pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 3, pp. 79~88 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.3.79

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

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Trifludimoxazin의 시험법 선정 및 검증

구선영[1] · 이수정[1] · 이소은[1] · 박채영[1] · 이정미[1]* · 박인주[2] · 정윤미[3] · 장귀현[1] · 문귀임[1]

[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[2]식품의약품안전처 서울지방식품의약품안전청 식품기준분석과
[3]식품의약품안전처 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Selection and Validation of an Analytical Method for Trifludimoxazin in Agricultural Products with LC-MS/MS

Sun Young Gu[1], Su Jung Lee[1], So eun Lee[1], Chae Young Park[1], Jung Mi Lee[1]*, Inju Park[2], Yun Mi Chung[3], Gui Hyun Jang[1], Guiim Moon[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]*Imported Food Analysis Division, Seoul Regional Food and Drug Administration, Seoul, Korea*
[3]*Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju, Korea*

(Received January 10, 2023/Revised May 24, 2023/Accepted June 2, 2023)

ABSTRACT - Trifludimoxazin is a triazinone herbicide that inhibits the synthesis of protoporphyrinogen oxidase (PPO). The lack of PPO damages the cell membranes, leading to plant cell death. An official analytical method for the safety management of trifludimoxazin is necessary because it is a newly registered herbicide in Korea. Therefore, this study aimed to develop a residual analysis method to detect trifludimoxazin in five representative agricultural products. The EN method was established as the final extraction method by comparing the recovery test and matrix effect with those of the QuEChERS method. Various sorbent agents were used to establish the clean-up method, and no differences were observed among them. $MgSO_4$ and PSA were selected as the final clean-up conditions. We used LC-MS/MS considering the selectivity and sensitivity of the target pesticide and analyzed the samples in the MRM mode. The recovery test results using the established analysis method and inter-laboratory validation showed a valid range of 73.5-100.7%, with a relative standard deviation and coefficient of variation less than 12.6% and 14.5%, respectively. Therefore, the presence of trifludimoxazin can be analyzed using a modified QuEChERS method, which is widely available in Korea to ensure the safety of residual insecticides.

Key words: Herbicide, Trifludimoxazin, Analytical method, Agricultural product, LC-MS/MS

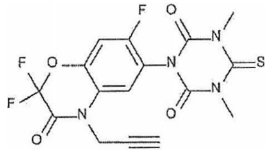
Trifludimoxazin은 triazinone 계열 제초제로 포르피린 고리를 합성하는 과정에서 프로토포르피리노겐이 프로토포르피린으로 산화되는 것을 촉매하는 프로토포르피리노겐-IX 산화효소(protoporphyrinogen oxidase, PPO)의 작용을 억제하며[1] 벼와 광엽 잡초를 방제하는데 사용한다[2]. Trifludimoxazin은 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 3.33인 비극성 화합물로 분자구조 및 물리·화학적 특성은 Table 1에 나타내었다.

Trifludimoxazin에 대한 국내외 잔류물의 정의는 국내, 미국(Environmental Protection Agency, EPA), 호주(Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, APVMA) 모두 모화합물이며, 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex), 유럽(European Commission, EC), 일본(Japan Food Chemical Research Foundation, JFCRF)에서는 설정되어 있지 않다. 국외 농산물 중 잔류허용기준(maximum residue

*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, Chungcheongbuk-do, 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.

Table 1. Physicochemical characteristics of trifludimoxazin

Property	Trifludimoxazin
Structure	
IUPAC name	1,5-dimethyl-6-thioxo-3-(2,2,7-trifluoro-3-oxo-4-(prop-2-yn-1-yl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl]-1,3,5-triazinane-2,4-dione
CAS no.	1258836-72-4
Molecular formula	$C_{16}H_{11}F_3N_4O_4S$
Molecular weight (g/mol)	412.3
Exact mass (g/mol)	412.04
Melting point (°C)	206
Log P_{ow}	3.33
Vapor pressure	1.1×10^{-7}
Solubility in water (mg/L)	1.78
Solubility in organic solvent (g/L, 20°C)	423.8 (acetone) 155.2 (ethyl acetate) 10.8 (methanol) 36.0 (tolune)

limits, MRL)은 미국에서 아몬드 0.15 mg/kg, 땅콩 등 9품목에 0.01 mg/kg이며, 호주에서는 보리와 밀에 0.01 mg/kg으로 설정되어 있다. APVMA의 보고서에 따르면 유효성분에 대한 급성 경구 및 경피, 흡입 독성이 낮다고 보고하였다. 또한, 쥐의 장기 연구에서 Acceptable Daily Intake (ADI)를 설정하는데 사용하는 용량의 10배 이상을 투여한 결과 정자의 운동성 감소 및 구조 이상, 자궁 위축, 질 상피 비대 등이 관찰되었으나 발암성은 나타나지 않았다고 보고하였다. 낮은 급성 독성을 근거로 급성독성참고량(Acute Reference Dose, ARfD)은 설정하지 않았으며 ADI는 0.1 mg/kg bw/day로 설정하였다. 캐나다(Health Canada Pest Management Regulatory Agency)의 보고서에 따르면 ARfD와 ADI 모두 0.08 mg/kg bw/day로 설정하였다.

Fajun Tian 등[2]은 곡류, 채소류 및 과일류에 대해 trifludimoxazin, picarbutrazox 및 pyraziflumid의 추출 용매 및 정제 조건에 따른 최적 시험법 확립을 위한 연구를 진행하였으며, B. Scott Asher 등[3]은 3개의 서부 텍사스 토양에서 trifludimoxazin에 대한 수직 이동성 및 면화 내성에 관한 연구를 진행하였다.

Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS)법은 꿀, 차, 동물의 지방, 흙, 계란 등 다양한 매질에서 여러 물질을 동시에 분석할 수 있는 비교적 간단한 시험법으로 국내외에서 시험법 개발에 사용한다[4-11]. 아세토니트릴을 추출 용매로 사용하며 salting out 원리로 추출용액과 물 층을 분리하고, 무수황산마그네슘과 염화나트륨을 첨가하여 시료 중 수분과 간섭물질을 제거하여 추출효율을 높인다. 또한 acetate 염과 아세트산을 함유한 아세토니트릴을 사용하는 AOAC법과 citrate 염을 첨가하여 추출하는 EN 15662법은 pH에 민감한 성분들을 효율적으로 추출할 수 있다. 분산상 SPE법(dispersive-solid phase extraction, d-SPE)에서 사용되는 무수황산마그네슘($MgSO_4$)은 추출 후 시료에 남아있는 수분을 제거하여 추출액의 극성도를 낮아지게 하며[12] 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[13].

따라서 본 연구에서는 식품 중 잔류할 수 있는 trifludimoxazin의 안전관리를 위해 대표 농산물 5품목(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)을 대상으로 시험법을 개발하여 잔류농약검사를 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다. 또한 전국 4개 지역(인천, 대전, 청주, 광주) 6개 대형마트 및 3개 농수산물 도매시장, 온라인 쇼핑몰로부터 수거한 농산물 125건을 대상으로 trifludimoxazin에 대한 잔류실태를 확인하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

Trifludimoxazin (99.2%) 표준품은 팜한농(Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였고 아세토니트릴과 메탄올은 HPLC 등급으로 물은 LC/MS 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 포름산은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였으며, 추출에 사용된 시약kit (Part No. ENK1-SC)와 정제에 사용된 시약kit (Part No. PM1EN)는 CHROMAtific (Cacilienweg, Heidenrod, Germany)에서 구입하였다. 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μm × 13 mm)는 GVS (Zola Predosa, Italy)에서 구입하였으며 시료는 식품공전에서 규정하는 대표 농산물로 곡류(현미, hulled rice), 서류(감자, potato), 두류(대두, soybean), 과일류(감귤, mandarin), 채소류(고추, green pepper) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C 이하에 보관하여 실험에 사용하였다. 수거한 모니터링 시료는 곡류 18건, 감귤류 10건, 근채류 21건, 두류 4건, 박과과채류 14건, 박과이외과채류 18건, 서류 18건, 열대과일류 4건, 인과류 18건으로 전국 4개 지역 6개 대형마트 및 3개 농수산물 도매시장, 온라인 쇼핑몰로부터 수거하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C 이하에 보관하고 실험에 사용하였다(Table 2).

표준원액 및 표준용액의 조제

Trifludimoxazin 20.16 mg을 아세토니트릴 20 mL에 용

Table 2. The list of collected agricultural products and results of residual analysis

Type	Agricultural product	No. of analyzed samples	Residue (mg/kg)
Citrus fruits	Mandarin	10	<LOQ[1)]
Grains	Hulled rice	18	<LOQ
Beans	Soybean	4	<LOQ
Root vegetables	Radish	11	<LOQ
	Onion	10	<LOQ
Gourd fruit and vegetables	Cucumber	8	<LOQ
	Oriental melon	6	<LOQ
	Green onion	4	<LOQ
Fruit vegetables	Watermelon	4	<LOQ
	Tomato	10	<LOQ
Root and tuber crop	Potato	11	<LOQ
	Sweet potato	7	<LOQ
Tropical fruit	Banana	4	<LOQ
Pome fruits	Persimmon	5	<LOQ
	Apple	13	<LOQ

[1)] Limit of quantification

해하여 1,000 mg/L의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 시료의 무처리 추출물 900 μL에 0.5 mg/L 표준용액 100 μL를 넣어 0.05 mg/L 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025 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 5 g(곡류 및 두류는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄, 서류, 과일류 및 채소류는 약 1 kg을 분쇄한 후 5 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고(곡류 및 두류의 경우 물 5 mL 첨가 후 30분간 방치) 아세토니트릴 20 mL를 가한 뒤 10분간 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 × *g*에서 10분간 원심분리하여 상층액 1 mL를 취하였다. 무수황산마그네슘($MgSO_4$) 150 mg과 1차 2차 아민(PSA) 25 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 상층액 1 mL를 가하고 30초간 와류교반기 등을 이용하여 충분히 혼합한 후 이를 4°C, 4,000 × *g*에서 10분간 원심 분리하였다. 정제된 상층액을 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

Table 3. LC-MS/MS parameters for the analysis of trifludimoxazin

Parameter	Condition		
Instrument	LC : Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) MS/MS : Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA)		
Chromatographic separation			
Column	Unison UK-C_{18} (2.0 mm I.D. × 100 mm L., 3.0 μm)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	2 μL		
Column temp.	40°C		
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in methanol B: 0.1% Formic acid in water		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	10	90
	1.0	10	90
	3.0	60	40
	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	550 L/h		
Cone gas flow	150 L/h		

LC-MS/MS 분석조건

Trifludimoxazin을 분석하기 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(liquid chromatograph-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS; Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼으로 Unison UK-C_{18} (2.0 mm I.D. × 100 mm L., 3.0 μm)을 선택하였으며, 이동상으로 0.1% 포름산이 함유된 메탄올과 0.1% 포름산이 함유된 물을 사용하여 최적의 기울기 용리 방식을 적용하였다. 정량 분석을 위한 이온화 방식은 electrospray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였으며 LC-MS/MS의 분석조건은 Table 3과 같다.

시험법 유효성 검증

확립된 trifludimoxazin의 시험법은 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(MFDS, 2016)'과 'CODEX 가이드라인

(codex alimentarius commission, CAC/GL 40-1993, 2010)'에 근거로 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 0.001-0.05 mg/L의 농도가 되도록 시료의 무처리 추출액으로 희석하여 각 농도 범위에 대한 peak의 면적으로 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였으며, 검량선의 결정계수(coefficient of determination, R^2)를 구하였다. 또한 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(signal/noise 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 50배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 5배 희석하여 검량선의 범위 내에서 정량하였다. 시험법의 재현성은 광주지방식품의약품안전청 및 서울지방식품의약품안전청과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 실시하고 변이계수(coefficient of variance, CV)를 구하여 확인하였다.

Results and Discussion

추출 및 정제조건 확립

Trifludimoxazin은 Log P_{ow}의 값이 3.33인 비극성 화합물이다. 검체 주위가 수분으로 수화되어 있고, 잔류농약은 검체 입자 표면이나 내부에 존재하기 때문에 이를 추출하기 위해서는 검체 내부로 침투가 용이한 수용성 유기용매를 사용한다[3]. 추출 및 정제과정에서 분산상 SPE법을 적용하는 것이 검체의 유기산과 색소를 효율적으로 제거할 수 있을 것으로 판단되어 이를 적용하는 QuEChERS법을 검토하였다. Anastassiades 등[3]이 개발한 original법과 acetate 또는 citrate 버퍼를 이용하여 추출하는 AOAC법과 EN 15662법[14-16]을 비교하였다. 5가지 대표 농산물(건조 시료의 경우 물 5 mL 첨가 후 30분 방치)을 이용하여 세 가지 QuEChERS법의 회수율을 비교 검토하였다(Table 4). 그 결과 현미와 감귤에서 original법으로 추출한 경우을 제외하고 모두 만족할 만한 추출 효율을 나타내었다. Matrix effect는 LC-MS/MS로 분석할 때 검체의 추출 성분에 의하여 나타나는 이온 억압 또는 증강 현상을 의미한다. 이온 억압은 질량분석기의 검출기까지 도달하는 이온의 양이 감소하는 현상을 말하며 이와 반대되는 현상을 이온 증강 현상이라고 한다[17]. 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[18]. 5가지 시료에 대하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 mg/L의 농도로 matrix effect를 비교한 결과(Table 5) 세 가지 추출법에서 모두 이온 억압 현상이 나타났다. Matrix effect를 줄이기 위해서는 추출 시 사용하는 검체의 양을 줄이거나 추출 용매의 양을 증가시키는 것이 도움될 것으로 사료된다. 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 6). 따라서 식

Table 4. Comparisons of QuEChERS extraction for the determination of trifludimoxazin recovery in samples

Sample	Recovery (Mean±RSD[1]) (%))		
	Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Hulled Rice	98.7±33.5	90.6±0.9	97.3±0.9
Potato	89.8±2.5	89.5±1.1	86.4±0.5
Soybean	99.0±7.8	98.4±10.3	88.1±6.3
Mandarin	126.1±2.1	95.5±2.5	90.6±2.0
Green Pepper	98.3±6.9	98.3±11.3	91.7±7.8

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

Table 5. Comparisons of matrix effect between QuEChERS extractions for trifludimoxazin

Sample	Matrix effect[1]		
	Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Hulled rice	-60.34	-64.71	-66.38
Potato	-32.69	-34.11	-31.10
Soybean	-56.99	-61.48	-66.60
Mandarin	-62.96	-34.36	-30.36
Green pepper	-61.59	-59.23	-59.35

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

Table 6. The clean-up efficiency of trifludimoxazin according to adsorbent composition

Sorbent	Recovery±RSD[1] (%)
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg	98.6±0.8
$MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 25 mg	97.1±1.8
$MgSO_4$ 150 mg, GCB 2.5 mg	97.0±2.4
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg, C_{18} 25 mg	102.3±3.5
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 25 mg, GCB 2.5 mg	99.9±2.7
$MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 25 mg, GCB 2.5 mg	98.4±1.0
$MgSO_4$ 150 mg, PSA 50 mg, C_{18} 50 mg, GCB 7.5 mg	94.7±3.5

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

Table 7. Comparisons of recovery results for trifludimoxazin in samples

Samples	Recovery±RSD[1)] (%)
Hulled rice	97.4±3.9
Potato	90.6±2.5
Soybean	87.3±4.6
Mandarin	90.7±1.0
Green pepper	92.9±13.9

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

약처가 고시하고 있는 동시다성분 시험법 7.1.2.2[19)]에 적용하기 위하여 추출 방법은 EN 15662법으로 정제 방법은 $MgSO_4$ 및 PSA를 혼합한 조건을 최종 추출 및 정제조건으로 확립하고 대표 농작물 5품목에 적용하여 검토하였다 (Table 7).

기기분석조건 확립

Trifludimoxazin은 Log P_{ow} 값이 3.33인 비극성 화합물로 구조내 >C=O와 -O- 같은 발색단이 포함되어 있어 LC-UVD로 분석이 가능할 것으로 판단되었다. 그러나 비교적 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보할 수 있는 LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였다. 분석용 컬럼으로는 잔류분석법에 많이 이용하는 C_{18} 역상컬럼을 선택하였고, 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 메탄올과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 trifludimoxazin 분자의 $[M+H]^+$ 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 ESI법의 positive-ion mode를 사용하였고, 확립한 분석조건을 바탕으로 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. Trifludimoxazin의 관측 질량은 412.04이며 표준용액(0.1 mg/L)을 일정한 속도(10 μL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 precursor ion 값은 413 *m/z*으로 확인하였다. 이때, cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 44 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 정량이온(quantification ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(qualification ion)으로 선정하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 3에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 최적의 collision energy는 Table 8에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 5품목의 농산물 검체에 대해 matrix-matched calibration법에 따라 정량하였다.

시험법 유효성 검증

Trifludimoxazin의 선택성은 표준용액, 무처리시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 비교하여 평가하였다. 무처리 시료와 회수율 시료는 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 시료 중 trifludimoxazin의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않았으므로 시료 중 trifludimoxazin을 분석하기 위해 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Matrix-matched 표준용액의 직선성을 확인하기 위하여 trifludimoxazin의 표준원액을 시료의 무처리 추출물로 희석하여 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025 및 0.05 mg/L 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 모든 농산물 시료 표준용액에서 결정계수(R^2) 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 2). LOD와 LOQ는 각각 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg으로 확인되었다. 이러한 결과는 PLS 도입에 따라 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 농산물의 관리기준인 0.01 mg/kg 이하를 만족할 수 있는 감도이다. 시험법의 정확성과 재현성 및 효율성을 평가하기 위하여 LOQ, LOQ 10배, LOQ 50배 수준인 0.01, 0.1 및 0.5 mg/kg의 처리농도로 trifludimoxazin의 회수율 실험을 5반복으로 수행하였다. LOQ 50배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 5배 희석하여 검량선의 범위 내에서 정량하였다. 각 농도에서 trifludimoxazin의 평균 회수율은 73.5-85.3%이었다. 상대표준편차는 모두 3.8% 이하로 확인되어

Table 8. Multiple reaction monitoring conditions of trifludimoxazin for analysis in ESI positive mode

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[2)] (eV)
Trifludimoxazin	6.7	412.3	412.0	413	134[1)]	52
					189	34
					141	44

[1)] Quantification ion.
[2)] Collision energy.

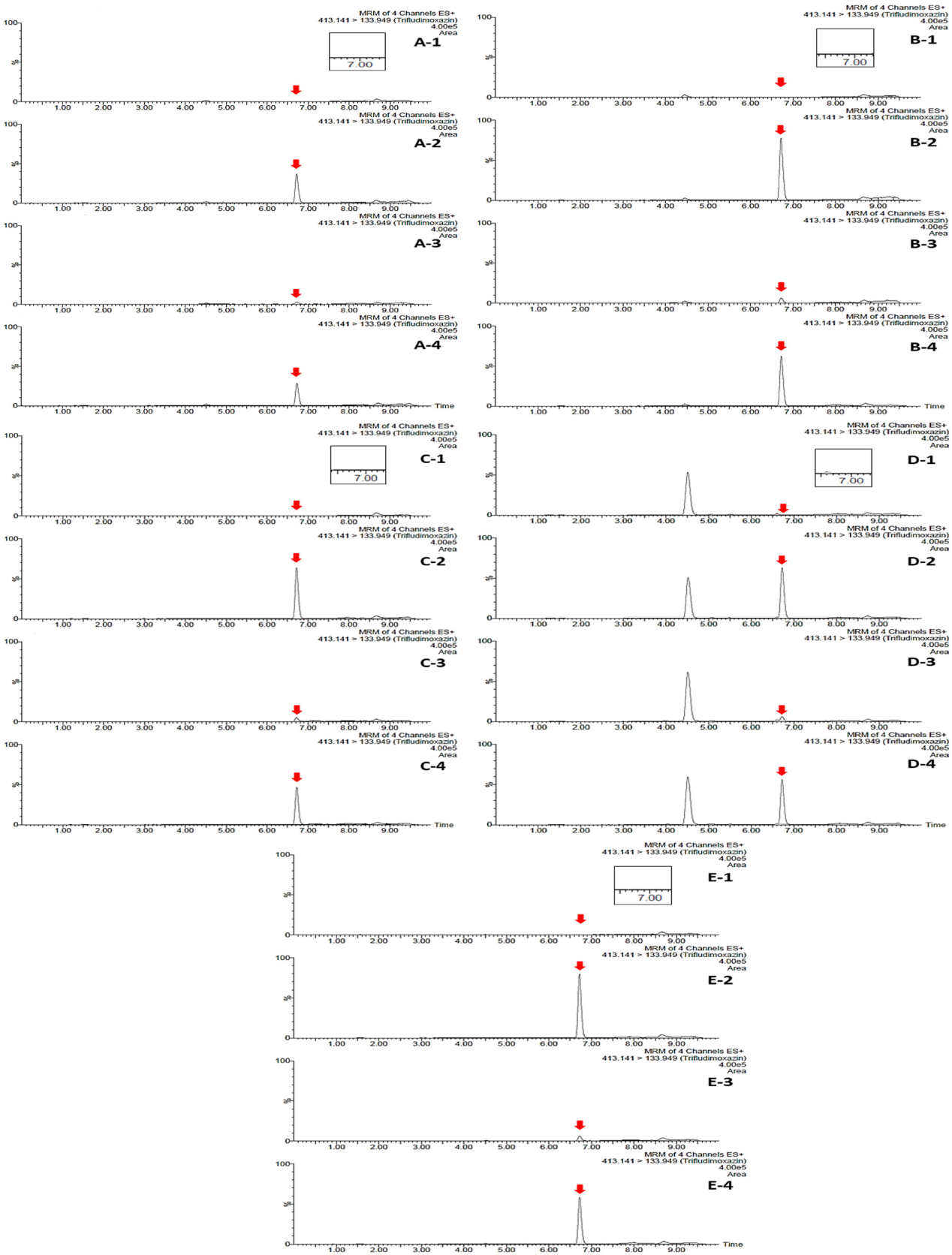


Fig. 1. Representative multiple reaction monitoring (quantification ion) recovery chromatograms of trifludimoxazin (413>134) corresponding to : (1) matrix-matched control, (2) matrix–matched standard solution at 0.025 mg/L, (3) sample spiked at 0.01 mg/kg (4) sample spiked at 0.1 mg/kg in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin, and (E) green pepper.

CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2010)[20]의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)[21]'에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 9).

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성을 검증하기 위해 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과 및 서울지방식품의약품안전청 식품기준분석과와 실험실간 검증을

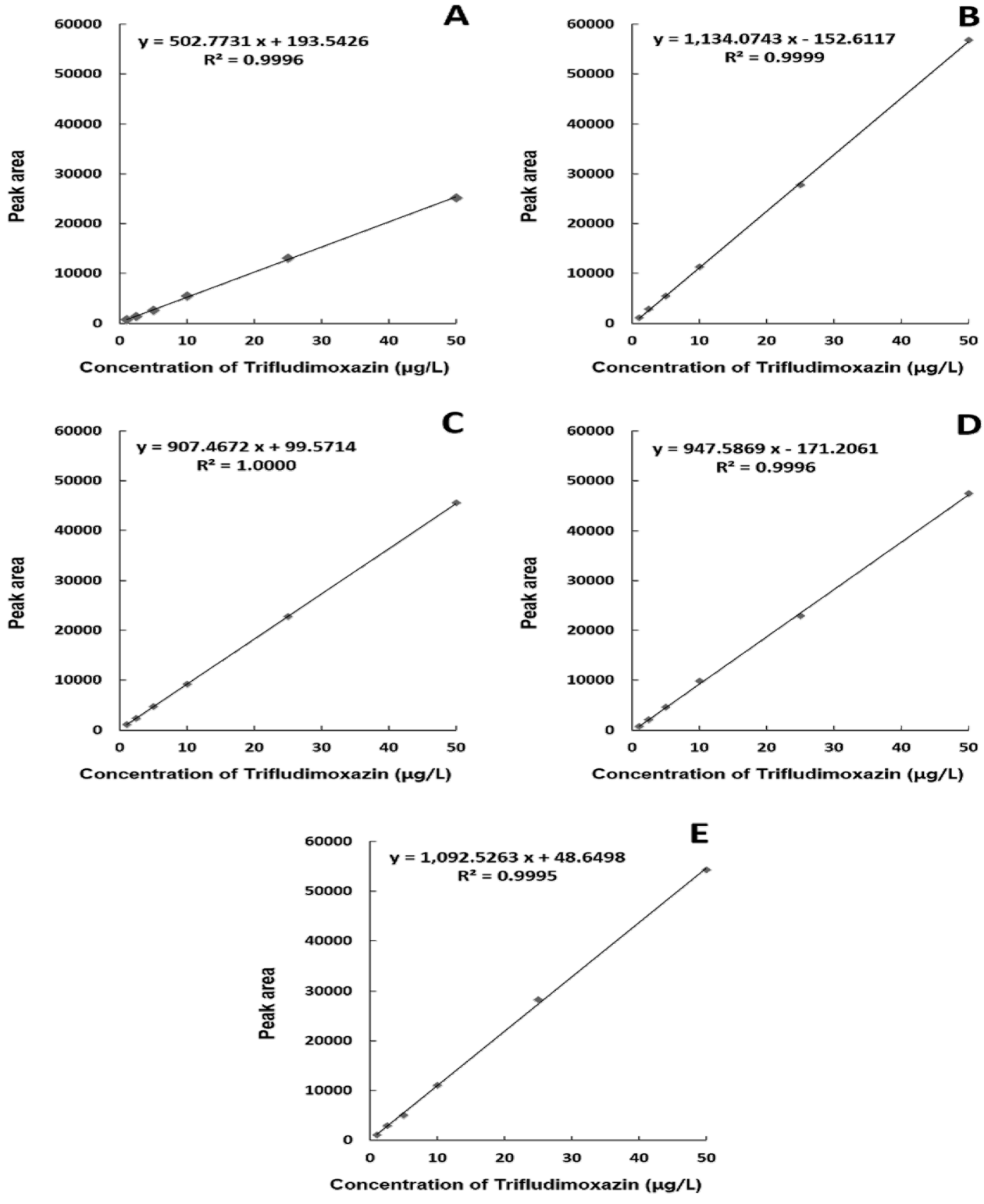


Fig. 2. Matrix-matched calibration curves of trifludimoxazin in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

Table 9. Validation results of analytical method for the determination of trifludimoxazin residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery±RSD[1] (%)			Ave[5] (%)	CV[6] (%)	LOQ[7] (mg/kg)
		Lab. A[2]	Lab. B[3]	Lab. B[4]			
Hulled rice	0.01	82.2±3.0	82.9±4.9	81.1±4.9	82.1	3.7	0.01
	0.1	75.1±3.8	85.2±3.8	99.3±1.7	84.5	12.7	
	0.5	75.2±1.3	89.4±2.6	99.5±6.5	85.7	13.1	
Potato	0.01	85.3±1.9	85.9±3.8	84.3±6.5	85.2	3.6	
	0.1	78.2±2.4	88.4±2.8	78.7±7.9	81.1	7.0	
	0.5	75.1±1.2	98.7±2.0	79.9±5.5	82.9	12.8	
Soybean	0.01	73.5±2.9	81.6±6.7	79.4±11.3	77.3	8.0	
	0.1	75.7±2.4	78.1±0.4	100.7±0.3	83.2	13.7	
	0.5	76.4±2.2	79.5±2.3	89.5±7.9	80.8	8.3	
Mandarin	0.01	81.1±3.2	84.0±4.1	83.9±6.8	82.7	4.5	
	0.1	83.4±1.8	82.3±0.9	82.5±10.4	82.9	4.8	
	0.5	81.6±3.0	84.3±2.3	77.2±9.2	81.1	5.6	
Green pepper	0.01	76.6±1.8	81.6±2.1	82.7±12.6	79.6	7.1	
	0.1	73.9±2.9	82.4±2.3	78.6±4.3	77.5	5.6	
	0.5	74.4±3.3	100.5±1.8	80.9±9.5	83.3	14.5	

[1] Mean values of 5 or 3 times repetitions with relative standard deviation.
[2] Ministry of Food and Drug Safety.
[3] Gwangju Regional Food and Drug Administration.
[4] Seoul Regional Food and Drug Administration.
[5] Recovery average of inter-laboratory.
[6] Coefficient of variation of inter-laboratory.
[7] Limit of quantification.

수행하였다. 개발한 시험법을 타 실험실에 동일하게 제공한 후 분석한 회수율 및 상대표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 trifludimoxazin의 평균 회수율은 73.5-85.3%, 상대표준편차는 3.8% 이하로 확인되었다. 세 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 77.3–85.7%, 변이계수(CV)는 14.5% 이하로 나타났다(Table 9). 따라서 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2010)에서 제시한 실험실간 검증 기준 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)에서 제시한 검증 기준에 만족함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 시험법은 잔류농약의 안전관리 및 잔류허용기준 적부 판정을 위한 시험법으로 적합할 것으로 확인된다.

잔류농약 모니터링 결과

본 연구에서 개발한 시험법에 대해 전국 4개 지역 6개 대형마트 및 3개 농수산물 도매시장, 온라인 쇼핑몰로부터 수거한 농산물 125건을 대상으로 잔류농약 모니터링을 한 결과 trifludimoxazin의 잔류량이 확인되지 않았다(Table 2). 이는 trifludimoxazin이 국내 등록 예정 농약으로 아직까지 농가에서 사용하지 않아 검출되지 않은 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2022년도 식품의약품안전평가원 “2022년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(22191농축산316)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

Trifludimoxazin은 triazinone 계열 제초제로 프로토포르피리노겐-IX 산화효소(protoporphyrinogen oxidase, PPO)를 억제하며 벼와 광엽 잡초를 방제하는 데 사용된다. PPO의 결핍은 세포막의 손상을 일으켜 식물을 시들게 한다. Trifludimoxazin의 농산물 중 잔류허용기준은 미국에서 아몬드에 대하여 0.15 mg/kg, 땅콩 등 9종에 대하여 0.01 mg/kg으로 설정되어있으며, 모화합물을 잔류물의 정의로 설정하여 관리하고 있다. 코덱스(CODEX), 유럽(EC) 일본(JFCRF)에서는 잔류허용기준(MRL)과 잔류물의 정의가 설정되어 있지 않다. 호주(APVMA)에서는 trifludimoxazin과 대사체 M850H001의 합을 잔류물의 정의로 설정하였으며, MRL은 보리와 밀에 0.01 mg/kg으로 설정되어 있다. 국내

에서 신규 등록 예정임에 따라 본 연구에서는 농산물 중 trifludimoxazin의 잔류량을 분석하기 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다. Trifludimoxazin의 물리 화학적 특성을 고려하여 아세토니트릴을 추출용매로 사용하는 Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS)법을 이용하여 추출 및 정제조건을 확립한 후 LC-MS/MS를 분석기기로 선정하였다. Trifludimoxazin의 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 평균 회수율은(5반복) 73.5-85.3%로 나타났으며, 상대 표준편차(RSD)는 3.8% 이하로 나타났다. 본 연구는 국제식품규격위원회 농약 분석법 가이드라인의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)에 적합한 수준이며, 향후 공정시험법으로 활용될 예정이다. 본 연구에서 개발한 시험법에 대해 농산물 125건을 대상으로 잔류농약 모니터링을 한 결과 trifludimoxazin의 잔류량이 확인되지 않았다.

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
So eun Lee	https://orcid.org/0000-0002-8670-1582
Chae Young Park	https://orcid.org/0000-0001-7161-3478
Jung Mi Lee	https://orcid.org/0000-0003-2840-5010
Inju Park	https://orcid.org/0000-0002-8850-5032
Yun Mi Chung	https://orcid.org/0000-0001-5118-5197
Gui Hyun Jang	https://orcid.org/0000-0002-4974-3097
Guiim Moon	https://orcid.org/0000-0002-3726-6748

Reference

1. Umetsu, N., Shirai, Y., Development of novel pesticides in the 21st century. *J. Pes. Sci.*, **45**, 55-74 (2020).
2. Tian, F., Qiao, C., Wang, C., Luo, J., Guo, L., Pang, T., Li, J., Wang, R., Pang, R., Xie, H., Development and validation of a method for the analysis of trifludimoxazin, picarbutrazox and pyraziflumid residues in cereals, vegetables and fruits using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, **168**, 106477 (2021).
3. Asher, B. S., Dotray, P. A., Liebl, R. A., Keeling, J. W., Ritchie, G. D., Udeigwe, T. K., Reed, J. D., Keller, K. E., Bowe, S. J., Aldridge, R. B., Simon, A., Vertical mobility and cotton tolerance to trifludimoxazin, a new protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicide, in three West Texas soils. *Weed Technology*, **35**, 144-148 (2021).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. Naik, R.H., Pallavi, M.S., Kumar, K.P., Vanitha, B.K., Reddy, V.C.S., Shwetha, A., Nandini, S., Naveenkumar, P., Nidoni, R.U., Bheemanna, M., Determination of 72 chemical pesticides and estimation of measurement of uncertainty in rice using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, **14**, 1788-1805 (2021).
9. Melo, M.G., Carqueijo, A., Freitas, A., Barbosa, J., Silva, A. S., Modified QuEChERS extraction and HPLC-MS/MS for simultaneous determination of 155 pesticide residues in rice (*Oryza sativa* L.). *Foods*, **9**, 1-16 (2020).
10. 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. Agr. Food Chem.*, **66**, 10300-10308 (2018).
11. 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 Additives & Contaminants: Part A*, **35**, 1543-1552 (2018).
12. 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).
13. Wilkowska, A., Biziuk, M., Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, **125**, 803-812 (2011).
14. Rejczak, T., Tuzimski, T., A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.*, **13**, 980-1010 (2015).

15. Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N., Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chrom. A*, **1217**, 2548-2560 (2010).
16. 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).
17. 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. *Laboratory Medicine Online*, **10**, 95-108 (2020).
18. 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. Chrom. A*, **1218**, 7634-7639 (2011).
19. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, May 24). Food Code. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=404
20. CODEX Alimentarius Commission, Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Roma, Italy, 1-36 (2010).
21. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines on standard procedures for preparing analysis method (2016).