pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 1, pp. 1~12 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.1.1

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Dimpropyridaz와 Cyclobutrifluram의 동시 시험법 개발 및 검증

구선영[1] · 이수정[1] · 박채영[1] · 이정미[1]* · 정윤미[2] · 장귀현[1] · 엄미옥[1]
[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[2]식품의약품안전처 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Development of a Simultaneous Analytical Method for Dimpropyridaz and Cyclobutrifluram in Agricultural Products using LC-MS/MS

Sun Young Gu[1], Su Jung Lee[1], Chae Young Park[1], Jung Mi Lee[1]*, Yun Mi Chung[2], Gui Hyun Jang[1], Miok Eom[1]
[1]*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*
[2]*Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju, Korea*

(Received November 26, 2024/Revised January 13, 2025/Accepted January 14, 2025)

ABSTRACT - Dimpropyridaz, a pyrazole carboxamide insecticide, is highly effective for controlling pests such as locusts by targeting the transient receptor potential vanilloid (TRPV) upstream region and blocking signal transmission. Cyclobutyrifluram is a phenethyl pyridineamide insecticide that inhibits the respiratory action of the mitochondrial electron transport chain complex II. Establishing an official analysis method for safety management is required, as this drug is newly registered in Korea. Therefore, this study aimed to develop a residual analysis method for dimpropyridaz and cyclobutrifluram in five representative agricultural products. Dimpropyridaz and cyclobutrifluram were extracted using the EN method (a QuEChERS method) by comparing the recovery tests and matrix effects of the three quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) methods. Various sorbent agents have been used to establish clean-up methods. No differences were observed among the utilized sorbents. Therefore, $MgSO_4$ and primary secondary amine (PSA) were selected as the final cleanup conditions. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to analyze the selectivity and sensitivity of the target pesticide in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results of the recovery test using the established analysis method for dimpropyridaz were 85.5-101.5% and for cyclobutrifluram were 86.8-108.5% and the coefficient of variation (CV) values were less than 10.9% and 13.7%, respectively. These results are consistent with the residue analysis criteria of the International Food Standards Committee and the guidelines of the Korea Food and Drug Administration.

Key words: Pesticide, Dimpropyridaz and Cyclobutrifluram, Analytical method, Agricultural product, LC-MS/MS

딤프로피리다즈(dimpropyridaz)는 pyrazole carboxamide 계열 살충제[1)]로 transient receptor potential vanilloid (TRPV) 상류 부위를 표적으로 하여 신호 전달을 차단하며, 가루이, 진딧물 등과 특히 기존 살충제에 내성이 있는 해충의 방제에 매우 효과적이다[2)]. 사이클로뷰트리플루람(cyclobutrifluram)은 phenethyl pyridineamide 계열 살선충제로 미토콘드리아 전자 수송 사슬복합체 II의 호흡작용을 저해[1)]한다. 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람은 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 각각 1.1과 3.2인 극성-중간극성 및 비극성 화합물로 분자구조 및 물리·화학적 특성은 Table 1과 같다. 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람에 대한 국내 잔류물의 정의는 모화합물이며, 각각 수박, 호박잎 등 29품목에 대하여 0.03-7.0 mg/kg, 배추 등 6품목에 대하여 0.03 mg/kg으로 잔류허용기준이 설

*Correspondence to: Jung Mi Lee, 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
Tel: +82-43-719-4205, Fax: +82-43-719-4200
E-mail: mythljm@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

정되어 있다. 반면, 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex), 미국(Environmental Protection Agency, EPA), 유럽(European Commission, EC), 일본(Japan Food Chemical Research Foundation, JFCRF)은 모두 잔류허용기준이 설정되어 있지 않다.

Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS)법은 쌀, 토양, 토마토, 오이, 포도, 사과, 배, 감자, 꿀, 차, 동물의 지방, 계란 등 다양한 매질에서 여러 물질을 동시에 분석할 수 있는 간단한 시험법으로 국내외에서 시험법 개발에 적용 및 응용한다[3-15]. 이는 salting out 원리로 추출용매인 아세토니트릴과 물 층을 분리하고, 무수황산마그네슘과 염화나트륨을 첨가하여 시료 중 수분과 간섭 물질을 제거하여 추출 효율을 높인다. 또한, 사용하는 염의 종류에 따라 acetate염을 사용하는 AOAC법과 citrate염을 첨가하는 EN 15662법이 있으며, 적절한 염을 사용하여 pH에 민감한 성분들을 효율적으로 추출할 수 있다. 분산상 SPE법(dispersive-solid phase extraction, d-SPE)에서 사용되는 무수황산마그네슘(magnesium sulfate anhydrous, $MgSO_4$)은 추출 후 시료에 남아있는 수분을 제거하여 추출액의 극성도를 낮아지게 하며[16] primary secondary amine (PSA)은 추출액 중 극성 유기산 등과 당이나 지방산 등을 제거한다. 또한, octadecyl (C_{18})은 지질과 같은 비극성 간섭물질을 제거하고, graphitized carbon black (GCB)은 스테롤뿐만 아니라 클로로필, 카로티노이드 같은 색소를 제거한다[17].

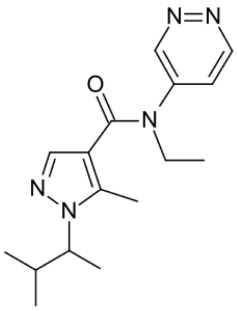
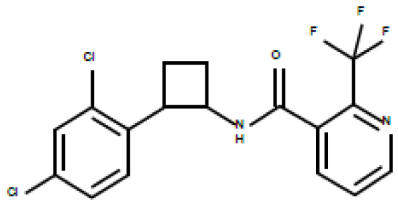
따라서, 본 연구에서는 딤피로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 기준 준수 여부 확인을 위해 대표 농산물 5품목(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)을 대상으로 두 성분을 동시에 분석하기 위한 시험법을 개발하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

딤프로피리다즈(99.1%)는 BASF (Ludwigshafen, Germany)에서, 사이클로뷰트리플루람(99.9%)은 Syngenta (Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 아세토니트릴과 메탄올, 암모늄 아세테이트는 high performance liquid chromatography

Table 1. Physicochemical characteristics of dimpropyridaz and cyclobutrifluram

Property	Dimpropyridaz	Cyclobutrifluram
Structure		
IUPAC name	N-ethyl-5-methyl-1-(3-methylbutan-2-yl)-N-pyridazin-4-ylpyrazole-4-carboxamide	N-[(1S,2S)-2-(2,4-dichlorophenyl)cyclobutyl]-2-(trifluoromethyl)pyridine-3-carboxamide
CAS no.	1403615-77-9	1644251-74-0
Molecular formula	$C_{16}H_{23}N_5O$	$C_{17}H_{13}Cl_2F_3N_2O$
Molecular weight (g/mol)	301.4	389.2
Exact mass (g/mol)	301.1	388.0
Melting point (°C)	81.9	125.4
Log P_{ow}	1.1	3.2
Vapor pressure (mmHg, 20°C)	$<6.5\times10^{-8}$	$<4.65\times10^{-8}$
Solubility in water	34.6 g/L (20°C)	33 mg/L (25°C)
Solubility in organic solvent (g/L, 25°C)	Acetone>250 Ethyl acetate>250 1,2-Dichloroethane 67-80 n-Heptane<10 Methanol>250 p-xylene 67-80	Acetone>500 Dichloromethane 430 Ethyl acetate 390 Hexane 0.27 Methanol 420 Octanol 69 Toluene 53

(HPLC) 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 포름산은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 추출에 사용된 시약 kit (Part No. ENK1-SC)와 정제에 사용된 시약 kit (Part No. PM1EN)는 CHROMAtific (Cacilienweg, Germany)에서 구입하였다. Polytetrafluoroethylene (PTFE) 멤브레인 필터(0.2 μm× 13 mm)는 GVS (Zola Predosa, Italy)에서 구입하였으며, 검체는 대표 농산물 5품목 [현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류)] 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

딤프로피리다즈 20.18 mg, 사이클로뷰트리플루람 20.02 mg을 아세토니트릴 20 mL에 용해하여 1,000 mg/L의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 시료의 무처리 추출물 900 μL에 0.75 mg/L 표준용액 100 μL를 넣어 0.075 mg/L 표준용액을 조제한 뒤, 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 mg/L의 농도가 되도록 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 정제

시료를 균질화한 후, 10 g(곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 후 5 g, 서류, 과일류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄한 후 10 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류 및 두류의 경우 물 5 mL 첨가 후 30분간 방치) 아세토니트릴 10 mL를 가한 뒤 1분간 진탕하였다. 진탕 후 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g을 추가하여 1분간 흔든 후 4°C, 4,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상층액 1 mL를 취하였다. 무수황산마그네슘($MgSO_4$) 150 mg과 PSA 25 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 상층액 1 mL를 가하고 30초간 와류교반기 등을 이용하여 충분히 혼합한 후, 이를 원심분리 등의 방법으로 층을 분리하였다. 정제된 상층액을 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

LC-MS/MS 분석조건

딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람을 분석하기 위하여 LC-MS/MS (Waters, Milford, CT, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼으로 capcell core C_{18} (2.1 mm I.D.× 100 mm L., 2.7 μm)을 선택하였으며, 이동상으로 5 mM 암모늄 아세테이트, 0.1% 포름산이 함유된 메탄올, 5 mM 암모늄 아세테이트와 0.1% 포름산이 함유된 물을 사용하여 최적의 기울기 용리 방식을 적용하였다. 정량 분석을 위한 이온화 방식은 electro-spray ionization (ESI)법의 positive-ion 또는 negative-ion mode를 사용하였으며 LC-MS/MS의 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. LC-MS/MS parameters for the analysis of dimpropyridaz and cyclobutrifluram

Condition	Content		
Instrument	LC : Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) MS/MS : Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA)		
Chromatographic separation			
Column	Capcell core C_{18} (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2.7 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	2 μL		
Column temp.	40°C		
Mobile phase	A: 5 mM Ammonium acetate, 0.1% Formic acid in methanol B: 5 mM Ammonium acetate, 0.1% Formic acid in water		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	10	90
	1.0	10	90
	3.0	50	50
	7.0	90	10
	8.0	90	10
	8.1	10	90
	10.0	10	90
MS/MS condition			
Capillary voltage	1 kV		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	500°C		
Desolvation gas flow	1,000 L/h		
Cone gas flow	150 L/h		

시험법 유효성 검증

확립된 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 시험법은 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인[24]과 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993)[25]에 근거하여 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 0.001-0.075 mg/L의 농

도가 되도록 시료의 무처리 추출액으로 희석하여 각 농도 범위에 대한 peak의 면적으로 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였으며, 검량선의 결정계수(coefficient of corelation, R^2)를 구하였다. 또한, 크로마토그램 상에서 신호(signal) 내 잡음(noise)비(S/N ratio)가 각각 3과 10 이상이 되는 농도를 LOD와 LOQ로 설정하였다. 시험법의 정확성과 반복성은 대표 농산물 5품목에 대하여 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배의 농도가 되도록 무처리 시료에 5반복 처리한 후 시료분석과 동일한 방법으로 분석하여 평균 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 구하였다. LOQ 10배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 2배, LOQ 50배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 10배 희석하여 검량선의 범위 내에서 정량하였다. 시험법의 재현성은 광주지방식품의약품안전청 및 인천광역시보건환경연구원과 실험실간 검증(inter-laboratory validation)을 실시하고 변이계수(coefficient of variance, CV)를 구하여 확인하였다.

Results and Discussion

추출 및 정제조건 확립

딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 Log P_{ow} 값은 각각 1.1과 3.2인 극성-중간극성 및 비극성 화합물이다. 잔류농약은 검체 입자 표면이나 내부에 존재하고 검체 주위는 수분으로 수화되어 있기 때문에 이를 추출하기 위해서는 검체 내부로의 침투가 용이한 수용성 유기용매를 사용한다[10]. 추출 및 정제과정에서 검체의 유기산과 색소를 효율적으로 제거하기 위하여 분산상 SPE법을 적용하는 것이 좋을 것으로 판단되어 이를 적용하는 QuEChERS법을 검토하였다. Anastassiades 등[10]이 개발한 original법과

Table 3. Comparisons of QuEChERS extraction for the determination of dimpropyridaz and cyclobutrifluram in samples

Compound	Sample	Mean recovery±RSD[a] (%)		
		Original	AOAC	EN 15662
Dimpropyridaz	Hulled rice	84.0±0.6	90.2±2.0	86.9±1.2
	Potato	83.8±0.5	87.9±3.1	83.5±2.8
	Soybean	86.6±1.8	90.7±2.3	92.9±3.8
	Mandarin	96.3±0.6	90.5±6.0	99.2±3.4
	Green pepper	79.8±2.6	89.1±0.9	86.1±1.9
Cyclobutrifluram	Hulled rice	96.5±0.6	90.9±5.0	84.8±7.8
	Potato	93.3±6.1	95.2±2.0	87.1±1.1
	Soybean	88.4±5.6	98.3±3.7	89.8±1.7
	Mandarin	95.8±6.9	99.3±2.8	96.6±6.0
	Green pepper	88.4±1.3	86.4±1.8	87.3±2.2

[a] Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

Table 4. Comparisons of matrix effect between QuEChERS extractions for the determination of dimpropyridaz and cyclobutrifluram

Compound	Sample	Matrix effect[a]		
		Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Dimpropyridaz	Hulled rice	-0.02	-0.24	-5.34
	Potato	-61.40	-65.93	-62.37
	Soybean	-8.38	-10.57	-13.35
	Mandarin	-37.07	-33.74	-37.89
	Green pepper	-23.71	-21.98	-29.22
Cyclobutrifluram	Hulled rice	95.17	67.83	45.32
	Potato	11.51	-2.29	-3.25
	Soybean	-3.71	0.09	2.88
	Mandarin	-18.27	-7.03	8.58
	Green pepper	8.58	15.54	16.52

[a] Matrix effect (%)={(Peak area of standard in matrix-peak area of standard in solvent)/peak area of standard in solvent}×100.

Table 5. The clean-up efficiency of dimpropyridaz and cyclobutrifluram according to adsorbent composition

Sorbent	Recovery±RSD[a] (%)	
	Dimpropyridaz	Cyclobutrifluram
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg	98.3±5.3	97.9±2.0
$MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 25 mg	96.3±2.2	99.4±2.5
$MgSO_4$ 150 mg, GCB 2.5 mg	91.7±4.8	96.3±1.6
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg, C_{18} 25 mg	93.3±5.9	97.9±2.1
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg, GCB 2.5 mg	94.3±1.3	97.7±0.6
$MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 25 mg, GCB 2.5 mg	88.9±2.9	94.1±2.8
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 50 mg, C_{18} 50 mg, GCB 7.5 mg	91.9±2.5	86.1±2.9

[a] Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

acetate 버퍼를 이용하여 추출하는 AOAC법, citrate 버퍼를 이용하여 추출하는 EN법[18-20]을 비교하였다. 5가지 대표 농산물인 현미, 감자, 대두, 감귤, 고추를 이용하여 세 가지 QuEChERS법의 회수율을 비교한 결과(Table 3), 모두 만족할 만한 추출 효율을 보였다.

Tang과 Kebarle[21]에 의해 처음 설명된 matrix effect는 검체를 LC-MS/MS로 분석할 때 나타나는 이온 억압 또는 증강 현상을 의미한다. 이온 억압은 질량분석기의 검출기까지 도달하는 이온의 양이 감소하는 현상을 말하며, 이와 반대되는 현상을 이온 증강 현상이라고 한다[22]. 이 값이 -20%에서 20% 사이인 경우 matrix effect가 없음을 의미하며, -50%에서 -20% 또는 20%에서 50% 범위는 중간정도, -50% 미만 또는 50% 초과인 경우 높음을 의미한다[23]. 이는 회수율을 감소시키거나 간섭 피크를 발생시켜 결과 오류를 일으킬 수 있으므로 matrix effect를 효과적으로 평가하는 것은 LC-MS/MS 검사법 평가의 중요한 과정이다[22]. 5가지 시료에 대하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 mg/L의 농도로 matrix effect를 비교한 결과는 Table 4에 나타내었다. 그 결과, 딤프로피리다즈의 경우 감자에서는 높은 정도, 감귤과 고추에서는 중간 정도의 matrix effect가 나타난 반면, 사이클로뷰트리플루람의 경우 현미를 제외하고 matrix effect가 없었다. 이는 딤프로피리다즈가 matrix와 상호작용하여 신호를 억제했기 때문이라고 사료된다[23].

정제조건 확립을 위해 표준용액을 이용하여 $MgSO_4$와 PSA, C_{18}, GCB를 각각 혼합한 조건으로 정제 효율을 비교한 결과, 모두 만족할 만한 추출 효율을 보였다(Table 5). 따라서 식품공전 농약 시험법의 동시다성분 시험법 7.1.2.2에 적용될 수 있도록 추출 방법은 EN 15662법으로 정제 방법은 $MgSO_4$ 및 PSA를 혼합한 조건을 최종 추출 및 정제조건으로 확립하였다.

기기분석조건 확립

딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 Log P_{ow} 값은 각각 1.1과 3.2인 극성-중간극정 및 비극성 화합물로 구조내 >C=O 같은 발색단이 포함되어 있어 liquid chromatograph-UV/visible detector (LC-UVD)로 분석이 가능할 것으로 판단되었다. 하지만 비교적 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며, 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 분석용 컬럼으로는 잔류분석법에 많이 이용하는 C_{18} 역상컬럼을 선택하였고, 용리 방식은 5 mM 암모늄 아세테이트와 0.1% 포름산을 함유한 메탄올과 5 mM 암모늄 아세테이트와 0.1% 포름산을 함유한 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 딤프로피리다즈 분자는 $[M+H]^+$를 사이클로뷰트리플루람 분자는

Table 6. MRM conditions of dimpropyridaz and cyclobutrifluram for analysis in ESI positive mode

Compound	Ionization mode	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[a] (eV)
Dimpropyridaz	+	4.4	301.4	301.1	302	109[b]	20
						179	15
						206	15
Cyclobutrifluram	-	6.4	389.2	388.0	387	215[b]	12
						146	18

[a] Collision energy.
[b] Quantification ion.

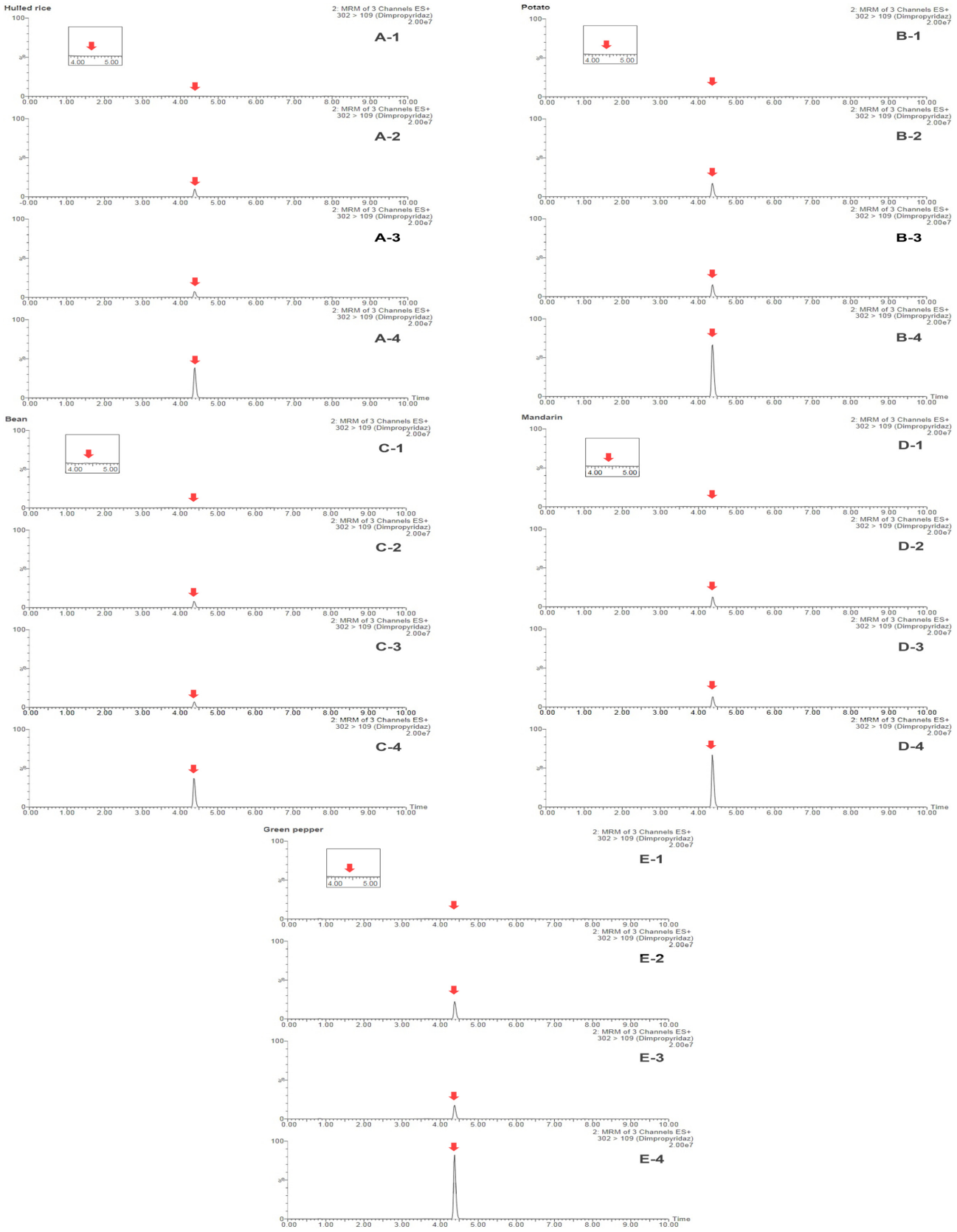


Fig. 1. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms of dimpropyridaz (302>109) corresponding to : (1) Matrix-matched control, (2) Matrix–matched standard solution at 0.005 or 0.01 mg/L, (3) Sample spiked at 0.01 mg/kg (4) Sample spiked at 0.1 mg/kg in (A) Hulled rice, (B) Potato, (C) Soybean, (D) Mandarin and (E) Green pepper.

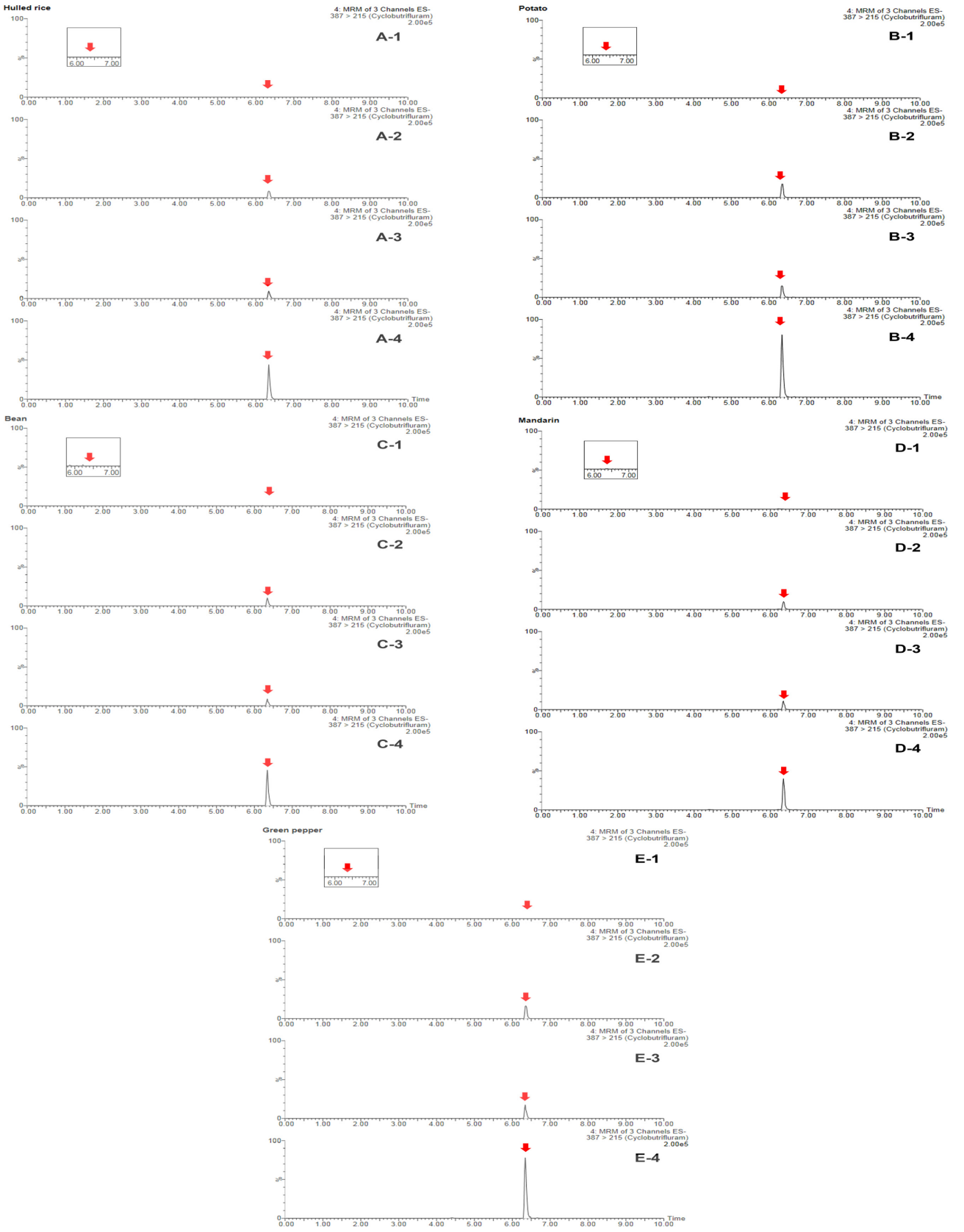


Fig. 2. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms of cyclobutrifluram (387>215) corresponding to : (1) Matrix-matched control, (2) Matrix–matched standard solution at 0.005 or 0.01 mg/L, (3) Sample spiked at 0.01 mg/kg (4) Sample spiked at 0.1 mg/kg in (A) Hulled rice, (B) Potato, (C) Soybean, (D) Mandarin and (E) Green pepper.

$[M-H]^-$ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 ESI법의 positive-ion 및 negative-ion mode를 사용하였고, 확립한 분석 조건을 바탕으로 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 딤프로피리다즈의 관측 질량은 301이고 사이클로뷰트리플루람의 관측 질량은 388이며, 혼합 표준용액(0.1 mg/L)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량 검출기에 직접 주입한 결과 각각 302 *m/z*, 387 *m/z* 값으로 확인하였다. 이때 cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 30 V, 10 V에서 최대 peak가 나타남을 확인하였다. 최적화된 cone voltage 상태에서 분석의 선택성과 검출 강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 multiple reaction monitoring (MRM) mode로 분석하였으며, collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량 이온(quantification ion)으로,

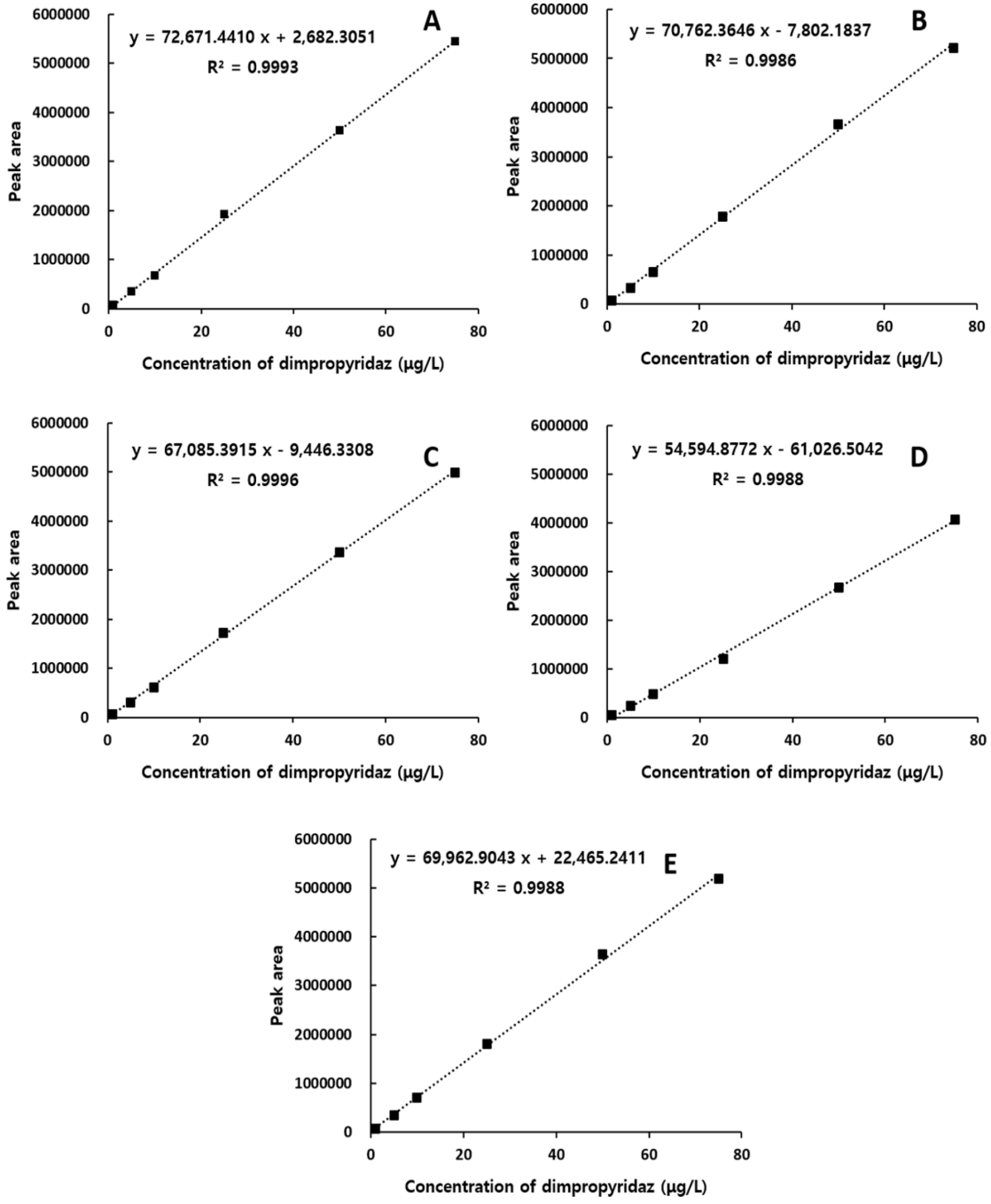


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of dimpropyridaz in (A) Hulled rice, (B) Potato, (C) Soybean, (D) Mandarin and (E) Green pepper.

다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성 이온(qualification ion)으로 설정하여 확인하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 2에 나타내었고, 분석 조건에서 선정된 특성 이온과 최적의 collision energy는 Table 6에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강 현상이 나타날 수 있으므로 5품목의 농산물 검체에 대해 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

시험법 유효성 검증

딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 선택성은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교함으로써 평가하였다. 무처리 시료와 회수율 시료를 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 검체 중 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 머무름 시간과 질량 대 전하비(m/z)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않았으므로 검체 중 딤프로피리다

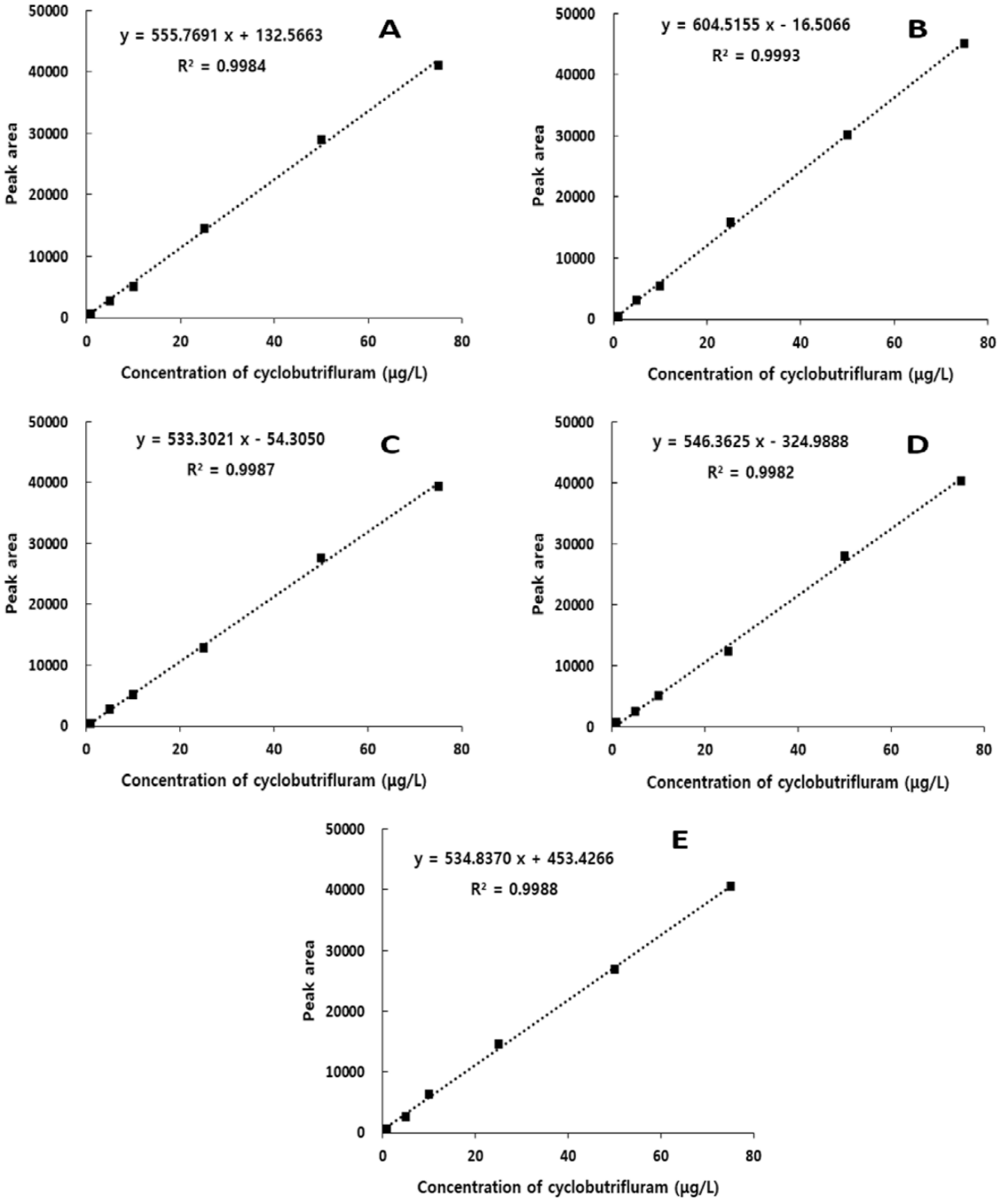


Fig. 4. Matrix-matched calibration curves of cyclobutrifluram in (A) Hulled rice, (B) Potato, (C) Soybean, (D) Mandarin and (E) Green pepper.

Table 7. Validation results of analytical method for the determination of dimpropyridaz residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[a] (%)			Ave[e] (%)	CV[f] (%)	LOQ[g] (mg/kg)
		Lab. A[b]	Lab. B[c]	Lab. C[d]			
Hulled rice	0.01	81.0±1.3	99.4±0.9	86.9±2.6	87.6	9.2	0.01
	0.1	81.8±1.3	99.2±0.8	94.4±1.9	89.9	9.0	
	0.5	82.2±3.8	99.5±0.1	102.6±0.6	92.5	10.9	
Potato	0.01	82.2±2.1	80.5±1.5	95.8±0.7	85.5	7.9	
	0.1	85.0±7.2	88.4±2.6	92.1±0.9	87.9	5.8	
	0.5	82.6±2.4	98.1±1.6	86.2±0.7	87.8	7.9	
Soybean	0.01	84.6±1.7	97.8±2.3	93.8±3.4	90.7	7.0	
	0.1	84.7±2.2	100.6±2.2	96.3±0.7	92.2	8.2	
	0.5	86.7±2.9	105.2±1.0	93.8±1.6	93.7	8.8	
Mandarin	0.01	93.4±2.3	89.8±0.8	92.2±1.4	92.1	2.3	
	0.1	94.8±1.1	103.6±2.7	94.1±0.9	97.0	4.6	
	0.5	83.6±2.6	101.1±1.3	90.9±1.3	90.4	8.6	
Green pepper	0.01	91.5±1.1	86.7±2.9	100.2±0.9	92.6	6.0	
	0.1	96.0±1.4	87.1±2.0	99.6±2.6	94.5	5.6	
	0.5	98.4±1.3	106.6±2.2	101.6±0.9	101.5	3.8	

[a] Mean values of 5 or 3 times repetitions with relative standard deviation.
[b] Ministry of Food and Drug Safety.
[c] Gwangju Regional Food and Drug Administration.
[d] Incheon Metropolitan City Institute of Public Health and Environment.
[e] Recovery average of inter-laboratory.
[f] Coefficient of variation of inter-laboratory.
[g] Limit of quantification.

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

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[a] (%)			Ave[e] (%)	CV[f] (%)	LOQ[g] (mg/kg)
		Lab. A[b]	Lab. B[c]	Lab. C[d]			
Hulled rice	0.01	84.9±5.1	88.6±7.2	88.1±4.2	86.8	5.3	0.01
	0.1	83.1±3.8	88.0±4.7	110.5±1.9	91.9	13.6	
	0.5	83.8±6.2	97.3±9.2	101.3±2.2	92.3	10.6	
Potato	0.01	82.3±5.8	103.4±1.9	108.6±4.4	95.2	13.7	
	0.1	81.6±8.8	94.8±1.1	105.9±0.4	91.8	12.6	
	0.5	83.0±6.9	86.2±3.9	101.8±2.5	89.0	10.4	
Soybean	0.01	96.8±6.3	87.9±0.9	111.8±1.3	98.8	10.3	
	0.1	97.3±6.0	97.3±4.5	103.1±3.5	98.9	5.3	
	0.5	98.9±9.2	90.6±2.1	95.9±3.8	95.8	7.3	
Mandarin	0.01	102.9±6.1	111.0±2.3	115.4±3.2	108.5	6.6	
	0.1	95.2±4.2	106.6±5.7	105.7±2.9	101.2	6.9	
	0.5	94.0±4.9	99.3±4.5	98.4±2.6	96.7	4.6	
Green pepper	0.01	98.8±4.0	100.0±3.8	100.2±0.7	99.5	3.1	
	0.1	105.7±4.7	103.4±3.4	103.0±3.9	104.3	4.0	
	0.5	99.9±5.9	98.6±5.5	102.0±1.9	100.1	4.7	

[a] Mean values of 5 or 3 times repetitions with relative standard deviation.
[b] Ministry of Food and Drug Safety.
[c] Gwangju Regional Food and Drug Administration.
[d] Incheon Metropolitan City Institute of Public Health and Environment.
[e] Recovery average of inter-laboratory.
[f] Coefficient of variation of inter-laboratory.
[g] Limit of quantification.

즈와 사이클로뷰트리플루람을 분석하기 위해 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1, 2). Matrix-matched 표준용액의 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 표준원액을 검체 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 및 0.075 mg/L 2 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과, 모든 농산물 시료 표준용액에서 결정계수(R^2) 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 3, 4).

이러한 결과는 positive list system (PLS) 도입에 따라 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 농산물의 관리기준인 0.01 mg/kg 이하를 만족할 수 있는 수준이다. 시험법의 정확성과 재현성 및 효율성을 평가하기 위하여 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배 수준인 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 회수율 실험을 5반복으로 수행하였다. LOQ 10배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 2배, LOQ 50배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 10배 희석하여 검량선의 범위 내에서 정량하였다. 각 농도에서 딤프로피리다즈의 평균 회수율은 81.0-98.4%, 상대표준편차는 7.2% 이하였다. 사이클로뷰트리플루람의 평균 회수율은 81.6-105.7%, 상대표준편차는 9.2% 이하로 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람 모두 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993)[25]의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인[24]에 적합함을 확인하였다(Table 7, 8).

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성을 검증하기 위해 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과 및 인천보건환경연구원 약품분석과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 타 실험실에 동일하게 제공한 후 분석한 회수율 및 상대표준편차를 비교하여 확인한 결과 세 실험실간 딤프로피리다즈의 평균 회수율은 85.5-101.5%, 사이클로뷰트리플루람은 86.8-108.5% 변이계수(CV)는 각각 10.9%, 13.7% 이하로 나타났다(Table 7, 8). 따라서 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993)[25]에서 제시한 실험실간 검증 기준 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인[24]에서 제시한 검증 기준에 만족함을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 2024년도 식품의약품안전평가원 “식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(22191농축산316)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

딤프로피리다즈는 pyrazole carboxamide 계열 살충제로 활성형은 TRPV 상류 부위를 표적으로 하여 신호전달을 차단하며 진딧물 등의 해충 방제에 효과적이다. 사이클로뷰트리플루람은 phenethyl pyridineamide 계열 살충제로 미토콘드리아 전자 수송 사슬복합체 II의 호흡작용을 저해한다. 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람에 대한 국내 잔류물의 정의는 모화합물이며, 각각 수박, 호박잎 등 29품목에 대하여 0.03-7.0 mg/kg, 배추 등 6품목에 대하여 0.03 mg/kg으로 잔류허용기준이 설정되어 있다. 본 연구에서는 농산물 중 딤프로피리다즈와 사이클로뷰트리플루람의 잔류량을 분석하기 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다. 딤프로피리다즈 및 사이클로뷰트리플루람을 분석하기 위하여 아세토니트릴을 추출용매로 사용하는 QuEChERS법을 이용하여 추출 및 정제조건을 확립한 후, LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였다. 딤프로피리다즈 및 사이클로뷰트리플루람의 결정계수(R^2)는 모두 0.99 이상으로 우수하였으며, 정량한계는 0.01 mg/kg으로 나타났다. 대표 농산물 5종(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배 수준으로 처리하여 회수율 실험을 한 결과 딤프로피리다즈의 평균 회수율은 85.5-101.5%, 사이클로뷰트리플루람은 86.8-108.5%을 보였으며, 변이계수(coefficient of variation, CV)는 각각 10.9%, 13.7% 이하로 나타났다. 본 연구의 결과는 국제식품규격위원회 농약 분석법 가이드라인[25]의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인[24]에 적합한 수준이다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Sun Young Gu https://orcid.org/0000-0002-0070-2462
Su Jung Lee https://orcid.org/0000-0002-5325-8342
Chae Young Park https://orcid.org/0000-0001-7161-3478
Jung Mi Lee https://orcid.org/0000-0003-2840-5010
Yun Mi Chung https://orcid.org/0000-0001-5118-5197
Gui Hyun Jang https://orcid.org/0000-0002-4974-3097
Miok Eom https://orcid.org/0009-0004-8517-7282

References

1. Umetsu, N., Shirai, Y., Development of novel pesticides in the 21st century. *J. Pestic. Sci.*, **45**, 54-74 (2020).
2. Tang, J., Zhang, Q., Qu, C., Su, Q., Luo, C., Wang, R.,

Knockdown of one cytochrome P450 gene CYP6DW4 increases the susceptibility of Bemisia tabaci to dimpropyridaz, a novel pyridazine pyrazolecarboxamide insecticide. *Pestic. Biochem. Physiol*., **201**, 105888 (2024).
3. Hwang, S.H., Ryu, S.Y., Seo, D., Kim, S.Y., Lee, J.H., Cho, Y.S., Development of a method using QuEChERS and LC–MS/MS for analysis of per-and polyfluoroalkyl substances in rice matrix. *Food Chem.*, **445**, 138687 (2024).
4. Hrynko, I., Ilyasova, G., Jankowska, M., Rutkowska, E., Kaczyński, P., Łozowicka, B., Behavior of thiamethoxam and clothianidin in young oilseed rape plants before flowering, monitored by QuEChERS/LC–MS/MS protocol. *Agriculture*, **14**, 759 (2024).
5. Su, Y., Lu, J., Liu, J., Li, F., Wang, N., Lei, H., Shen, X., Optimization of a QuEChERS–LC–MS/MS method for 51 pesticide residues followed by determination of the residue levels and dietary intake risk assessment in foodstuffs. *Food Chem.*, **434**, 137467 (2024).
6. Júnior, E.F., Bitencourt, V. S., de Souza, Á.B.M., Caldas, E. D., Target analysis of psychoactive drugs in oral fluid by QuEChERS extraction and LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **244**, 116139 (2024).
7. Tsiantas, P., Bempelou, E., Doula, M., Karasali, H., Validation and simultaneous monitoring of 311 pesticide residues in loamy sand agricultural soils by LC-MS/MS and GC-MS/MS, combined with QuEChERS-based extraction. *Molecules*, **28**, 4268 (2023).
8. Deveci, B., Golge, O., Kabak, B., Quantification of 363 pesticides in leafy vegetables (dill, rocket and parsley) in the Turkey market by using QuEChERS with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Foods*, **12**, 1034 (2023).
9. Aslantas, S., Golge, O., González-Curbelo, M.Á., Kabak, B., Determination of 355 pesticides in lemon and lemon juice by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Foods*, **12**, 1812 (2023).
10. Yang, Y., Lin, G., Liu, L., Lin, T., Rapid determination of multi-antibiotic residues in honey based on modified QuEChERS method coupled with UPLC–MS/MS. *Food Chem.*, **374**, 131733 (2022).
11. Wu, Y., An, Q., Li, D., Kang, L., Zhou, C., Zhang, J., Pan, C., Multi-residue analytical method development and risk assessment of 56 pesticides and their metabolites in tea by chromatography tandem mass spectroscopy. *Food Chem.*, **375**, 131819 (2022).
12. Zhao, H., Zhao, Z., Li, X., Di, S., Qi, P., Wang, Z., Wang, J., Tian, P., Xu, H., Wang, X., Development of rapid low temperature assistant modified QuEChERS method for simultaneous determination of 107 pesticides and relevant metabolites in animal lipid. *Food Chem.*, **395**, 133606 (2022).
13. Harischandra, N.R., Pallavi, M.S., Bheemanna, M., Pavan-Kumar, K., Reddy, V.C.S., Udaykumar, N.R., Paramasivam, M. Yadav, S., Simultaneous determination of 79 pesticides in pigeonpea grains using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Food Chem.*, **347**, 128986 (2021).
14. Hu, M., Qiu, J., Zhang, H., Fan, X., Liu, K., Zeng, D., Tan, H., Method development and validation of indaziflam and its five metabolites in soil, water, and fruits by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 10300-10308 (2018).
15. Guo, Q., Zhao, S., Zhang, J., Qi, K., Du, Z., Shao, B., Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A*, **35**, 1543-1552 (2018).
16. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, **86**, 412-431 (2003).
17. Wilkowska, A., Biziuk, M., Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.*, **125**, 803-812 (2011).
18. Rejczak, T., Tuzimski, T., A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.*, **13,** 980-1010 (2015).
19. Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Leepipatpiboon, N., Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 2548-2560 (2010).
20. Lehotay, S.J., Maštovská, K., Lightfield, A.R., 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. *J. AOAC Int.*, **88**, 615-629 (2005).
21. Tang, L., Kebarle, P., Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.*, **65**, 3654-3668 (1993).
22. Moon, S.Y., Choi, H.J., Kim, S.R., Lee, K.H., Lee, S.G., Song, S.H., Lee, S.Y., Park, H.D., Recommendations for liquid chromatography-mass spectrometry in the clinical laboratory: part II. Method validation. *Lab. Med. Online*, **10**, 95-108 (2020).
23. Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Girón, A.J., Fernández-Alba, A.R., Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 7634-7639 (2011).
24. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2016. Guidelines on standard procedures for preparing analysis method, Cheongju, Korea
25. CODEX Alimentarius Commission, 2010. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Roma, Italy, pp. 1-36.