pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 3, pp. 242~250 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.3.242

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

# LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 제초제 fenquinotrione 및 대사산물 KIH-3653-M-2 동시시험법 개발

**박지수 · 도정아* · 이한솔 · 조성민 · 신혜선 · 장동은 · 정용현 · 이강봉**
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

# Development of a Simultaneous Analytical Method for Determination of Herbicide Fenquinotrione and KIH-3653-M-2 Residues in Agricultural Crops using LC-MS/MS

Ji-Su Park, Jung-Ah Do*, Han Sol Lee, Sung Min Cho, Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Yong-hyun Jung, Kangbong 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, Korea*
(Received March 4, 2019/Revised March 20, 2019/Accepted April 26, 2019)

**ABSTRACT** - An analytical method was developed for the determination of fenquinotrione, a triketone herbicide, in agricultural products. Fenquinotrione was metabolized to KIH-3653-M-2 in plants. Analyte extraction was conducted using 2% formic acid in acetonitrile and cleaned up using a hydrophillic-lipophillic balance (HLB) cartridge. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.004 and 0.01 mg/kg, respectively. Matrix-matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.001~0.1 μg/mL) into a blank extract with $r^2$>0.99. The recovery results for fenquinotrione and KIH-3653-M-2 ranged between 81.1 to 116.2% and 78.0 to 110.0% at different concentration levels (LOQ, 10×LOQ, 50×LOQ) with relative standard deviation (RSD) less than 4.6%. All values were corresponded with the criteria ranges requested in both the Codex (CAC/GL 40-1993, 2003) and MFDS guidelines (2016). Therefore, the proposed method can be used as an official analytical method for determination of fenquinotrione in the Republic of Korea.

**Key words :** Fenquinotrione, Fenquinotrione metabolite, LC-MS/MS, Herbicide, Analytical method, Agricultural product

Fenquinotrione(2-[8-chloro-4-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carbonyl]cyclohexane-1,3-dione)은 triketone계 제초제로 quinoxaline 구조에 phenyl기가 치환된 새로운 구조의 화합물이다. 대사산물 KIH-3653-M-2(8-chloro-4-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3,4-digydroquinoxaline-2-carboxylic acid)는 fenquinotrione의 quinoxaline 구조에 cyclohexadione이 –COOH로 치환되어 생성된다(Fig. 1). Fenquinotrione은 클로로필(chlorophyll)이 흡수한 빛 에너지를 화학에너지로 전환시키는 물질(plastoquinone)의 생합성 경로에 작용하는 효소인 4-HPPD(4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase)를 저해하고 간접적으로 카로티노이드 생합성에 영향을 주어 백화현상을 일으켜 고사시키는 작용을 한다. 또한 벼 재배지에서 ALS (acetolactate synthase; 아미노산 생합성 관여 효소) 저항성 광엽 잡초에 대해 높은 약효가 있다[1]. 독성의 경우 Food Safety Commission of Japan (FSCJ)에서 신경독성(neurotoxicity), 기형유발성(teratogenicity), 생식독성(fertility), 유전독성(genotoxicity)이 없는 것으로 평가하였고, 2세대에 걸친 랫드 번식독성시험에서 각막염에 지속적인 자극으로 인하여 발생한 종양에 대한 영향을 근거로 NOAEL (The no-observed-adverse-effect level)을 0.166 mg/kg bw/day로 설정하고, 이에 안전계수 100을 고려하여 ADI (Acceptable daily intake)를 0.0016 mg/kg bw/day로 설정하였다[2]. 2019년 현재 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex),

*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, Cheongju, Chungcheongbuk-do, 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4211, Fax:82-43-719-4200
E-mail: jado@korea.kr

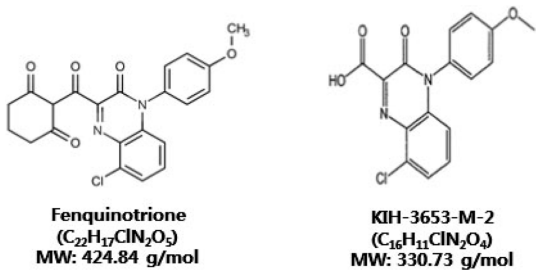


**Fig. 1.** Structures of fenquinotrione and KIH-3653-M-2.

유럽(European Community, EC), 미국(Environmental Protection Agency, EPA)에는 별도의 기준이 설정되어 있지 않으나 일본(The Japan Food Chemical Research Foundation, JFCRF)에서는 잔류허용기준이 현미에 0.01 mg/kg으로 설정되어 있고 잔류물의 정의를 모화합물로 규정하고 있다. 국내의 경우 쌀에 대한 잔류허용기준이 설정될 예정이며 농산물 중의 잔류물의 정의는 fenquinotrione 모화합물로 관리할 예정이다. 본 연구에서는 향후 대사산물 안전관리를 고려하여 fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2의 동시시험법을 확립하고자 하였다. Fenquinotrione 시험법에 관한 선행 연구는 국내·외 보고되어 있지 않으나 국내·외 triketone계 제초제에 대한 연구가 보고된 바 있다. 국내의 경우 mesotrione과 tefuryltrione에 대하여 쌀, 옥수수에 기준이 설정되어 있으며 시험법은 식품공전 잔류농약시험법 7.1.4.117과 7.1.4.179에 고시되어 있다[3,4]. Mesotrione의 경우 pH를 조절 후 아세토니트릴을 이용하여 추출 후 silica 컬럼을 이용하여 간섭물질을 제거하였고, tefyryltrione의 경우 포름산 함유한 아세토니트릴로 추출 후 florisil 카트리지를 이용하여 정제하였다. 국외의 경우 Luciana 등[5]과 Hanna 등[6]이 sulcotrione과 mesotrione을 지표수에서 HLB (Hydrophillic lipophillic balance) 카트리지로 정제하여 LC-MS/MS로 분석한 방법이 보고되어 있지만 fenquinotrione을 식품 중에서 분석한 문헌은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 fenquinotrione의 안전관리를 위해 국내 잔류농약 검사시 적용가능하도록 대표농산물 5품목(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 fenquinotrione의 잔류 시험법을 확립하고자 하였다.

## Materials and Methods

### 시약 및 재료

Fenquinotrione(99.87%) 및 KIH-3653-M-2(99.91%) 표준품은 Kumiai Chemical Industry Co., Ltd 사(Tokyo, Japan)에서 제공받아 사용하였고 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였으며 염화나트륨(sodium chloride), 무수황산마그네슘(magnesium sulfate anhydrous)은 Junsei (Tokyo, Japan), 포름산(formic acid, FA)은 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. PSA (primary secondary amine)는 Agilent Technologies(Santa clara, CA, USA)에서 구입하였고, GCB (graphitized carbon black)와 $C_{18}$ (octadecyl)은 Waters (Leinster, Ireland)에서 구입하였다. Syringe filter (Nylon, 0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma (SantCugat Del Valles, Barcelona, Spain)에서 구입하여 사용하였다. SPE (solid phase extraction) 카트리지는 Waters (Milford, MA, USA) 제품을 각각 구입하여 사용하였다. 추출 시 진탕장비로는 Eyela사 MMV-1000W (Tokyo, Japan)을 사용하였다. 식품공전 상에서 식물성 원료로 분류하고 있는 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류)를 무농약 검체로 구입하였다. 이를 균질화하여 밀봉된 용기에 담아 -50°C에 보관한 후 실험에 사용하였다.

### 표준원액 및 표준용액의 조제

Fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2 표준품을 각각 20.03 mg, 20.02 mg을 20 mL의 아세토니트릴에 용해하여 1,000 μg/mL (1,000 ppm)의 표준원액을 조제하였다. 각 표준원액 1,000 μg/mL을 혼합하여 100 μg/mL가 되게 희석하여 혼합표준용액으로 하였다. 0.0025, 0.005, 0.01, 0.05 및 0.1 μg/mL의 농도가 되도록 검체의 무처리 추출물(matrix)로 희석하여 90% 이상의 matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색 vial에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 추출 및 정제

검체를 균질화한 후 5 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 5 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고 2% 포름산 함유 아세토니트릴 20 mL를 가하여 10분간 진탕하였다. 곡류 및 두류의 경우 증류수 10 mL로 습윤화하여 방치하지 않고 위 과정을 진행하였다. 진탕 후 무수황산마그네슘($MgSO_4$) 4 g과 염화나트륨(NaCl) 4 g을 첨가하여 1분간 강하게 흔든 뒤 4°C, 4,500 *G*에서 10분간 원심분리하였다. 아세토니트릴 5 mL로 미리 활성화시킨 HLB (Hydrophillic-lipophillic balance) 카트리지(500 mg, 6 cc)에 추출액 5 mL를 흡착시켜 받은 후 메탄올 5 mL를 용출시켜 받았다. 10 mL로 최종 부피를 맞춘 후 syringe filter (nylon, 0.2 μm)로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다.

### LC-MS/MS 분석조건

분석기기는 Shidmadzu사(Kyoto, Japan)의 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tamdem mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 사용하였고, 분석용 컬럼은 Unison UK-$C_{18}$ (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 μm, Imtakt,

Kyoto, Japan)을 선택하였으며 컬럼 온도는 40℃를 유지하였다. 이동상으로는 0.1% 포름산 함유 물과 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴을 이동상으로 사용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 electrospray ionization(ESI)법의 positive-ion mode를 사용하여 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 선택한 후 정량이온(quantification ion) 및 정성이온(qualification ion)을 선택하여 MRM (multiple reaction monitoring) 조건을 확립하였다. LC-MS/MS 분석 기기조건은 Table 1과 같다.

### 시험법의 유효성 검증

본 연구는 'CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)'[7]과 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[8]을 토대로 시험법의 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확성(accuracy), 정밀성(precision) 및 반복성(repeatability)을 검증하였다. Fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2의 혼합표준원액을 0.001~0.1 μg/mL 농도가 되도록 검체의 무처리 추출액으로 희석하였다. 각 농도 범위에 대한 peak의 면적을 이용하여 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였고, 검량선의 결정계수($r^2$)를 구하였다. 또한 크로마토그램 상 신호 대 잡음비(S/N ratio)가 3, 10 이상의 농도를 각각 검출한계와 정량한계로 하였다. 시험법의 정확성 및 정밀성(반복성)을 검증하기 위해 대표 농산물 5품목의 무처리 시료에 대하여 fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2 혼합표준용액을 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배에 해당하는 농도로 처리하였다. 각각의 처리수준에 대하여 5반복으로 회수율 실험을 수행하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 시험법의 정확성과 정밀성(반복성)을 평가하였다.

## Results and Discussion

### 최적기기분석조건 확립

Fenquinotrione은 Log $P_{ow}$값이 2.73인 중간극성 화합물로 끓는점이 512°C의 온도로 매우 높아 기화되기 어렵고 분자 내 N을 함유하여 고온에서 변이될 가능성이 있으므로 GC 분석에 비해 HPLC 분석이 용이하다. 하지만 fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2을 간섭물질에 대한 영향을 배제하며 동시 분석이 가능하도록 높은 선택성을 가진 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선택하였다. 분석용 칼럼은 $C_{18}$ 역상칼럼을 선택하였고, 용리방식은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 하지만, fenquinotrione의 경우 컬럼 내 고정상과의 상호작용으로 용출시 크로마토그램 상 tailing 현상이 관찰되었다. Peak tailing 현상을 해결하고자 여러 컬럼을 검토하였으며 Unison UK-$C_{18}$ (Imtakt, Kyoto, Japan) 컬럼을 사용시 peak tailing 현상이 개선되었으며 좌우 대칭되는 peak shape를 얻을 수 있었다. Fenquinotrione의 관측질량은 424.08 g/mol, KIH-3653-M-2는 330.04 g/mol으로 각 표준용액(1 μg/mL)을 일정한 속도(10 μL/min)로 컬럼을 통과시키지 않고 질량검출기에 직접 주입한 결과, 이동상에 사용된 포름산의 protonation enhancer의 영향으로 각각 $[M+H]^+$형태인 425.10, 331.20 *m/z* 값으로 확인하였다. 분석의 선택성과 검출강도의 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM mode로 분석하였다. Collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온으로 설정하여 확인하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성이온은 Table 2에 나타내었다.

**Table 1.** LC-MS/MS parameters for the analysis of fenquinotrione and KIH-3653-M-2

| Condition | Content | | |
|---|---|---|---|
| Instrument | LC: Nexera X2 UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)<br>MS/MS: LCMS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan) | | |
| Chromatographic separation | | | |
| Column | Unison UK-$C_{18}$ (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3 μm) | | |
| Flow rate | 0.3 mL/min | | |
| Injection volume | 1 μL | | |
| Oven temp. | 40°C | | |
| Mobile phase | A: 0.1% formic acid in acetonitrile<br>B: 0.1% formic acid in water | | |
| Gradient | Time(min) | A(%) | B(%) |
| | 0.0 | 20 | 80 |
| | 3.0 | 20 | 80 |
| | 3.5 | 100 | 0 |
| | 7.0 | 100 | 0 |
| | 8.0 | 20 | 80 |
| | 10.0 | 20 | 80 |
| MS/MS condition | | | |
| Interface temp. | 150°C | | |
| Heating block temp. | 400°C | | |
| Desolvation line temp. | 250°C | | |
| Heating gas flow | 10.0 L/min | | |
| Nebulizer gas flow | 3.0 L/min | | |

**Table 2.** MRM (multiple reaction monitoring) conditions of fenquinotrione and KIH-3653-M-2 for analysis in ESI positive mode

| Compound | Molecular weight (g/mol) | Exact mass (g/mol) | Precursor ion (*m/z*) | Product ion (*m/z*) | CE[1)] (eV) |
|---|---|---|---|---|---|
| Fenquinotrione | 424.8 | 424.08 | 425.10 | 285.00[2)] | 30 |
| | | | | 257.05 | 36 |
| | | | | 313.00 | 22 |
| KIH-3653-M-2 | 331.7 | 330.04 | 331.20 | 287.10[2)] | 18 |
| | | | | 259.10 | 28 |
| | | | | 313.30 | 14 |

[1)]Collision energy(eV), [2)]Quantification ion.

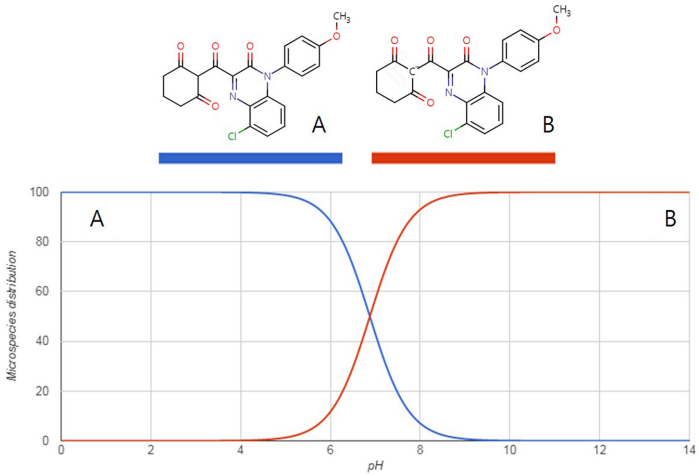


**Fig. 2.** pKa graph of fenquinotrione.

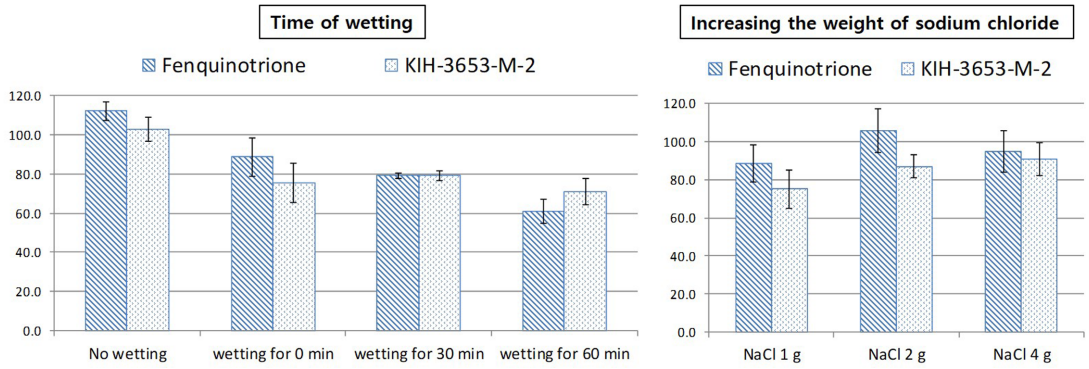


**Fig. 3.** Comparison of recovery by the time of wetting and the weight of sodium chloride in soybean sample.

## 추출 조건 확립

Fenquinotrione은 pH 5 이하에서 비이온 상태로 존재하는 화합물이며 그 대사산물인 KIH-3653-M-2는 물리화학적 특성이 제시되어있지 않아 모화합물의 특성에 근거하여 화합물을 추출하였다(Fig. 2). 수분을 함유하고 있는 검체의 경우 검체 표면이 수분으로 수화되어 있어 침투성이 낮은 비극성 유기용매보다는 수용성 유기용매를 이용한 추출이 주로 사용되고 있다[9]. 대표적인 수용성 유기용매로는 아세토니트릴, 아세톤, 메탄올이 있으나 그 중 아세톤 추출 시 아세토니트릴에 비해 비극성 또는 극성의 간섭물질이 다량 추출되는 단점이 있어 정밀한 정제과정이 필요하다. Hanna 등[6]이 아세토니트릴을 이용하여 triketone계 제초제를 추출한 문헌을 참고하였으며 Kim등[10]은 산성을 띄는 화합물의 경우 추출액의 산의 비율을 높여 추출한 문헌을 참고하여 감귤 시료에서 아세토니트릴 및 포름산을 함유한 아세토니트릴의 추출 효율을 우선적으로

**Table 3.** Extract efficiency by percentage of formic acid in mandarin sample

| Compound | Recovery ± RSD[1)](%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ACN[2)] | 1% FA[3)] in ACN | 2% FA in ACN | 5% FA in ACN |
| Fenquinotrione | 89.5 ± 6.1 | 91.7 ± 5.3 | 92.9 ± 6.0 | 86.7 ± 3.2 |
| KIH-3653-M-2 | 74.2 ± 8.0 | 83.0 ± 2.5 | 83.7 ± 6.9 | 76.0 ± 4.8 |

[1)]Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.
[2)]Acetonitrile, [3)]Formic acid.

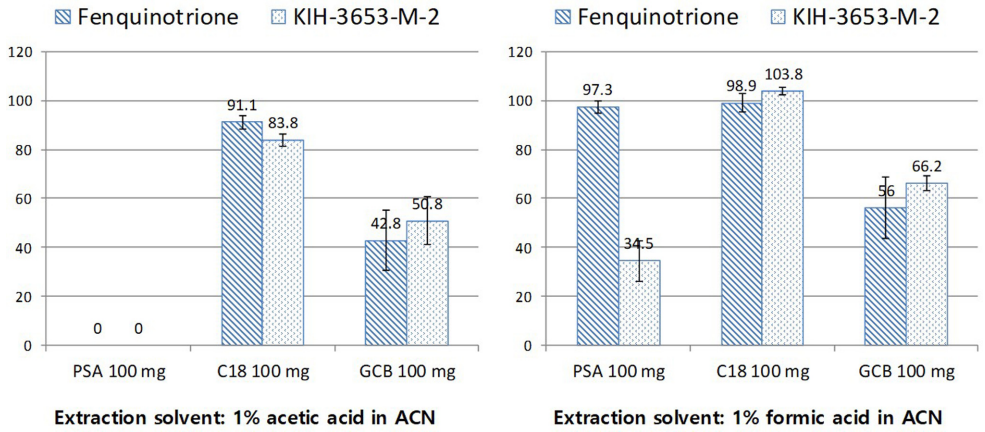


**Fig. 4.** Comparisons of extraction solvents and d-SPE for fenquinotrione and its metabolite(KIH-3653-M-2) analysis.

비교 검토하였다. 수용성 유기용를 비교한 결과, 추출 효율이 가장 좋은 2% 포름산 함유 아세토니트릴을 추출 용매로 선정하였다(Table 3). 또한 현미, 대두 등의 건조시료의 경우 습윤화 과정이 필요하므로 대두(두류)에서 물 10 mL를 첨가한 후 방치하는 시간에 따른 추출 효율을 비교한 결과 시간이 지남에 따라 fenquinotrione과 KIH-3653-M-2 모두 추출 효율이 감소하였다(Fig. 3). 습윤화 과정을 생략 시 추출 효율은 우수하였지만 건조시료(대두, 현미 등)의 경우 건조 상태에서 수용성 유기용매에 대한 추출 효율이 낮아 물을 넣어 습윤화하는 과정이 필요하므로[9] 이에 추출 효율을 높이기 위한 방법으로 추출 시 수용액층에 무수황산마그네슘을 첨가하여 검체 중 수분과 간섭물질을 제거하고, 화합물을 유기용매 쪽으로의 분배 효율 및 이온강도를 높이기 위하여 염화나트륨을 첨가하였다[11,12]. 염화나트륨의 양에 따른 추출 효율을 확인한 결과 4 g을 첨가하였을 때 대사산물의 추출 효율이 크게 증가하고 두 대상성분 모두 우수한 회수율을 보였다(Fig. 3). 위 결과를 토대로 2% 포름산 함유 아세토니트릴을 이용하여 추출한 후 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 4 g을 첨가하여 진탕 후 원심 분리하는 방법으로 추출 조건을 확립하였다.

## 정제 조건 확립

추출액 중 색소 및 유지 성분 등의 간섭물질을 제거하기 위하여 혼합표준용액에서 분산상 SPE 방법(dispersive solid phase extraction, d-SPE)을 적용하여[13] 정제하는 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)법을 검토하였다. 추출용액으로 아세토니트릴과 포름산 및 아세트산 함유 아세토니트릴을 비교하였다. 아세토니트릴을 추출 용액으로 사용하여 d-SPE 적용시 대상성분의 흡착으로 모두 회수할 수 없었으나 아세토니트릴에 1%의 산을 첨가하여 사용시 결과가 상이하였다. 아세트산을 첨가하였을 때 PSA에 대상 성분 모두 용출되지 않았고, 포름산 첨가하였을 때 PSA에서 모화합물의 경우 97.3%, 대사산물 34.5%로 용출되는 것을 확인하였다. 따라서 아세트산 보다 포름산 함유한 아세토니트릴의 경우 d-SPE로 사용되는 흡착제에 대하여 대상성분의 용출력이 큰 것으로 확인되었다(Fig. 4). 포름산의 농도를 2, 5%로 증가시켜 확인한 결과 5%의 포름산 농도에서 PSA에서 대사산물의 회수율이 86.0~91.5%까지 증가하였다. 따라서 포름산의 농도가 증가함에 따라 모화합물 및 대사산물의 용출이 우수함을 확인하였다(Table 4). 하지만 대표 농산물 시료에 적용 시 매트릭스에 의한 이온화 억압현상으로 분석 대상 성분의 *S/N*비가 크게 감소하여 분석법 정량한계 0.01 mg/kg이하를 만족할 수 없었다.

흡착 원리에 의한 간섭물질 정제를 위해 hydroxyl기를 작용기로 갖는 플로리실(florisil), 실리카(silica) 카트리지를 표준용액을 이용하여 검토하였으나 플로리실의 경우 대상성분 모두 용출되지 않았고, 실리카 500 mg 충진된 카트리지를 이용한 정제법을 확립하였다(Table 5). 확립된 실

**Table 4.** Comparisons of extraction solvents and d-SPE for fenquinotrione and its metabolite (KIH-3653-M-2) analysis

| d-SPE (mg) | | 2% formic acid in ACN[1](%) | | 5% formic acid in ACN(%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | F[2] | K[3] | F[2] | K[3] |
| PSA[4] | 100 | 112.5 ± 5.0 | 65.3 ± 2.7 | 106.2 ± 3.0 | 91.5 ± 2.9 |
| | 200 | 127.7 ± 5.0 | 42.4 ± 7.0 | 103.6 ± 2.3 | 86.0 ± 1.3 |
| | 400 | 124.3 ± 3.0 | 16.6 ± 3.6 | 103.7 ± 1.9 | 66.6 ± 1.4 |
| $C_{18}$ | 100 | 138.6 ± 2.8 | 109.9 ± 1.7 | 98.3 ± 1.2 | 103.4 ± 1.2 |
| | 200 | 131.9 ± 8.7 | 106.5 ± 1.5 | 100.7 ± 2.6 | 108.3 ± 2.5 |
| | 400 | 124.6 ± 6.4 | 110.5 ± 6.7 | 96.8 ± 0.9 | 109.1 ± 0.7 |
| GCB[5] | 100 | 97.9 ± 7.3 | 67.6 ± 6.1 | 70.1 ± 1.9 | 71.8 ± 1.4 |
| | 200 | 47.1 ± 8.7 | 42.0 ± 2.9 | 46.3 ± 1.1 | 54.2 ± 2.4 |
| | 400 | 18.2 ± 11.1 | 23.0 ± 7.8 | 23.1 ± 5.3 | 31.9 ± 5.4 |

[1]Acetonitrile, [2]Fenquinotrione, [3]KIH-3653-M-2, [4]Primary Secondary Amine, [5]Graphitized Carbon Black.

**Table 5.** Comparisons of elution solvents and silca cartridges for fenquinotrione and its metabolite (KIH-3653-M-2) analysis

| Solvent | Solvent ratio (v/v) | Fraction | Silica(%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 500 mg | | 1 g | |
| | | | F[1] | K[2] | F[1] | K[2] |
| ACN[3]/ dichloromethane | 0/100 | 1 (loading 5 mL) | -[4] | - | - | - |
| | 10/90 | 2 (10 mL) | - | - | - | - |
| | 20/80 | 3 (10 mL) | - | - | - | - |
| | 100/0 | 11 (10 mL) | - | - | - | - |
| 1% FA[3] in ACN | - | 12 (10 mL) | 106.9 | 102.1 | 45.6 | 61.5 |
| Total | | | 106.9 | 102.1 | 45.6 | 61.5 |

[1]Fenquinotrione, [2]KIH-3653-M-2, [3]FA: formic acid, ACN: acetonitrile, [4]Not detected

**Table 6.** Comparisons of elution solvents and cartridges ($C_{18}$ and HLB) for fenquinotrione and its metabolite (KIH-3653-M-2) analysis

| Fraction | $C_{18}$(%) | | | | | | | | HLB[1](%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ACN[2] | | 1% FA[3] in ACN | | MeOH[4] | | 1% FA in MeOH | | ACN | | MeOH | |
| | F[5] | K[6] | F[5] | K[6] | F[5] | K[6] | F[5] | K[6] | F[5] | K[6] | F[5] | K[6] |
| 1 (loading 5 mL) | -[7] | - | - | - | 39.5 | 76.5 | 53.0 | 77.2 | 68.3 | 64.6 | 62.3 | 69.9 |
| 2 (10 mL) | - | - | 74.0 | 83.5 | 37.2 | 22.8 | 60.8 | 24.2 | 39.7 | 27.6 | 34.3 | 31.6 |
| Total | - | - | 74.0 | 83.5 | 76.7 | 99.3 | 113.8 | 101.5 | 108.0 | 92.2 | 96.6 | 101.5 |

[1]Hydrophillic-lipophillic balance, [2]Acetonitrile, [3]Formic acid, [4]Methanol, [5]Fenquinotrione, [6]KIH-3653-M-2, [7]Not detected.

**Table 7.** Comparisons of recovery results for fenquinotrione and KIH-3653-M-2

| Compound | Recovery ± RSD[4](%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $C_{18}$ cartridge | | | | HLB[5] cartridge | | | |
| | MeOH[1] | | 0.1% FA in MeOH[1] | | ACN[1] | | MeOH | |
| | F[2] | K[3] | F[2] | K[3] | F[2] | K[3] | F[2] | K[3] |
| Brown rice | 27.6±67.0 | 62.1±38.4 | 57.7±10.5 | 64.0±17.1 | 74.7±12.3 | 57.2±17.6 | 101.1±4.1 | 85.7±6.1 |
| Potato | 80.1±2.8 | 82.0±7.5 | 89.4±5.4 | 92.1±2.3 | 102.6±8.7 | 106.2±1.6 | 77.8±7.6 | 94.4±0.0 |
| Soybean | 91.7±21.2 | 81.7±21.1 | 92.2±1.3 | 83.4±0.8 | 73.1±8.1 | 92.0±9.4 | 83.5±8.4 | 91.0±1.8 |
| Mandarin | 83.0±3.9 | 91.8±1.8 | 77.9±8.1 | 94.3±1.9 | 83.7±6.4 | 106.2±1.6 | 100.9±6.0 | 92.4±1.3 |
| Green pepper | 76.7±11.1 | 85.8±3.6 | 89.4±10.9 | 91.8±0.3 | 75.0±3.5 | 84.2±1.7 | 87.3±2.4 | 93.2±5.7 |

[1]Elution solvent, methanol (MeOH), formic acid (FA), acetonitrile (ACN), [2]Fenquinotrione, [3]KIH-3653-M-2,
[4]Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation, [5]Hydrophillic-lipophillic balance.

리카 카트리지(500 mg, 6 cc) 정제법을 감귤시료에 적용하여 회수율 실험 결과 모두 용출되지 않았다. 추가적으로 표준용액을 이용하여 분배 원리에 의한 $C_{18}$ (octadecyl) 카트리지와 흡착 원리에 의한 HLB (Hydrophillic lipophillic balance) 카트리지를 표준용액을 이용하여 검토하였다. $C_{18}$과 HLB에서 아세토니트릴보다 메탄올을 이용하여 용출하

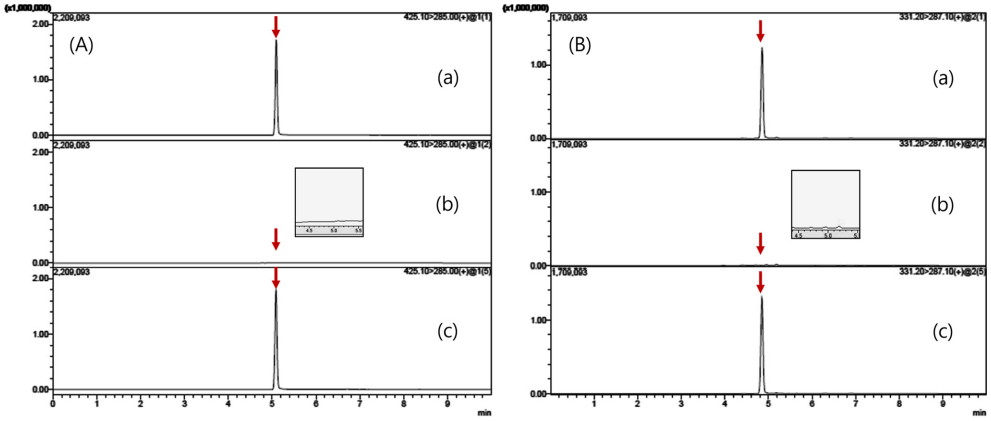


**Fig. 5.** Representative MRM (quantification ion) recovery chromatogram (fortification concentration: 0.5 mg/kg) of (A) fenquinotrione (425>285) and (B) KIH-3653-M-2 (331>287) in brown rice at (a) matrix-matched standard, (b) control and (c) recovery.

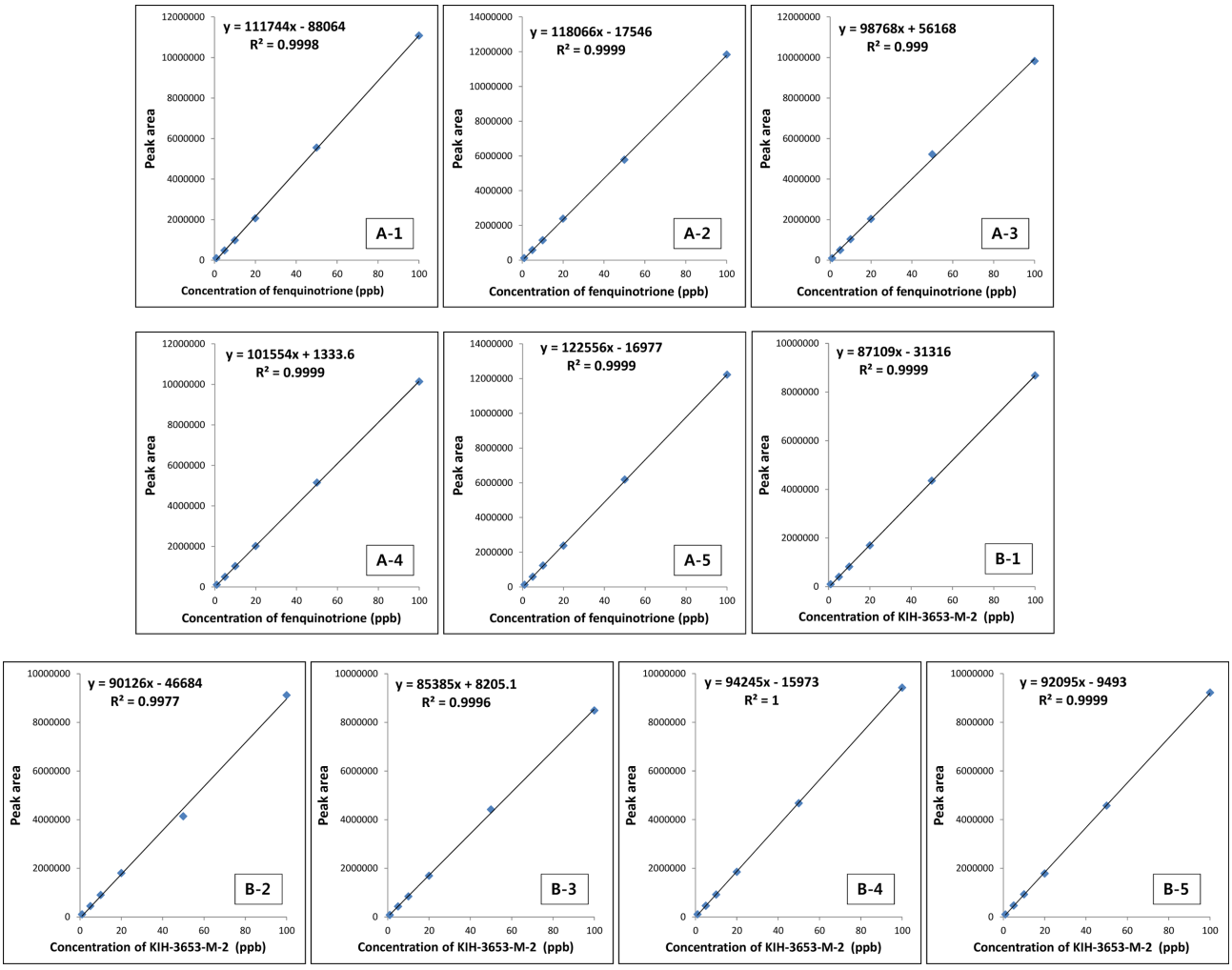


**Fig. 6.** Matrix-matched calibration curves of (A) fenquinotrione and (B) KIH-3653-M-2 in (1) brown rice, (2) potato, (3) soybean, (4) mandarin and (5) green pepper.

였을 때 회수율이 회수율이 우수하였다(Table 6). 하지만 시료를 적용 시 $C_{18}$ 카트리지로 정제하는 경우 시료에 따라 회수율에 차이가 있었으며 반복간의 편차가 크므로 재현성 있는 결과를 얻을 수 없었다(Table 7). 따라서 본 연구는 모든 농산물을 광범위하게 적용할 수 있는 시험법을 개발하고자 함으로 HLB 카트리지를 이용하여 메탄올로 용출하는 방법으로 선정하였다.

### 시험법 유효성 검증

Fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2의 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 선택성(selectivity)을 확인하였다. 무처리 시료 크로마토그램 상 fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 동일한 간섭물질이 검출되지 않아 본 시험법은 대상 성분을 분석함에 있어 높은 분리능과 선택성을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 혼합표준원액을 무처리 시험용액으로 희석하여 0.001~0.1 μg/mL으로 제조한 후 1 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 농산물 5품목 표준용액에서 결정계수($r^2$) 0.99이상으로 높은 직선성을 확인하였다(Fig. 6). Fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2의 검출한계는 기기의 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(*S/N* ratio)를 3 이상, 정량한계는 10 이상으로 결정하였다. 대표 농산물 5품목에 대하여 분석기기의 검출한계는 최소 기기검출농도 0.0005 μg/mL(*S/N*≥3)이었고 아래의 계산식에 따라 0.004 mg/kg이었으며, 정량한계는 최소검출농도가 0.00125 μg/mL(*S/N*≥10)으로 아래 계산식에 따라 0.01 mg/kg이었다.

검출한계 (mg/kg) = 최소기기검출농도 (mg/mL, *S/N*≥3) ×희석배수[1)]

$$= 0.0005\ (\text{mg/mL}) \times \left(\frac{20(\text{mL})}{5(\text{g})} \times \frac{10(\text{mL})}{5(\text{mL})}\right) = 0.004$$

정량한계 (mg/kg) = 최소검출농도(mg/mL, *S/N*≥10) ×희석배수[1)]

$$= 0.00125(\text{mg/mL}) \times \left(\frac{20(\text{mL})}{5(\text{g})} \times \frac{10(\text{mL})}{5(\text{mL})}\right) = 0.01$$

[1)]희석배수 = 희석부피(mL)/분취량(mL)

시험법의 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배 수준인 0.01, 0.1과 0.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수율 실험을 통해 시험법의 정확성, 정밀성 및 반복성을 평가하였다. 그 결과 fenquinotrione의 평균 회수율은 81.1~116.2%, KIH-3653-M-2의 평균 회수율은 78.0~110.0%이었다. RSD는 모두 4.6% 이하로(Table 8) Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40-1993, 2003)[7)] 및 식품의약품안전평가원 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'[8)]에 적합하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 농산물 중 잔류하는 fenquinotrione 및 대사산물 KIH-3653-M-2를 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다.

**Table 8.** Validation results of analytical method for the determination of Fenquinotrione and KIH-3653-M-2 residues in samples

| Sample | Fortification (mg/kg) | Recovery ± RSD[1)](%) | | LOQ[2)] (mg/kg) |
|---|---|---|---|---|
| | | Fenquinotrione | KIH-3653-M-2 | |
| Brown rice | 0.01 | 116.2 ± 1.8 | 110.0 ± 4.2 | 0.01 |
| | 0.1 | 94.3 ± 1.6 | 88.1 ± 3.5 | |
| | 0.5 | 88.3 ± 1.9 | 83.3 ± 4.2 | |
| Potato | 0.01 | 98.4 ± 3.5 | 98.9 ± 2.9 | |
| | 0.1 | 84.8 ± 1.2 | 91.6 ± 2.2 | |
| | 0.5 | 86.0 ± 0.6 | 92.6 ± 1.0 | |
| Soybean | 0.01 | 100.4 ± 3.9 | 109.1 ± 0.6 | |
| | 0.1 | 81.1 ± 3.8 | 78.0 ± 2.5 | |
| | 0.5 | 84.3 ± 4.6 | 78.8 ± 1.0 | |
| Mandarin | 0.01 | 95.5 ± 2.6 | 101.8 ± 3.6 | |
| | 0.1 | 82.1 ± 1.7 | 89.8 ± 1.5 | |
| | 0.5 | 81.6 ± 1.2 | 86.1 ± 1.8 | |
| Green pepper | 0.01 | 106.6 ± 1.5 | 96.3 ± 3.3 | |
| | 0.1 | 88.3 ± 0.8 | 89.5 ± 2.0 | |
| | 0.5 | 88.4 ± 1.5 | 90.9 ± 1.3 | |

[1)]Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation.
[2)]Limit of quantification.

## Acknowledgement

본 연구는 2019년도 식품의약품안전평가원 “2019년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(19161식위생020)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 국문요약

본 연구는 농산물 중 기준신설 예정농약 fenquinotrione에 대한 공정시험법을 개발하고자 수행하였다. Fenquinotrione은 triketone계 제초제로 quinoxaline 구조에 phenyl기가 치환된 새로운 구조의 화합물이며 대사산물 KIH-3653-M-2는 fenquinotrione의 quinoxaline 구조에 cyclohexadione이 –COOH로 치환되어 생성된다. 잔류물의 정의는 fenquinotrione 및 대사산물(KIH-3653-M-2)의 합으로 규정하여 관리할 예정이다. 본 연구에서는 향후 대사산물 안전관리를 고려하여 fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2의 동시시험법을 확립하고자 하였다. 2% 포름산 함유한 아세토니트릴로 추출 후 무수황산마그네슘($MgSO_4$) 및 염화나트륨(NaCl) 첨가하여 간섭물질을 효과적으로 제거하고, HLB 카트리지를 이용하여 정제 후 LC-MS/MS로 분석하는 시험법을 개발하였다. 개발된 fenquinotrione 및 KIH-3653-M-2 동시시험법의 직선성은 결정계수($r^2$)가 0.99이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.004, 0.01 mg/kg이었다. 시험법 검증 결과 농산물 5품목에 대하여 평균회수율(5반복)은 fenquinotrione 81.1~116.2%, KIH-3653-M-2의 평균 회수율은 78.0~110.0%이었다. RSD는 모두 4.6% 이하로 정확성, 정밀성 및 반복성이 우수함을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 국제식품규격위원회 가이드라인(Codex Alimentarius Commission)의 잔류농약 분석 기준(CAC/GL 40-1993, 2003) 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 부합하였다. 개발된 시험법은 낮은 검출한계 및 정량한계, 우수한 직선성, 회수율 실험을 통한 정확성과 정밀성, 재현성 등이 검증되어 농산물 중 fenquinorione의 잔류검사를 위한 공정시험법으로 활용가능 할 것이다.

## References

1. Lee, I.Y., Kim, J.W., Kim, S.S., Yoo, J.H., Hwang, I.S., Lee, K.H., Cho, N.G., Lee, D.G., Hwang, K.H., Won, O.J., Weiqiang, J., Ko, Y.K., Choi, J.S., Yeom, H.S., Park, K.W.: Current Status and perspectives of Weed Science in Asia-Pacific Area. *Weed and Turfgrass Science.*, **6(4)**, 292-305 (2017).
2. Food Safety Commission of Japan(FSCJ): Risk assessment report-fenquinotrione. *Food Safety*, **5(3)**, 110-113 (2017)
3. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code. pp. 634-636 (2018)
4. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code. pp. 759-761 (2018)
5. Luciana, G.F., Christian, W.G., Matthias, R., Heinz, P.S., Stephan, R.M.: Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/L level in surface waters using liquid chromatography-tamdem mass spectrometry. *J. Chromato. A.*, **1028**, 277-286 (2004)
6. Hanna, B., Marcin, S., Kornelia, S., Angelika, S., Martyna, T., Magdalena, K.: Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **24**, 644-658 (2017)
7. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993. CAC (Codex Alimentarius Commission), Rome, Italy (2003).
8. Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Cheongju, Korea (2016).
9. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Pesticide analytical residues manual in food code. pp. 13-14 (2013).
10. Kim, J.Y., Choi, Y.J., Kim, J.S., Kim, D.H., Do, J.A., Jung, Y.H., Lee, K.B., Kim, H.C.: Study for Residue Analysis of Herbicide, Clopyralid in Foods. *Kor. J. Environ. Agric.*, **37(4)**, 283-290 (2018)
11. Ko, A.Y., Abd El-Aty, A.M., Rahman, M.M., Jang, J., Kim, S.W., Choi, J.H., Shim, J.H.: A modified QuEChERS method for simultaneous determination of flonicamid and its metabolites in paprika using tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, **157**, 413-420 (2014).
12. Lehotay, S.J.: Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaboratice study. *J. AOAC Intern.*, **90(2),** 485-520 (2007)
13. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Tajnbaher, 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 Intern.*, **86,** 412-431 (2003)