Table 2의 조건에서 분석법을 재확인하였다. 주요 특성이온의 m/z값은 lepimectin A<sub>3</sub>는 728, 549, A<sub>4</sub>는 743, 563으로 그 값은 Table 3에 나타내었다. Lepimectin의 full scan mass spectrum 분석 결과 정량을 위해

Table 3. Selected ion of LC-MS for lepimectin

Component	Retention time (min)	Exact mass	Fragment monitored (m/z)
Lepimectin A <sub>3</sub>	6.0	705	728, 549
Lepimectin A <sub>4</sub>	6.5	719	743, 563

Table 4. Results of recovery for lepimectin residues

Sample	Spiked Conc. (mg/kg)	Recovery* (%) ± RSD		
		A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	Total
Cucumber	0.02	112.6±6.8	117.0±3.7	114.8±5.3
	0.2	93.9±3.7	97.7±4.0	95.8±3.9
Pepper	0.02	73.5±6.0	78.4±7.1	76.0±6.6
	0.5	78.9±4.1	74.6±2.7	76.8±3.4
Hulled rice	0.02	87.8±1.0	84.8±4.8	86.3±2.9
	0.5	93.6±4.0	91.5±4.3	92.6±4.2
Mandarin	0.02	80.5±8.5	103.7±10.2	92.1±9.4
	0.5	85.0±5.8	73.8±4.2	79.4±5.0
Potato	0.02	84.2±6.6	92.4±8.9	88.3±7.8
	0.5	89.1±2.0	81.3±1.6	85.2±1.8
Soybean	0.02	116.9±3.1	103.7±1.8	110.3±2.5
	0.5	116.9±0.8	109.6±0.5	113.2±0.7

\*Mean values of triplicates with relative standard deviation.

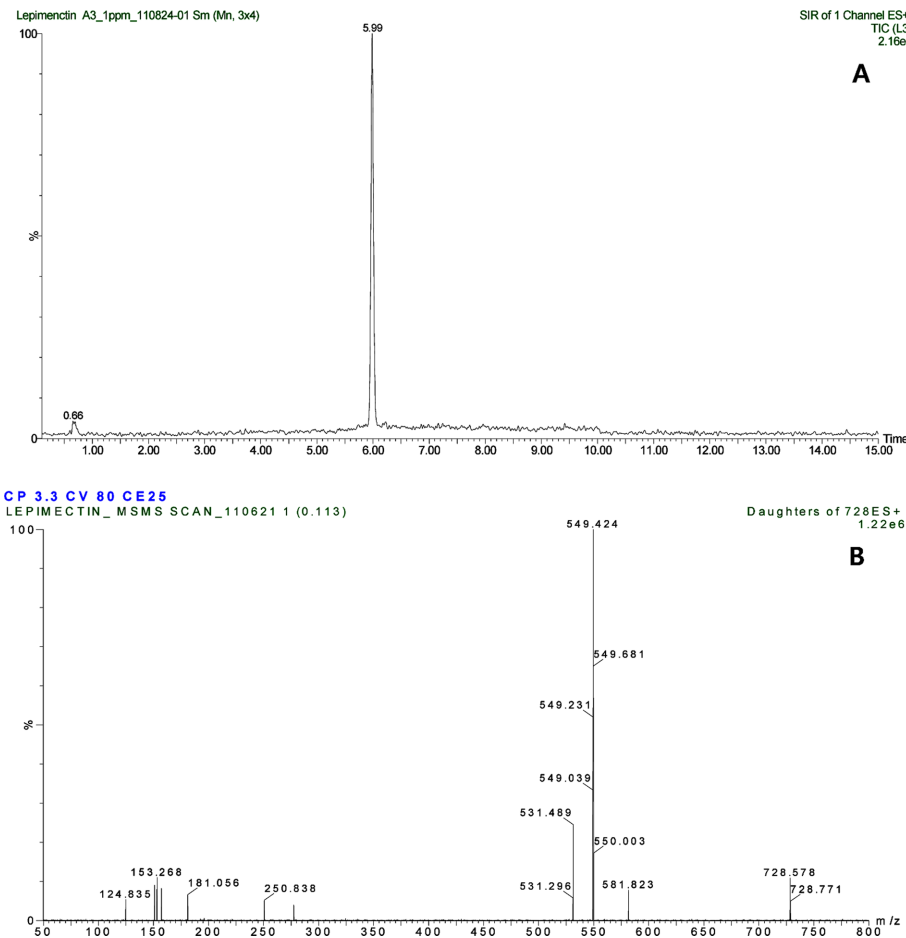


Fig. 6. A; Total ion chromatogram and B; ms spectrum of lepimectin A<sub>3</sub>.

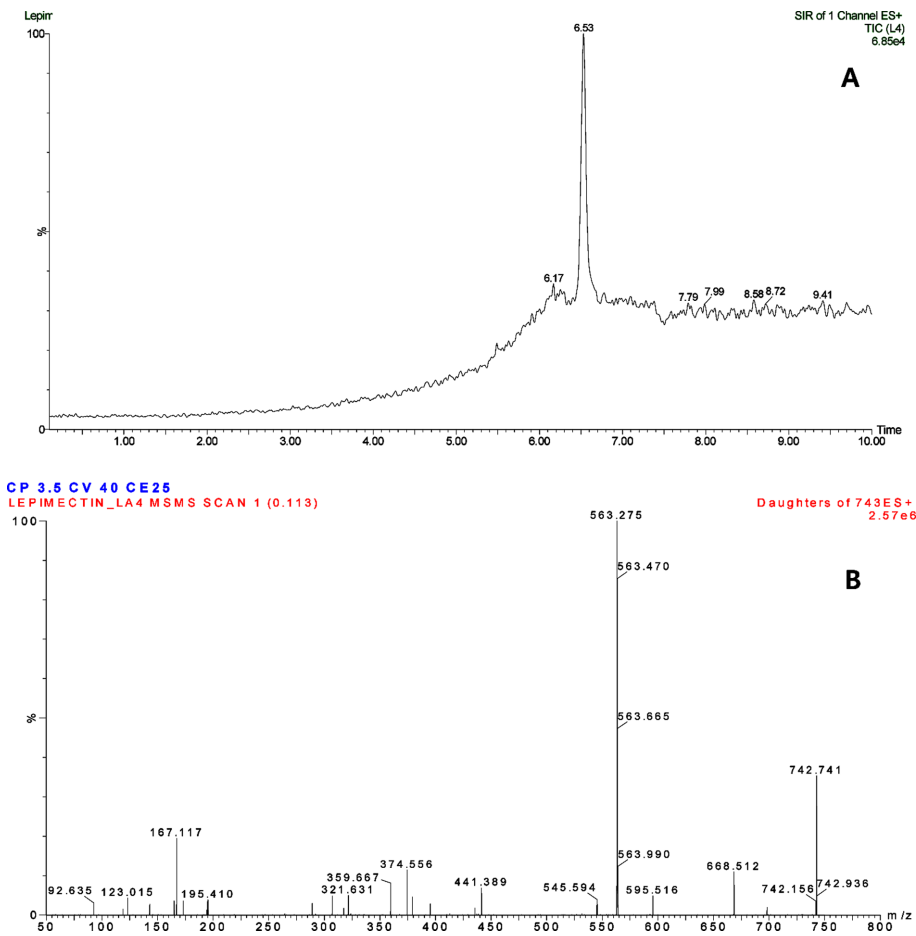


Fig. 7. A; Total ion chromatogram and B; ms spectrum of lepidectin A<sub>4</sub>.

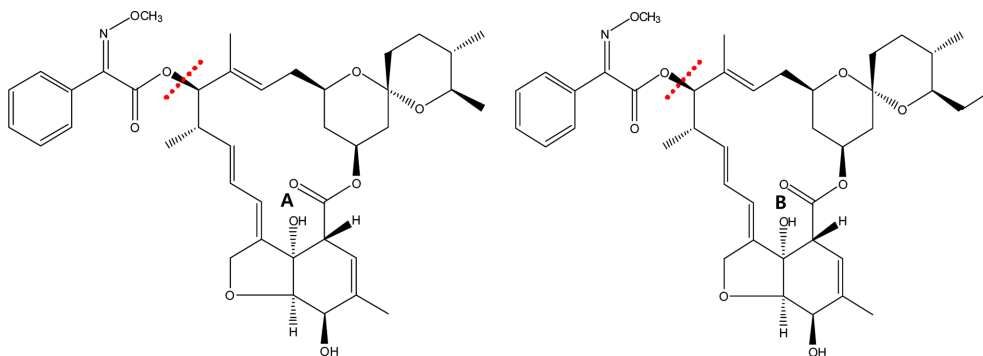


Fig. 8. Fragmentation of lepidectin A<sub>3</sub>; m/z 728 → 549 (A) and lepidectin A<sub>4</sub>; m/z 743 → 563 (B).

lepidectin A<sub>3</sub>는 m/z 549이 lepidectin A<sub>4</sub>는 563이 최적화됨을 알 수 있었다. 따라서 각각 728 → 549, 743 → 563을 정량 이온, 728 → 531, 743 → 167을 재확인 이온으로 선정하였다(Fig. 6, 7). 이때 fragment ion

은 전자 전이에 의한 탄소와 산소 사이의 단일결합이 끊어지면서 생성된 것으로 예측된다(Fig. 8). 본 분석 조건에 의한 머무름 시간은 lepidectin A<sub>3</sub>는 6.0분대, lepidectin A<sub>4</sub>는 6.5분대였으며, 회수를 확인 결과 고

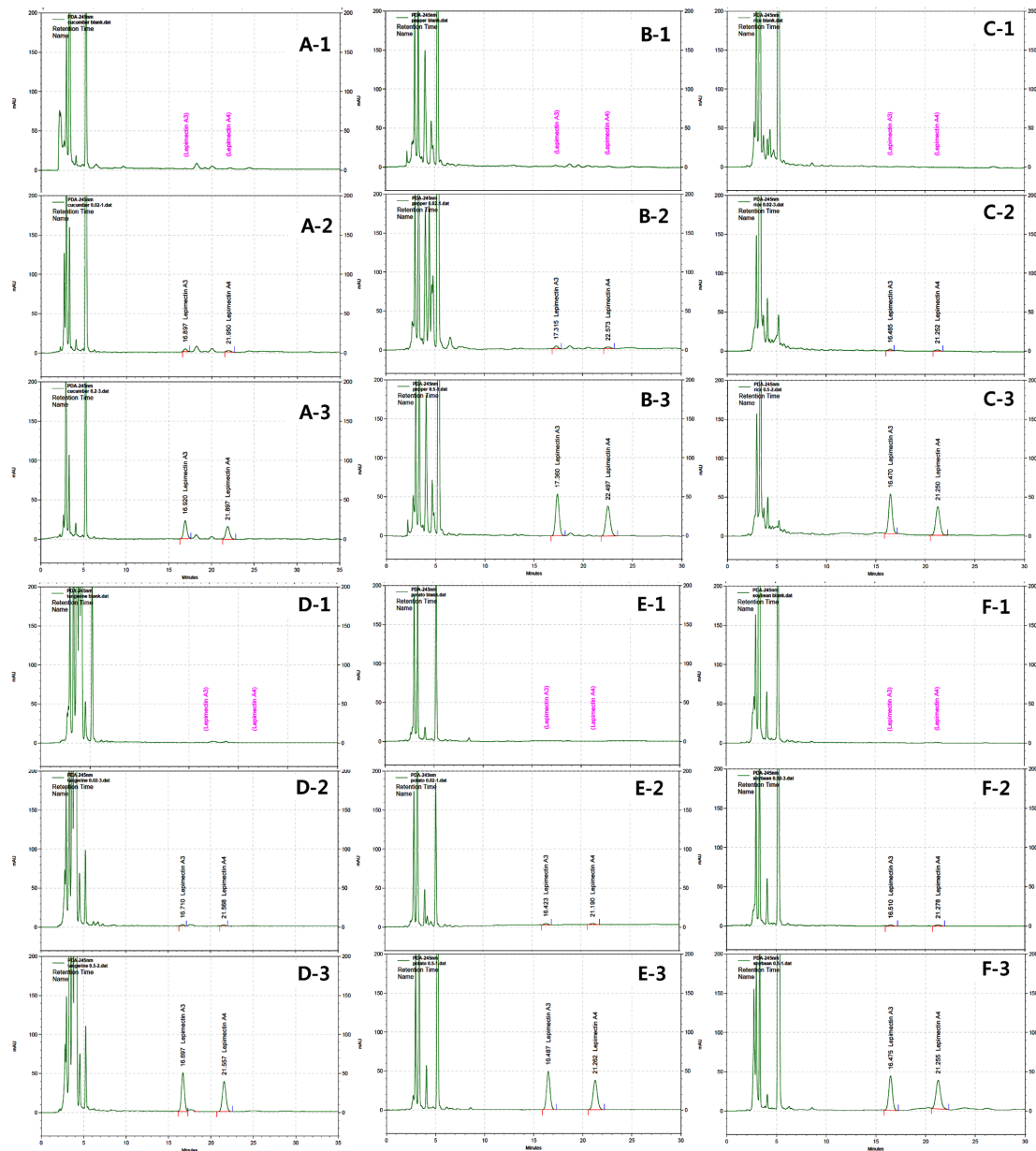


Fig. 9. Chromatograms of cucumber A-1; control, A-2; at 0.02 mg/kg, A-3; 0.2 mg/kg, pepper B-1; control, B-2; at 0.02 mg/kg, B-3; 0.5 mg/kg, hulled rice C-1; control, C-2; at 0.02 mg/kg C-3; 0.5 mg/kg, mandarin D-1; control, D-2; at 0.02 mg/kg D-3; 0.5 mg/kg, potato E-1; control, E-2; at 0.02 mg/kg E-3; 0.5 mg/kg, soybean F-1; control, F-2; at 0.02 mg/kg F-3; 0.5 mg/kg (Kwangju regional KFDA).

추, 오이, 현미, 감귤, 감자 및 대두의 모든 검체에서 본 시험법에 대한 신뢰성을 확보할 수 있었다.

### 3.7. 분석법 검증

본 연구에서 개발한 시험법의 실험실간 편차(RSD<sub>R</sub>;

Relative standard deviation on reproducibility) 즉, 재현성을 확인하기 위하여 광주청, 대전청 2개의 각 지방식약청에서 시험법 검증을 실시하였다. 동일한 시험법으로 고추, 오이를 포함하여 현미, 감귤, 감자, 대두에 대한 회수율을 측정된 결과(Fig. 9, 10), 70.3~108.8%

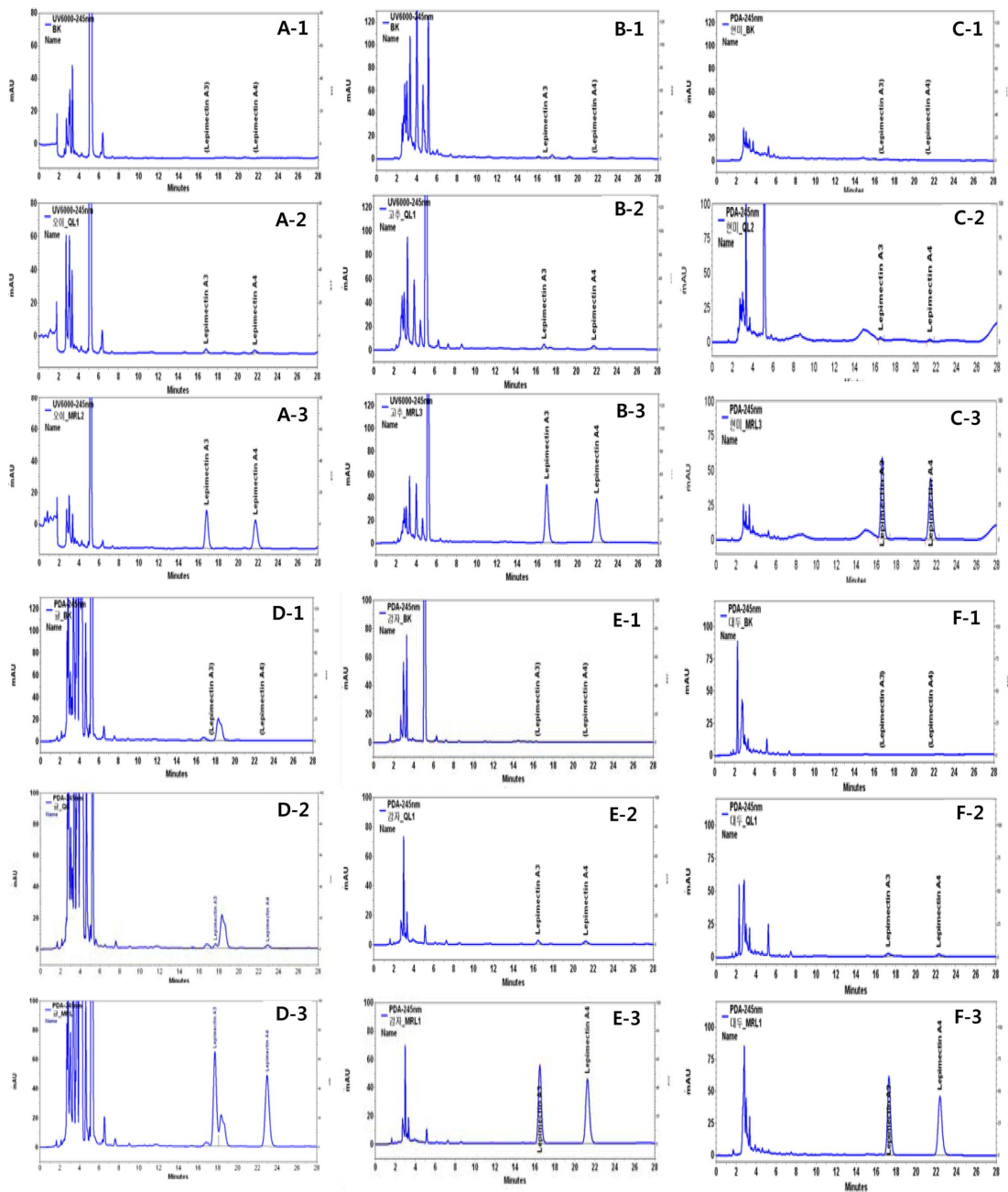


Fig. 10. Chromatograms of cucumber A-1; control, A-2; at 0.02 mg/kg, A-3; 0.2 mg/kg, pepper B-1; control, B-2; at 0.02 mg/kg, B-3; 0.5 mg/kg, hulled rice C-1; control, C-2; at 0.02 mg/kg C-3; 0.5 mg/kg, mandarin D-1; control, D-2; at 0.02 mg/kg D-3; 0.5 mg/kg, potato E-1; control, E-2; at 0.02 mg/kg E-3; 0.5 mg/kg, soybean F-1; control, F-2; at 0.02 mg/kg F-3; 0.5 mg/kg (Daejeon regional KFDA).

(광주청), 80.5~95.6%(대전청)의 회수율과 10% 미만의 분석오차를 보였다(Table 5, 6). 코텍스 가이드라인 (CAC/GL 40)에서는  $RSD_R(\%)$ 가  $>0.01$  mg/kg,  $\leq 1$

mg/kg범위의 농도에서 32% 이하,  $>0.1$  mg/kg 농도의 범위에서 23% 이하이면 실험실 간 재현성이 우수하다고 제시하고 있으며, 본 연구에서 결과와 광주청 및

Table 5. Results of recovery for lepimectin residue (Kwangju Regional KFDA)

Sample	Spiked Conc. (mg/kg)	Recovery* (%) ± RSD		
		A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	Total
Cucumber	0.02	123.9±9.1	92.9±5.7	108.8±7.4
	0.2	92.5±3.4	84.8±3.6	88.7±3.5
Pepper	0.02	95.2±4.0	102.9±10.3	98.9±7.1
	0.5	83.8±2.9	78.4±2.6	81.1±2.7
Hulled rice	0.02	76.7±6.0	80.7±3.9	78.7±5.1
	0.5	77.4±2.7	68.9±5.6	73.3±4.2
Mandarin	0.02	78.5±8.3	79.2±2.9	78.9±5.6
	0.5	71.4±1.8	69.2±3.9	70.3±2.9
Potato	0.02	84.2±2.8	83.2±4.7	83.7±3.7
	0.5	74.8±0.7	73.6±3.7	74.2±2.2
Soybean	0.02	81.7±9.8	86.6±7.2	84.1±8.5
	0.5	69.2±5.3	72.4±7.3	70.8±6.3

\*Mean values of triplicates with relative standard deviation.

Table 6. Results of recovery for lepimectin residue (Daejeon Regional KFDA)

Sample	Spiked Conc. (mg/kg)	Recovery* (%) ± RSD		
		A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	Total
Cucumber	0.02	88.8±3.3	89.4±3.5	89.1±3.4
	0.2	86.5±6.5	85.8±6.7	86.1±7.1
Pepper	0.02	82.9±7.3	84.7±9.0	83.8±8.1
	0.5	82.9±2.5	78.0±2.4	80.5±2.5
Hulled rice	0.02	83.0±5.2	82.3±8.7	83.2±6.9
	0.5	88.4±3.3	87.4±4.4	95.1±3.9
Mandarin	0.02	95.9±2.9	95.2±3.9	95.5±3.4
	0.5	88.4±4.6	87.4±5.5	87.9±5.0
Potato	0.02	81.0±10.1	80.7±6.7	81.0±8.4
	0.5	94.4±9.8	96.8±8.3	95.6±9.1
Soybean	0.02	85.3±4.4	81.8±7.9	83.5±6.1
	0.5	82.5±1.3	82.3±1.7	82.4±1.5

\*Mean values of triplicates with relative standard deviation.

대전청에서의 결과에 대한 RSD<sub>R</sub>(%)는 >0.01 mg/kg ≤ 1 mg/kg 범위에서 2.3~21.9%를 보였고, >0.1 mg/kg 범위에서 3.7~15.3%를 보여 개발된 시험법이 재현성 측면에서 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 4. 결 론

Lepimectin은 분자량이 각각 705 (lepimectin A<sub>3</sub>),

720 (lepimectin A<sub>4</sub>)으로 매우 무거운 화합물이다. 따라서 lepimectin 분석을 위한 기기로 LC (Liquid chromatography)를 선택하였으며, photodiode array 스캔을 통해 물질의 최대흡수과장인 245 nm를 분석과장으로 선택하였다. 추출용매는 lepimectin과 비슷한 이화학적 특성을 가질 것으로 판단되는 macrocyclic lactone계 농약인 abamectin과 milbemectin에 높은 효율을 보인 methanol을 선택하였으며, 간섭물질의 제거를 위한 과정에서는 lepimectin이 비극성인 특성을 고려하여 분배 시 dichloromethane 용매를 이용하였고, 정제과정에서는 methanol/ethyl acetate 혼합액 0.5/99.5 (v/v)의 비율의 최적의 용매 조건을 찾아내어 1차적으로 간섭물질을 제거하였으며, lepimectin이 산성인 특성을 이용해 SPE-NH<sub>2</sub> 카트리지를 이용하여 2차적 간섭물질을 제거함으로써, 물질에 대한 선택성이 우수한 시험법을 개발할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 시험법은 동일한 macrocyclic lactone계 농약인 abamectin, milbemectin과 함께 lepimectin을 동시에 분석할 수 있는 신속, 정확한 최적의 시험법이라고 생각되며, 국내 유통되는 농산물 중 lepimectin 잔류에 대한 안전관리를 위한 공정시험법으로 적극 활용될 것이다.

#### 감사의 글

본 연구는 2011년도 식품의약품안전청 연구개발과제의 연구개발비 지원(11161식품안034)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Alanwood, <http://alanwood.net/pesticides/index>
2. KFDA. Korea Food Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2011).
3. 2012 작물보호제(농약) 지침서. 한국작물보호협회 (2012).
4. M. H. Jeong, S. S. Hong, K. H. Park, J. E. Park, S. J. Kwack, Y. B. Kim, B. S. Han and W. C. Son, *Korean Journal of Pesticide Science*, **15**(2), 218-229 (2011).
5. KFDA, [http://fse.foodnara.go.kr/residue/pesticides/pesticides\\_info\\_view.jsp#ADI](http://fse.foodnara.go.kr/residue/pesticides/pesticides_info_view.jsp#ADI)
6. AOAC, Pesticide and industrial chemical residues, In official method of analysis, 17th ed, 1-88, AOAC International Arlington, VA, USA (2000).
7. US FDA, Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multi

- residue Methods(3rd ed.) US Food and Drug Administration, USA (1999).
8. 식품공전 잔류농약 분석법 실무해설서, 이영득, KFDA (2012).
  9. Codex Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rome. Italy (2003).
  10. S. J. Lee, Y. H. Kim, L. W. Song, Y. S. Hwang, J. D. Lim, E. H. Sohn, M. H. Im, J. A. Do, J. H. Oh, K. S. Kwon, J. K. Lee, Y. D. Lee and M. G. Choung, *Korean Journal of Pesticide Science*, **15**(3), 254-268 (2011).
  11. C. H. Kwon, M. H. Chang, M. H. Im, D. I. Choi, S. C. Jung, J. Y. Lee, Y. D. Yu, J. O. Lee and M. K. Hong, *Anal. Sci. Technol.*, **21**(6), 518-525 (2008).