

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

박신민 · 도정아* · 임승희 · 윤지혜 · 박원민 · 신혜선 · 국주희¹ · 정형욱

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,
¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀

Development and Validation of Analytical Method for Determination of Fungicide Spiroxamine Residue in Agricultural Commodities Using LC-MS/MS

Shin-Min Park, Jung-Ah Do*, Seung-Hee Lim, Ji-Hye Yoon, Won-Min Pak,
Hye-Sun Shin, Ju-Hee Kuk¹, and Hyung-Wook Chung

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, Korea

¹*Nutrition and Functional Food Research Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea*

(Received May 9, 2018/Revised May 26, 2018/Accepted July 11, 2018)

ABSTRACT - Spiroxamine, one of fungicides, is used to control powdery mildew in various crops and black yellow sigatoka in bananas. The major strength of spiroxamine is to control powdery mildew in various crops and bananas yellow sigatoka in bananas. The compound has shown a high level of activity, good persistence and crop tolerance. Besides powdery mildew, good control of rust, net blotch and Rhynchosporium diseases been indicated in cereals, together with a complementary activity against Septoria diseases. In 2017, the maximum residue limit (MRL) of spiroxamine established in Korea. According to Ministry of food and drug safety regulations, spiroxamine residues defined only parent compound. Thus, a analytical method is needed to estimate the residue level of the parent compound. The objective of this study was to develop and validate analytical method for spiroxamine in representative agricultural commodities. Samples were extracted with acetonitrile and partitioned with dichloromethane to remove the interfering substances. The analyte were quantified and confirmed liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) in positive-ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). Matrix matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.0005~0.1 µg/mL) for the analyte in blank extract with coefficient of determination (r^2) > 0.99. For validation purposes, recovery studies will be carried out at three different concentration levels (LOQ, 10LOQ, and 50LOQ) performing five replicates at each level. The recoveries 70.6~104.6% with relative standard deviations (RSDs) less than 10%. All values were consistent with the criteria ranges in the Codex guidelines (CAC/GL40, 2003) and MFDS guidelines. proposed analytical method be used as an official analytical method in the Republic of Korea.

Key words : Spiroxamine, Fungicide, LC-MS/MS, Analytical method, Agricultural commodities

Spiroxamine(8-tert-butyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-2-ylmethyl(ethyl) (propyl)amine)은 전 세계 80여 개국에 등록되어 사용되고 있는 농약으로 우리나라에 2017년 신규

고시된 농약이다. Spiroketalamine계 살균제로 진균 활성을 나타내며 균류의 부착기와 흡기의 형성을 막아 균류구조에 손상을 주어 사멸시키거나 발아관의 성장을 저해하는 기작을 갖고있는 것으로 알려져 있으며, 세포벽에 물리 화학적으로 작용하여 uncinula포자를 사멸하는 기작 등을 나타낸다. 특히 바나나의 잎에 변색된 얼룩점을 유발하는 sikatoka병 방제에 대한 활성이 있는 것으로 알려져 있으며, 곡류의 흰가루병, 녹병, 망반병, Rhynchosporium 병, Septoria병의 방제 등에 이용한다¹⁻³⁾.

2018년 5월 현재, spiroxamine은 EPA, 캐나다에서 모화

*Correspondence to: Jung-Ah Do. Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety
Tel: 82-43-719-4211, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: jado@korea.kr

합물 및 aminodirole를 잔류물의 정의로 설정하고 있고, 유럽, 미국, 일본 등에서는 모화합물만을 잔류물로 정하여 관리하고 있다. 국외 잔류허용기준은 바나나 등 300여 종의 작물에 대하여 0.04~50 mg/kg 수준으로 설정되어 있다⁴⁻⁷⁾. Spiroxamine의 분석법은 모화합물을 기준으로 GC-MS/MS, LC-MS/MS 등으로 분석한 사례가 보고되었으며, 시험법의 경우 다성분분석을 목적으로 농산물, 축산물, 수산물 등을 분석한 문헌이 있으나, spiroxamine의 물리 화학적 특성을 고려해 개발된 단성분 시험법은 없는 실정이다⁸⁻¹²⁾. Spiroxamine은 포도와 밀의 경우 체내대사과정에서 모화합물의 total radioactive residue (TRR)가 53.8~76.0%이며 잔류물은 0.2~9.0% 수준을 나타낸다고 보고되어있다^{3,4)}. 또한 안전성에 대한 평가결과 마우스, 랫드의 발암성 병합시험에서 암수 모두 최고 농도군에서 발암성이 없는 것으로 평가되었으며, 개 대상 1년 만성독성시험에서 도출된 최대무독성용량(NOEL, No Observable Adverse Effect Level) 2.47 mg/kg bw/day에 중간 및 개체 간 차이로 안전계수 100을 적용하여 일일섭취허용량(ADI, Acceptable Daily Intake)은 0.025 mg/kg bw/day로 설정되었다¹³⁾. 국내의 경우 2016년 바나나와 포도에 대한 잔류허용기준이 신설 요청되었으며, 독성시험 및 식물체내 잔류시험 결과에 따라 잔류물의 정의는 모화합물로서 기준이 신설되었다(식품의약품안전처 고시 제2017-102호, 2017.12.15.). 따라서 본 연구에서는 수입 농산물 중 잔류할 수 있는 spiroxamine에 대하여 기준 신설 식품인 바나나와 포도 뿐만 아니라 향후 기준신설 농산물이 늘어날 것에 대비함과 동시에, 사용등락이 되지 않은 농산물에 오남용하는 것을 방지하기 위하여 모든 농산물에서 spiroxamine의 잔류허용기준 적부 판정을 위한 시험법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

Spiroxamine (97.4%) 표준품은 bayer cropscience사에서 제공받아 사용하였다. 전처리용 시약으로 사용된 디클로로메탄(dichloromethane), 아세톤(acetone), 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol), 헥산(*n*-hexane) 및 에틸아세테이트(ethyl acetate)는 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였고, 염화나트륨(sodium chloride, NaCl)은 Wako (Osaka, Japan), 무수황산나트륨(anhydrous sodium sulfate)은 Merck (Darmstadt, Germany), 수산화나트륨(sodium hydroxide, NaOH)과 암모늄아세테이트(ammonium acetate)는 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland), SPE 카트리지(1 g, 6 cc)는 Waters (Milford, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 검체는 식품공전 농산물분류에서 규정하는 대표농산물을 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류)로 선정하고 시중에

서 판매하고 있는 무농약 농산물 각 1종을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C이하에서 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

Spiroxamine 1,000 µg/mL의 표준원액을 제조하여 아세토니트릴에 희석하여 사용하였다. 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 희석하여 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 및 0.1 µg/mL의 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

균질화된 검체 10 g을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고 아세토니트릴 50 mL를 가하여 진탕기에서 10분간 진탕하였다. 진탕 후 추출물을 여과지가 깔려있는 부호너깔때기로 흡인 여과한 뒤 아세토니트릴 20 mL로 잔사 및 용기를 씻어내려 앞의 여액과 합친 뒤 이를 40°C이하의 수욕 상에서 감압 농축하였다. 농축 후 잔류물에 증류수 100 mL를 가하여 녹인 후 1 N NaOH 용액을 천천히 가해 pH 7로 조절하여 500 mL 용량의 분액여두에 옮기고 10 g의 NaCl을 더한 뒤 디클로로메탄 30 mL를 차레로 가하고 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 디클로로메탄 층을 무수황산나트륨에 통과시켜 감압농축플라스크에 받는 과정을 2회 반복하였다. 이를 40°C 이하의 수욕 상에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 후, 잔류물에 헥산 10 mL를 가하여 녹였다. 이를 플로리실 카트리지에 헥산 10 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버리고, 이어서 고정상 상단이 노출되기 전에 추출 과정으로부터 얻은 추출액 중 5 mL를 카트리지 상단에 넣어 1~2 방울/초의 속도로 유출시켜 버리고 고정상 상단이 노출되기 전에 헥산 5 mL를 유출시켜 버린 후 아세톤/헥산(5/95, v/v) 10 mL를 유출시켜 받은 시험액을 감압농축플라스크에 모았다. 이를 40°C 이하 수욕 상에서 감압농축 후 잔류물에 아세토니트릴을 가하여 최종부피 5 mL가 되게 한 뒤 멤브레인 필터(nylon, 0.2 µm)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

LC-MS/MS 분석조건

Spiroxamine의 분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)를 사용하였고, 분석용 역상 칼럼인 C₁₈ 칼럼을 선택하였으며 용리 방식은 10 mM 아세트산암모늄 수용액과 10 mM 아세트산암모늄 포함 메탄올을 이동상으로

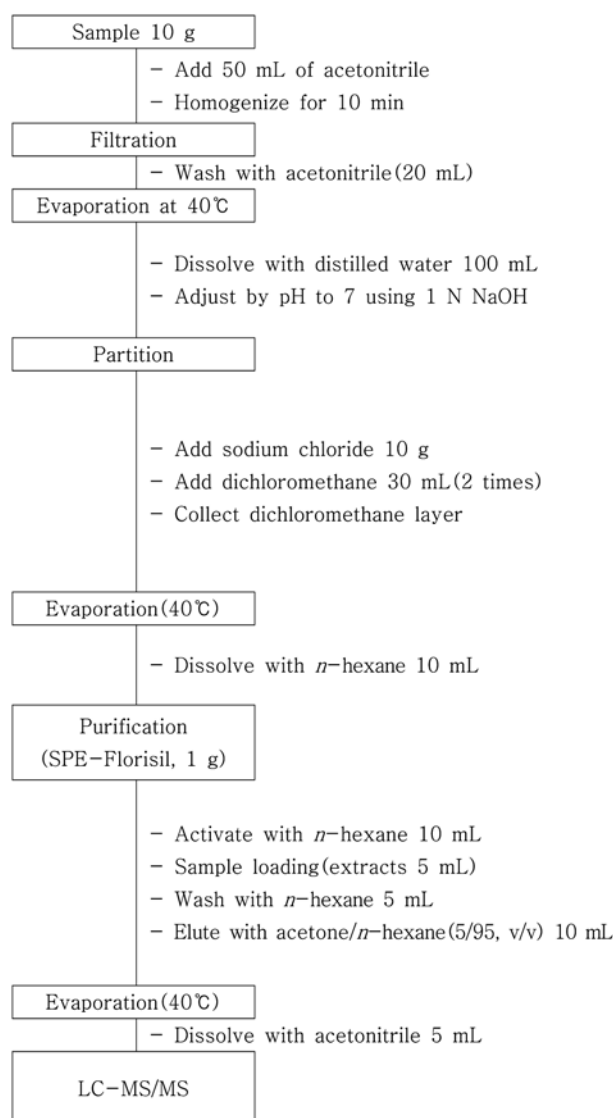


Fig. 1. Flow chart for spiroxamine analysis.

사용하는 기율기 용리 방식을 선택하였다. 각 대상 성분의 이온화법으로는 electro-spray ionization (ESI) 법의 positive-ion mode를 사용하였다. LC-MS/MS 분석조건은 Table 1과 같다.

시험법의 검증

Spiroxamine 시험법은 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인²¹⁾ (CODEX Alimentarius Commission, CAC/GL 40, 2003)의 잔류농약 분석 기준에 근거하여 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery), 재현성(reproducibility)에 대해 유효성을 검증하였다. 직선성의 확인을 위하여 spiroxamine을 무처리 시료 시험용액으로 회석하여 조제한 표준 용액 0.0005~0.1 µg/mL의 농도 범위에 대한

Table 1. Analytical conditions for the determination of spiroxamine

Instrument	LC:Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA)		
	MS/MS: US/Quattro Premier XE (Waters, Milford, MA, USA)		
UPLC conditions			
Column	XBridge C ₁₈ (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 µm)		
Column temperature	40°C		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 µL		
Mobile phase	A: 10 mM ammonium acetate in methanol		
	B: 10 mM ammonium acetate in distilled water		
Gradient table	Time (min)		
		A (%)	B (%)
	0.0	2	98
	0.25	2	98
	2.0	50	50
	5.0	98	2
	10.0	2	98
MS/MS conditions			
Ion mode	ESI positive mode		
Capillary voltage	1.0 kV		
Source temperature	150°C		
Desolvation temperature	500°C		
Desolvation gas flow	900 L/h		
Cone gas flow	150 L/h		

각각의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 상관관계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 신호 대 잡음 비(S/N ratio) 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 무처리 시료에 spiroxamine의 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 처리농도는 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배에 해당하는 농도로 수행하였으며 각각의 농도 및 시료에 대하여 5 반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 시험법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다.

Results and Discussion

최적기분석조건 확립

Spiroxamine은 증기압이 4.0×10^{-3} Pa (25°C)이며 120°C 이상의 온도에서 불안정한 특성을 나타내며, Log P_{ow} 값이

산성 및 중성의 pH에서 1.28~2.79로 중간극성을 나타내는 화합물로 GC분석에 비해 LC 분석이 유리한 것으로 판단하였다. 하지만 화합물 구조에서 conjugation 발색단이나 비공유 전자쌍을 갖는 포화화합물의 발색단을 가지고 있지 않으므로 HPLC/UV로 분석이 불가할 것으로 판단되었고, 이를 정확하게 확인하고자 HPLC의 PDA (Photodiode array) 검출기로 210 nm에서 360 nm까지 측정 파장을 스캔한 결과 최대 흡수 파장(λ_{max})의 확인이 불가능하였다. 따라서 선택성과 정확성을 확보하고자 Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)를 분석기기로 최종 선정하였다. LC-MS/MS는 HPLC에 비해 낮은 정량한계를 나타내며, 선정된 분자량을 기준으로 분석되어 시료의 간섭물질에 대해 영향을 받지 않으므로 정확성 및 선택성이 높을 것으로 판단되었다.

분석용 칼럼은 spiroxamine의 중간극성인 Log P_{ow} 값에 근거하여 극성도에 대해 넓은 스펙트럼을 갖고, 분배의 원리로 분석물질이 분리되는 C_{18} 역상 칼럼을 선택하였고, 10 mM 암모늄아세테이트 함유 메탄올과 10 mM 암모늄아세테이트 함유 수용액을 이동상으로 사용하는 기올기 용리 방식을 선택하였다. 이동상에 사용한 암모늄아세테이트는 ion suppression 원리로 이동상의 pH를 spiroxamine의 pKa인 6.9와 약 1.5 이상의 차이를 나타내도록 조절하며, spiroxamine 분자의 이온화 억압을 유도하고 보다 높은 감도의 선명한 피크를 얻기 위해 사용하였다. 메탄올은 암모늄아세테이트에 대한 용해도가 100 mL당 7.89 g으로 높아, 완충용액으로서 사용에 용이하여 사용하였다^{14,15}. 대상 성분의 이온화법으로는 electro-spray ionization (ESI) 법의 positive-ion mode를 사용하였고 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 분석을 위한 최적 특성 이온을 선정하였다. 관측질량이 297.26인 표준용액 (0.5 μ g/mL)을 일정한 속도(10 μ L/min)로 질량 검출기에 직접 주입한 결과 spiroxamine의 관측질량에 대해 $[M+H]^+$ 형태인 precursor ion 값을 298 mass으로 확인하였다. 이때 cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 30 V에서 최대 피크가 나타남을 확인하였으며, 최적화된 cone voltage 상태에서 분석의 선택성과 검출 강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 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. 분석 조건에서 선정된 특성 이온은 Table 2에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강 현상이 나타날 수 있으므로 검체별로 matrix-matched calibration 법에 준하여 정량하였다^{16,17}.

추출 및 정제조건의 확립

Spiroxamine은 Log P_{ow} 값이 2.8~3.0인 화합물로 중간극성을 띠며, 산성 조건에서 수용성으로 존재하고 중성 및 염기 조건에서 지용성으로 존재한다. Spiroxamine은 유기용매에 대한 용해도가 높으며 추출 시 검체 내부로의 침투성이 용이하도록 수용성 유기용매로 추출하고자 하였다. 보편적으로 사용하고 있는 수용성 유기용매 중 아세톤과 메탄올은 아세토니트릴에 비해 비극성 간섭물질에 대한 추출률이 높고, spiroxamine의 회수율이 아세토니트릴 추출 시 충분히 효과적인 것으로 판단하여 아세토니트릴을 추출 용매로 선정하였다. 추출 후 검체추출액 중 간섭물질 제거를 위해 디클로로메탄을 이용한 액-액 분배법을 적용하였다. Ravelo-Pérez 등¹⁸의 보고에서는 바나나에서 carbaryl 등 8종의 잔류농약 분석의 최적 조건을 설정하기 위해 변수로 둔 조건 중 액-액 분배 시 염화나트륨의 농도를 15, 20, 25%로 두어 salting out을 유도한 결과 염화나트륨의 농도가 높아질수록 최적의 회수율을 나타내었다고 보고하였고, Endo 등¹⁹은 높은 추출효율을 얻기 위해 염을 물에 첨가하여 salting out을 유도한다고 보고하였다. 이는 액-액 분배 시 포화수준의 염화나트륨 첨가를 통한 이온 강도 증가로 수분층과 유기용매 층을 명확하게 분리하여 대상 물질의 분배효율은 높이고, 시료 내의 극성 불순물이 유기용매 층에 전이되는 것을 최소화하기 위한 원리로 판단되었으며 이를 적용하여 분배효율을 높였다. 또한 비극성 유기용매인 디클로로메탄에 전이된 비극성 불순물을 정제하기 위해 고상 카트리지를 이용하여 정제하고자 하였다. Żwir-Ferenc과 Biziuk²⁰에 따르면 정제 카트리지의 선택은 분석물질의 특성 및 검체 매트릭스 등에 따라 달라지는데, 분석물질이 극성인 경우 순상카트리지를 이용한 정제가 용이하며, 검체를 비극성 유기용매로 추출 또

Table 2. Selected-ion of LC-MS/MS for spiroxamine

Compound	Molecular weight	Exact mass (m/z)	Precursor ion (m/z) $[M+H]^+$	Product ion (m/z)	CE ^b
Spiroxamine	297.5	297.26	298	100	30
				144 ^a	20

^aQuantification ion

^bCollision energy (eV)

Table 3. Comparisons of SPE cartridge for spiroxamine analysis

Solvent ratio ^a (v/v)	Fraction	Florisol elution efficiency (%)	Silica elution efficiency (%)
100	1 (loading 5 mL)	0.1	0.1
10/90	2 (10 mL)	0.1	-
20/80	3 (10 mL)	3.7	-
30/70	4 (10 mL)	44.1	-
40/60	5 (10 mL)	2.5	0.3
Total		50.5	0.4

^aSolvent ratio of ethyl acetate/dichloromethane**Table 4.** Comparisons of SPE cartridge for spiroxamine analysis

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	Florisol elution efficiency (%)
			spiroxamine
Ethyl acetate/ <i>n</i> -Hexane	100	1 (loading 5 mL)	0.1
	10/90	2 (10 mL)	38.4
	20/80	3 (10 mL)	1.9
	30/70	4 (10 mL)	0.2
	40/60	5 (10 mL)	0.1
	Total		40.7
Acetone/ <i>n</i> -Hexane	100	1 (loading 5 mL)	0.1
	10/90	2 (10 mL)	35.1
	20/80	3 (10 mL)	0.5
	30/70	4 (10 mL)	0.1
	40/60	5 (10 mL)	-
	Total		35.8
Acetone/Dichloromethane	100	1 (loading 5 mL)	0.1
	10/90	2 (10 mL)	25.2
	20/80	3 (10 mL)	5.7
	30/70	4 (10 mL)	0.1
	40/60	5 (10 mL)	0.1
	Total		31.2

는 분배했을 경우 유입된 비극성 간섭물질의 정제를 위해 극성 흡착기를 지닌 카트리지를 사용하여 비극성 간섭물질은 통과시키고 상대적으로 극성인 분석물질을 정제한다는 보고가 있다. 따라서 비극성 유기용매인 디클로로메탄으로 액-액분배 후 유입된 비극성 간섭물질을 정제하고, spiroxamine이 중성 및 염기 조건에서 비해리 상태로 존재하며 중간극성을 띠는 특성을 고려하여 추가적인 정제를 위해 흡착원리를 따른 순상카트리지를 hydroxyl기를 작용기로 갖는 플로리실(florisol), 실리카(silica) 카트리지를 이용하여 정제효율을 비교하였다. 용매는 spiroxamine에 대해 비교적 용해도가 높은 비극성 유기용매인 디클로로메탄(극성지수: 3.1)과 극성용매를 혼합하여 분석 중 극성 물질에 대한 간섭을 최소화하기 위해 에틸아세테이트(극성지수: 4.4) 용매조합으로 정제효율을 비교하였다. 플로

리실과 실리카 카트리지를 실험 결과, 플로리실 카트리지의 경우 에틸아세테이트/디클로로메탄의 모든 분획에서 용출되었으나 총 50.5%의 회수율을 확인하였으며 실리카 카트리지의 경우 총 0.4%의 회수율을 확인하였다(Table 3). 따라서 다른 용매와의 정제효율을 비교하기 위해 상대적으로 회수율이 높았던 플로리실 카트리지를 선정한 후 용매 조성을 에틸아세테이트/헥산, 아세톤/헥산, 아세톤/디클로로메탄으로 설정하여 회수율을 확인하였다. 하지만 모든 용매 조성에서 최대 40.6%으로 낮은 회수율을 보였는데, 이는 spiroxamine의 pKa에 근거하여 산성 혹은 중성의 pH일 때 이온화되어있는 상태이므로 일반적으로 중성의 화합물을 분석하는 흡착카트리지를 사용한 회수율이 낮은 것으로 판단되었다(Table 4). 따라서 spiroxamine의 추출효율을 높이기 위해 농산물 시료인 감귤을 대상으로 아세토

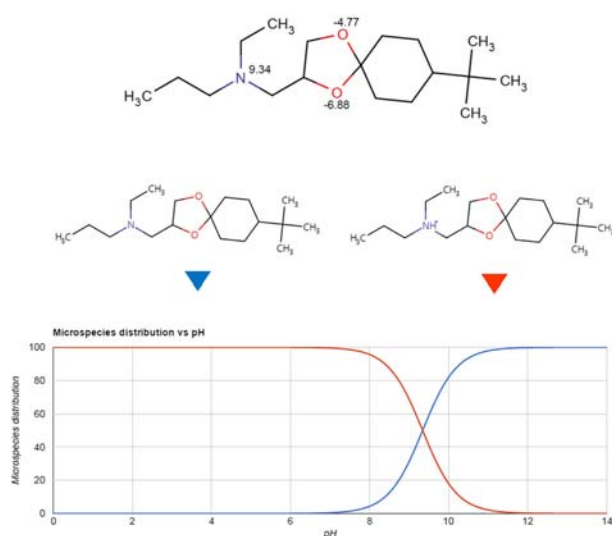


Fig. 2. Structure and pKa graph of spiroxamine.

Table 5. Effects of pH for spiroxamine partition efficiency in mandarin sample

pH	Mandarin partition efficiency (%)
6	79.7
7	87.2
8	86.2
9	79.3
10	75.5
11	79.4
12	77.5

니트릴로 추출 후 pH를 6-12로 조정하여 비교한 결과, pH 7인 중성조건에서 87.2%로 가장 높은 회수율을 나타내었다. 한편 pKa그래프(Fig. 2)에서 pH가 높아질수록 해당 화

Table 7. Comparisons of solvent ratio on spiroxamine elution efficiency

Fraction	Elution efficiency (%)				
	Solvent ratio (v/v) ^a				
	100	2/98	5/95	10/90	20/80
1 (5 mL)	-	-	77.9	67.8	76.4
2 (5 mL)	-	-	0.7	1.1	0.9
3 (5 mL)	-	-	-	-	-
4 (5 mL)	-	7.1	-	-	-
Total	-	7.1	78.6	68.9	77.3

^aSolvent ratio of acetone/*n*-hexane

합물이 지용성으로 존재하는 것을 확인할 수 있었으나 중성 조건에서 강염기 조건보다 높은 회수율을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 본 시험법에서는 앞선 결과를 바탕으로 아세트니트릴로 추출한 뒤 추출액의 pH를 7로 조절하여 디클로로메탄으로 분배하는 방법을 적용하였다 (Table 5). 농산물 검체인 감귤을 아세트니트릴로 추출하여 pH 7로 조정한 후 디클로로메탄으로 분배하여 정제를 진행하였다. 추출액을 헥산으로 재용해하여 플로리실 카트리지에 용매 조성을 에틸아세테이트/헥산, 아세톤/헥산으로 설정하고 회수율을 확인하였다. 실험결과, 에틸아세테이트/헥산의 경우 에틸아세테이트/헥산(20/80, v/v), 에틸아세테이트/헥산(30/70, v/v), 에틸아세테이트/헥산(40/60, v/v)의 분획에서 용출되어 각각 38.5, 28.8, 1.7%의 회수율로 총 69.0%의 회수율을 확인하였다. 또한 아세톤/헥산의 경우 아세톤/헥산(10/90, v/v), 아세톤/헥산(20/80, v/v)의 분획에서 용출되어 각각 72.1, 0.9%의 회수율로 총 73.0%의 회수율을 확인하였다. 따라서 아세톤/헥산으로 정제 시 로딩에서 용출되지 않았으며 상대적으로 높은 회수율을 확인하였으므로, 아세톤/헥산(10/90, v/v), 아세톤/헥산(20/80,

Table 6. Comparisons of elution solvents for spiroxamine analysis

Solvent	Solvent ratio (v/v)	Fraction	Florisil elution efficiency (%)
Ethyl acetate/ <i>n</i> -Hexane	100	1 (loading 5 mL)	-
	10/90	2 (10 mL)	-
	20/80	3 (10 mL)	38.5
	30/70	4 (10 mL)	28.8
	40/60	5 (10 mL)	1.7
	Total		
Acetone/ <i>n</i> -Hexane	100	1 (loading 5 mL)	-
	10/90	2 (10 mL)	72.1
	20/80	3 (10 mL)	0.9
	30/70	4 (10 mL)	-
	40/60	5 (10 mL)	-
	Total		

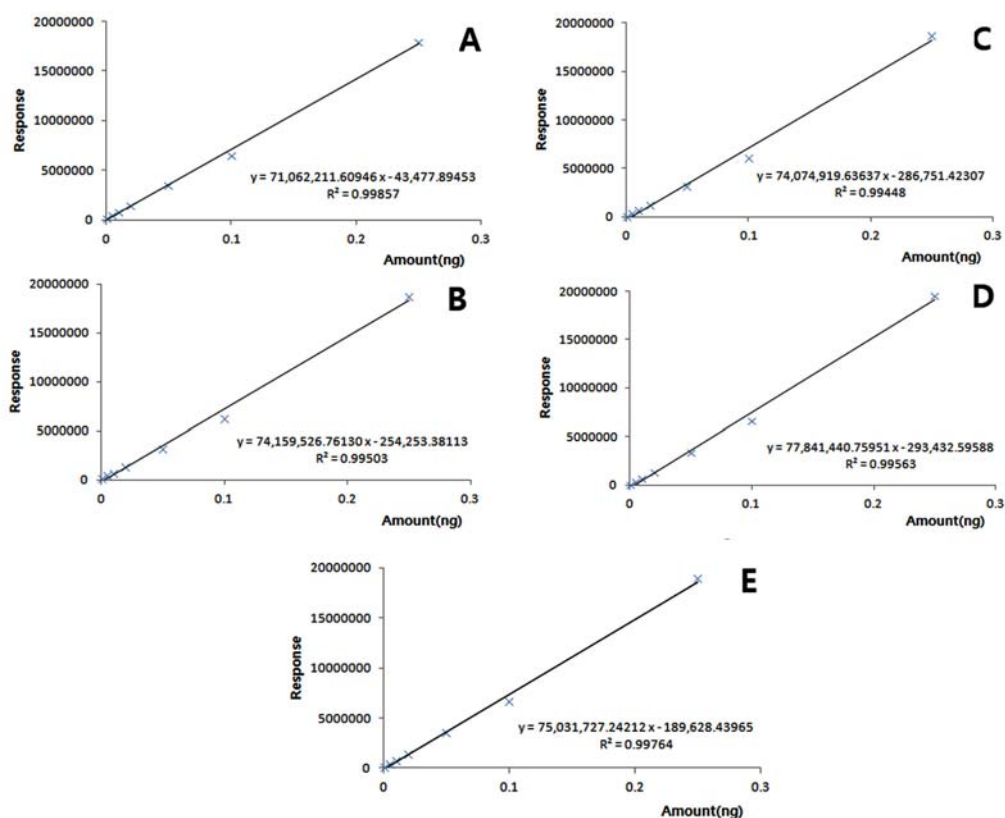


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of spiroxamine corresponding to: (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

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

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery \pm RSD ^a (%)		Mean ^d (%)	CV ^e (%)
		MFDS ^b	Gwangju KFDA ^c		
Hulled rice	0.001	89.1 \pm 2.7	74.0 \pm 1.8	81.6	10.4
	0.01	97.2 \pm 5.6	75.3 \pm 3.9	86.3	14.8
	0.05	73.1 \pm 3.3	70.6 \pm 0.5	71.9	3.5
Potato	0.001	86.7 \pm 4.3	71.3 \pm 9.9	79.0	13.7
	0.01	98.8 \pm 8.1	82.5 \pm 2.0	90.7	11.4
	0.05	78.9 \pm 2.5	77.7 \pm 8.6	78.3	7.3
Soybean	0.001	79.1 \pm 6.1	81.1 \pm 0.7	80.1	5.0
	0.01	92.5 \pm 5.2	78.3 \pm 3.3	85.4	10.2
	0.05	71.9 \pm 4.1	79.9 \pm 4.5	75.9	7.7
Mandarin	0.001	73.6 \pm 2.7	88.2 \pm 3.9	80.9	10.6
	0.01	76.0 \pm 6.3	75.9 \pm 4.8	76.0	6.6
	0.05	87.8 \pm 2.6	78.2 \pm 2.5	83.0	6.9
Green pepper	0.001	76.5 \pm 9.0	104.6 \pm 6.2	90.6	18.6
	0.01	77.2 \pm 3.2	82.5 \pm 2.0	79.9	4.7
	0.05	84.9 \pm 4.6	73.4 \pm 5.0	79.2	9.6

^aMean values of 5 times repetitions with relative standard deviation

^bMinistry of Food and Drug Safety

^cGwangju Korea Food and Drug Administration

^dRecovery average of inter-laboratory

^eCoefficient of variation of inter-laboratory

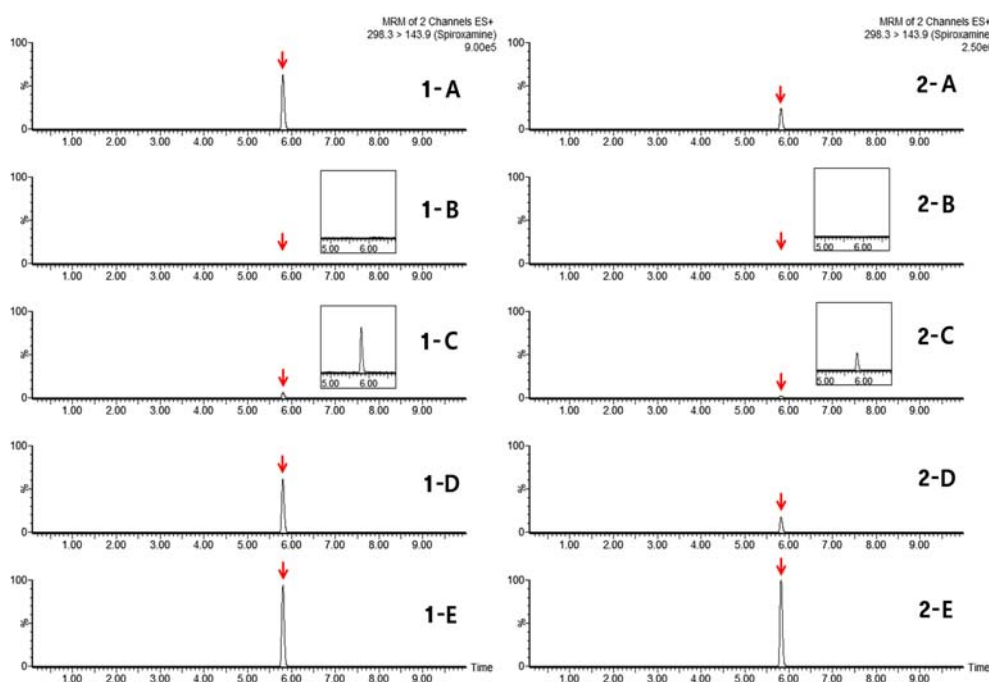


Fig. 4. Representative MRM (quantification ion) chromatograms of spiroxamine corresponding to: 1. hulled rice, 2. mandarin, (A) standard solution at 0.01 mg/kg, (B) control, (C) spiked at 0.001 mg/kg, (D) spiked at 0.01 mg/kg, and (E) spiked at 0.05 mg/kg.

v/v)의 분획을 세분화하여 정제회수율을 확인하여야 할 것으로 판단하였다(Table 6). 더욱 효과적인 정제를 위해 플로리실 카트리지를 이용하여 헥산에 재용해한 후 헥산, 아세톤/헥산(2/98, v/v), 아세톤/헥산(5/95, v/v), 아세톤/헥산(10/90, v/v), 아세톤/헥산(20/80, v/v)으로 세분화하여 각 용매 조성에 대해 5 mL씩 4개의 분획을 받아 실험을 진행한 결과, 헥산 용매를 제외한 각기 다른 분획에서 용출되었다. 그중 아세톤/헥산(5/95, v/v)의 첫 번째와 두 번째 분획(10 mL)에서 용출되어 78.6%로 가장 높은 회수율을 보였다(Table 7). 따라서 최종 정제법으로는 헥산으로 재용해한 추출액 5 mL을 카트리지에 용출시킨 후 헥산 5 mL로 씻어 버린 뒤 아세톤/헥산(5/95, v/v) 10 mL를 용출시켜 받는 것으로 확립하였다.

시험법의 검증

선택성 및 직선성

Spiroxamine의 선택성은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 평가하였다. 5종의 무농약 농산물 시료와 표준용액을 첨가한 시료를 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 무농약 시료 중 spiroxamine의 머무름 시간과 질량 대 전하비(m/z)가 같은 어떠한 간섭물질도 검출되지 않았으므로 검체 중 spiroxamine의 분석을 위해 확립된 본 시험법의 높은 분리능과 선택성을 확인할 수 있었다. Spiroxamine

의 직선성을 확인하기 위하여 표준원액을 5종의 무농약 농산물 추출물로 희석하여 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 그리고 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5 μL 를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 모두 상관계수(r^2)가 0.99 이상으로 높은 직선성을 보였다(Fig. 3).

검출한계와 정량한계

Spiroxamine의 검출한계는 기기 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음 비(S/N ratio) 3 이상으로 결정하여 분석기기의 최소검출량 0.0025 ng에 따른 검출한계는 0.0005 mg/kg이었고, 정량한계는 신호 대 잡음 비(S/N ratio) 10 이상으로 결정하여 분석기기의 최소검출량 0.005 ng에 따른 정량한계는 0.001 mg/kg이었다.

시험법의 회수율

시험법의 정확성을 평가하기 위하여 정량한계, 정량한계의 10배, 정량한계의 50배 수준인 0.001, 0.01과 0.05 mg/kg의 농도로 회수율 실험을 5회 반복하여 수행하였다. 시험 결과 각 농도에서 평균 회수율은 70.6-104.6%이었고, 이때 상대표준편차도 9.9% 미만으로 조사되어 모든 분석 물질에 대한 높은 정확성, 재현성 및 효율성을 확인할 수 있었다. 이 결과는 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인²¹⁾(CODEX Alimentarius Commission, CAC/GL 40, 2003)의 잔류농약 분석 기준에서 >0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg의 30%, >0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg의 20%, >0.1 mg/kg

≤ 1 mg/kg의 15%보다 낮아 기준에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 8). LC-MS/MS를 이용하여 분석한 농산물 중 Spiroxamine의 회수율 크로마토그램은 Fig. 4에 제시하였다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처의 연구사업 “2017년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(17161식위안001)”의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 농산물 중 2017년 기준신설예정농약 Spiroxamine에 대한 공정시험법을 개발하고자 수행하였다. Spiroxamine은 모화합물만이 잔류물로 정의되므로 이를 분석하기 위한 시험법을 개발하였고, 확립된 시험법은 실험실 내 및 실험실 간 검증을 통해 공정시험법으로의 유효성을 확인하였다. Spiroxamine의 물리화학적 특성을 고려하여 분석을 위해 LC-MS/MS를 분석기기로 사용하였으며, acetonitrile으로 추출 후 유기용매를 이용하여 액액분배조건 및 florisol cartridge를 이용한 SPE 정제조건을 확립하여 시료의 불순물을 효과적으로 정제하는 시험법을 개발하였다. 개발된 Spiroxamine 시험법의 직선성은 결정계수(r^2)가 0.99 이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.0005, 0.001 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대한 시험법 검증결과 평균 회수율(5 반복)은 71.9~98.8%였고, 분석오차는 10.0% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 광주지방식약청과의 실험실 간 검증 결과에서 평균 회수율은 70.6~104.6%를 나타내어 모두 Codex 가이드라인 및 식약처 가이드라인의 기준에 부합하는 것으로 확인되었다. 개발된 시험법은 낮은 검출한계 및 정량한계, 우수한 직선성, 회수율 시험을 통한 양호한 정밀성 및 재현성 등이 입증되어 농산물 중 Spiroxamine의 분석을 위한 식품공전 공정시험법으로 활용되기에 적합한 것으로 판단된다.

References

- Rosales-Conrado, N.: Hydrolysis study and extraction of Spiroxamine from soils of different physico-chemical properties. *Chemosphere*, **77**(6), 821-828 (2009).
- Gullino, M. L., Leroux, P., Smith, C. M.: Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Prot.*, **19**(1), 1-11 (2000).
- Bayer CropScience, Application for a Maximum Residue Limit (MRL) or an Import Tolerance for Spiroxamine (KWG 4168) on banana and grapes in Korea (2016).
- European Food Safety Authority, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Spiroxamine (2010).
- Electronic Code of Federal Regulations. *Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food*, **180**, 180.602 (2015).
- European Commission. EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN>. (2016).
- The Japan Food Chemical Research Foundation. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?ainq=34100>. (2016).
- Saito-Shida, S., Nemoto, S., Teshima, R., Akiyama, H.: Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A*, **33**(1), 119-127 (2016).
- Walorczyk, S., Drożdżyński, D., Kierzek, R.: Two-step dispersive-solid phase extraction strategy for pesticide multiresidue analysis in a chlorophyll-containing matrix by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1412**, 22-32 (2015).
- Lozano, A., Rajski, L., Uclés, S., Belmonte-Valles, N., Mezcua, M., Fernández-Alba, A. R.: Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, **118**, 68-83 (2014).
- Lozano, A., Kiedrowska, B., Scholten, J., de Kroon, M., de Kok, A., Fernández-Alba, A. R.: Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Food Chem.*, **192**, 668-681 (2016).
- Ambrus, A., Buczkó, J., Hamow, K. A., Juhász, V., Solymosné Majzik, E., Szemáné Dobrik, H., Sztítás, R.: Contribution of sample processing to variability and accuracy of the results of pesticide residue analysis in plant commodities. *J. Agric. Food Chem.*, **64**(31), 6071-6081 (2016).
- Ministry of Food and Drug Safety, Spiroxamine Safety Evaluation Report (2016).
- Mallet, C. R., Lu, Z., Mazzeo, J. R.: A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**(1), 49-58 (2004).
- McCalley, D. V.: Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range. *J. Chromatogr. A*, **1411**, 41-49 (2015).
- Bauer, A., Luetjohann, J., Rohn, S., Kuballa, J., Jantzen, E.: Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities. *Food Control*, **86**, 71-76 (2018).
- Uclés, S., Lozano, A., Sosa, A., Vázquez, P. P., Valverde, A., Fernández-Alba, A. R.: Matrix interference evaluation

- employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*, **174**, 72-81 (2017).
18. Ravelo-Pérez, L. M., Hernández-Borges, J., Asensio-Ramos, M., Rodríguez-Delgado, M. Á.: Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *J Chromatogr A*, **1216**(43), 7336-7345 (2009).
 19. Endo, S., Pfennigsdorff, A., Goss, K. U.: Salting-out effect in aqueous NaCl solutions: trends with size and polarity of solute molecules. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **46**(3), 1496-1503 (2012).
 20. Żwir-Ferenc, A., Biziuk, M.: Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications. *Pol. J. Environ. Stud.*, **15**(5), 677-690 (2006).
 21. CODEX Alimentarius Commission, *Guidelines on good laboratory practice in residue analysis* (2003).