pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 2, pp. 124~134 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.2.124

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

LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 살충제 Broflanilide 및 대사물질 동시시험법 개발

박지수 · 도정아* · 이한솔 · 박신민 · 조성민 · 김지영[1] · 신혜선 · 장동은 · 정용현 · 이강봉
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과
[1]식품의약품안전처 서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과

Development of a Simultaneous Analytical Method for Determination of Insecticide Broflanilide and Its Metabolite Residues in Agricultural Products Using LC-MS/MS

Ji-Su Park, Jung-Ah Do*, Han Sol Lee, Shin-min Park, Sung Min Cho, Ji-Young Kim[1], Hye-Sun Shin, Dong Eun Jang, Yong-hyun Jung, and 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
[1]Division of Import Food Analysis, Ministry of Food and Drug Safety-Seoul Region, Ministry of Food and Drug Safety, Seoul, Korea
(Received February 8, 2019/Revised February 22, 2019/Accepted March 13, 2019)

ABSTRACT - An analytical method was developed for the determination of broflanilide and its metabolites in agricultural products. Sample preparation was conducted using the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method and LC-MS/MS (liquid chromatograph-tandem mass spectrometer). The analytes were extracted with acetonitrile and cleaned up using d-SPE (dispersive solid phase extraction) sorbents such as anhydrous magnesium sulfate, primary secondary amine (PSA) and octadecyl (C_{18}). The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.004 and 0.01 mg/kg, respectively. The recovery results for broflanilide, DM-8007 and S(PFP-OH)-8007 ranged between 90.7 to 113.7%, 88.2 to 109.7% and 79.8 to 97.8% at different concentration levels (LOQ, 10LOQ, 50LOQ) with relative standard deviation (RSD) less than 8.8%. The inter-laboratory study recovery results for broflanilide and DM-8007 and S (PFP-OH)-8007 ranged between 86.3 to 109.1%, 87.8 to 109.7% and 78.8 to 102.1%, and RSD values were also below 21%. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL 40-1993, 2003) and the Food and Drug Safety Evaluation guidelines (2016). Therefore, the proposed analytical method was accurate, effective and sensitive for broflanilide determination in agricultural commodities.

Key words : Broflanilide, LC-MS/MS, Insecticide, Analytical method, Agricultural products

Broflanilide(N-[2-bromo-4-(perfluoropropan-2-yl)-6-(trifluoromethyl) phenyl]-2-fluoro-3-(N-methyl=benzamido) benzamide)는 Mitsui Chemical Agro, Inc.와 BASF에서 최초 개발한 meta-diamide계 살충제로 담배거세미나방 방제에 효과적이다[1)]. 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)은 아시아 전역에 널리 분포하며 유충은 모든 채소류와 전작물에 피해를 가한다. 심할 경우 식물체의 줄기만 남기고 섭식하는 광식성 해충으로 주로 곤충병원성선충 및 쌀좀알벌 등의 천적을 이용하여 방제해왔으나 번식이 왕성하여 방제에 어려움을 겪고 있다.

Broflanilide는 DM-8007 (demethyl-broflanilide)과 S(PFP-OH)-8007로 대사되어지며, 구조식은 Fig. 1과 같다. DM-8007은 broflanilide의 아마이드기 중 메틸기가 대사되어 생성된 화합물로 중추신경계 억제성 신경전달물질인 gamma-aminobutyric acid (GABA) 수용체에 대하여 비경쟁적으로 작용하여 해충을 마비시키는 강한 살충작용을 한다고 보고되어있다[1-3)]. 국내에서는 broflanilide를 유효성분으로 하는 농약은 등록되어 있지 않으며 고추와 배, 배추, 복숭아, 사과, 오이, 자두, 참외, 쪽파에 대해 등록이 요청되어 2019년

*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

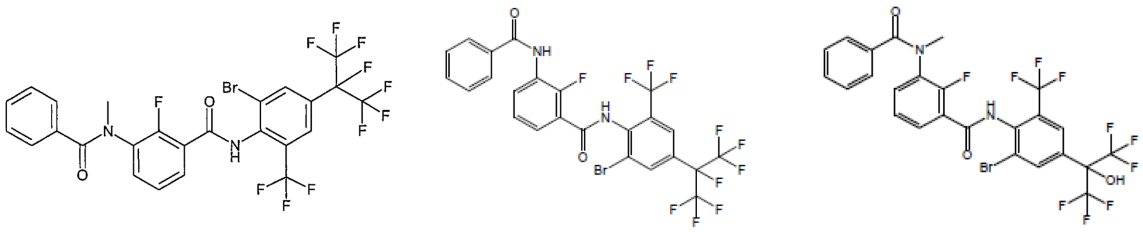

Fig. 1. Structures of broflanilide and its metabolites(DM-8007 and S(PFP-OH)-8007).

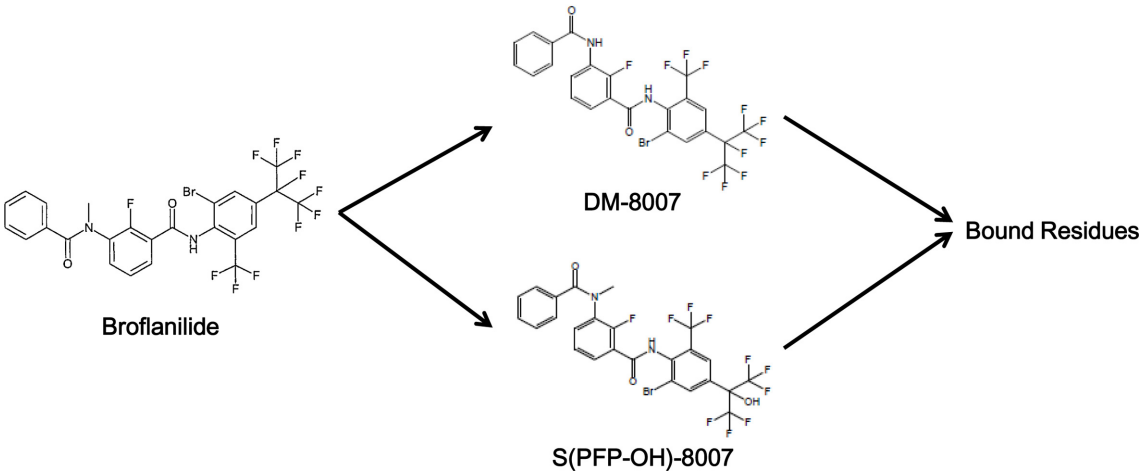

Fig. 2. Metabolic pathway of broflanilide in soybean, tomato and cabbage.

잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)이 신설될 예정이다. 또한, 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex)와 유럽(EC), 미국(EPA), 일본(JFCRF)에서도 미등록된 농약으로 잔류허용기준 및 잔류물의 정의가 설정되어 있지 않다. Broflanilide는 무, 토마토, 양배추, 콩의 경우 체내 대사과정에서 DM-8007과 S(PFP-OH)-8007로 대사되는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 국내의 경우 농산물 중의 잔류허용기준이 신설될 예정이며 잔류물의 정의는 broflanilide 모화합물로 관리할 예정이다. 본 연구에서는 향후 대사산물의 안전관리를 고려하여 broflanilide 및 대사산물의 동시시험법을 확립하고자 하였다.

Broflanilide 시험법에 관한 연구로 Xiaokang 등[3]이 5종류의 토양에서 모화합물 및 대사산물 DM-8007과 S(PFP-OH)-8007을 QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)를 이용하여 정제 후 LC-MS/MS로 동시 분석한 연구가 보고되어 있고 그 외 4종의 diamide계 살충제 시험법에 대하여 다수 보고된 바 있다. Diamide계 살충제로 chlorantraniliprole, cyantraniliprole, cyclaniliprole, flubendiamide 등이 있으며[4] oily, watery, acidic, dry한 4 종의 matrix와 배추, 청경채 및 토양에서 PSA(primary secondary amine) 및 C_{18}(oxtadecyl)의 흡착제로 d-SPE (dispersive solid phase extraction)를 이용한 연구가 보고되었다[5-7]. 국내의 경우 broflanilide에 대한 선행연구는 보고되지 않았으며 diamide계 살충제 시험법에 대한 문헌이 많이 보고되었다. Lee 등[8]은 파프리카에서 QuEChERS 방법으로 추출 후 NH_2 (aminopropyl) 카트리지로 정제하여 LC-UVD를 이용하여 분석하였다. 또한 다수의 문헌들이 딸기, 대파 등에서 acetonitirile으로 추출 후 dichloromethane으로 액-액 분배를 진행하여 NH_2와 silica 카트리지를 이용하여 정제하였다[9-11]. 이와 같은 방법은 시료의 전처리 과정이 길어 노동력 및 시간이 많이 소요되고 유기용매를 많이 사용하여 환경에 비친화적이다. 따라서 최근 비교적 방법이 간편하고 빠른 QuEChERS 방법은 다양한 matrix에서 대사산물을 포함한 동시시험법 개발에 많이 이용하고 있는 추세이다[12-16]. QuEChERS는 Anastassiades에 의해 처음 알려진 다성분 농약 시험법으로 AOAC (Association of analytical communities)와 European committee에서 인정받았으며 추출 시 acetate buffer를 사용하는 AOAC 2007.01[17]과 citrate buffer를 이용한 EN 15662

Table 1. Physicochemical properties of broflanilide, DM-8007 and S(PFP-OH)-8007

Property	Broflanilide	DM-8007	S(PFP-OH)-8007
IUPAC name	*N*-[2-bromo-4-(perfluoropropan-2-yl)-6-(trifluoromethyl)phenyl]-2-fluoro-3-(N-methyl=benzamido)benzamide	3-benzamido-*N*-[2-bromo-4-(perfluoropropan-2-yl)-6-(trifluoromethyl)phenyl]-2=fluorobenzamide	*N*-[2-bromo-4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-6-(trifluoromethyl)phenyl]-=2-fluoro-3-(*N*-methylbenzamido)benzamide
CAS No.	1207727-04-5	-	-
Molecular formula	$C_{25}H_{14}BrF_{11}N_2O_2$	$C_{24}H_{12}BrF_{11}N_2O_2$	$C_{25}H_{15}BrF_{10}N_2O_3$
Molecular weight	663.29 g/mol	649.27 g/mol	661.30 g/mol
Melting point	154.0~155.5°C	-	-
Log P_{ow}	5.2 (pH 7, 20°C)	-	-
Vapor pressure	9.0×10^{-9} Pa (25°C)	-	-
Solubility (all g/L, 20°C)	heptanes 0.096, xylene 6.0, 1,2-dichloromethane 110, methanol>250, acetone>250, ethyl acetate>250, n-octanol 7.4	-	-

법이 보고되어 있다[18]. 또한 추출 후 흡착제를 넣어 극성, 비극성 간섭물질 및 색소 등을 제거하고 분석 성분의 손실을 최소화 할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 국내 diamide계 살충제 중 식품에서 시험법이 보고되어 있지 않은 broflanilide에 대한 시험법을 최초 개발하고자 하였으며, 잔류허용기준 신설에 따른 안전관리를 위해 식품공전상 대표 농산물로 분류하고 있는 곡류(현미), 서류(감자), 두류(대두), 과일류(감귤), 채소류(고추)에 적용하여 broflanilide 및 대사산물 DM-8007, S(PFP-OH)-8007을 동시에 분석할 수 있는 공정시험법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

Broflanilide (99.67%) 및 DM-8007 (99.86%), S(PFP-OH)-8007(99.02%) 표준품은 Mitsui Chemical Agro, inc에서 제공받아 사용하였다. 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany), 무수황산마그네슘은 Junsei (Tokyo, Japan), 염화나트륨은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)에서 구입하여 사용하였으며 formic acid는 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. PSA (Primary Secondary Amine)는 Agilent Technologies (California, USA)에서 구입하였고, GCB (Graphitized Carbon Black)와 C_{18} (Oxtadecyl)은 Waters (Leinster, Ireland)에서 구입하였다. Syringe filter (Nylon, 0.2 μm × 13 mm)는 Teknokroma (SantCugat Del Valles, Barcelona, Spain)에서 구입하여 사용하였다. 시료는 교반진탕장비(MMV-1000W, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 추출하였다. 시료는 식품공전상 대표농산물 5품목인 현미(곡류), 감자(서류), 대두(두류), 감귤(과일류), 고추(채소류) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50°C에 보관하고 실험에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

Broflanilide 및 DM-8007, S(PFP-OH)-8007 표준품을 각각 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 희석한뒤 혼합표준용액으로 하였다. Matrix-matched calibration을 위해 검체의 무처리 추출물 900 μL에 10 μg/mL 표준용액 100 μL를 넣어 1.0 μg/mL 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 0.0025, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 그리고 0.2 μg/mL의 농도가 되도록 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 아세토니트릴 20 mL를 가하여 10분간 진탕하였다. 곡류 및 두류의 경우 증류수 10 mL를 넣어 습윤화하고 30분간 방치한 후 위 과정을 진행하였다. 진탕 후 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g을 첨가하여 1분간 강하게 흔든 뒤 4°C, 4,500 *G*에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 1 mL를 취한 후 무수황산마그네슘 150 mg과 PSA 25 mg, C_{18} 25 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 옮겨 1분간 진탕 후 이를 다시 4°C, 4,000 *G*에서 10분간 원심분리하였다. 정제된 용액을 syringe filter(Nylon, 0.2 μm)로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다.

Table 2. LC-MS/MS parameters for the analysis of broflanilide, DM-8007 and S(PFP-OH)-8007

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. × 150 mm L., 3 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Oven temp.	40°C		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	80	20
	3.0	80	20
	3.5	10	90
	7.0	10	90
	8.0	80	20
	10.0	80	20
MS/MS condition			
Capillary	4.0 kV		
Cone voltage	Broflanilide: 69V, DM-8007: 55V, S(PFP-OH)-8007: 54V		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	200°C		
Desolvation gas flow	550 L/hr		
Cone gas flow	150 L/hr		

LC-MS/MS 분석조건

분석기기는 Waters(Milford, MA, USA)사의 액체크로마토그래프-질량분석기(Lipid Chromatograph-Tamdem mass Spectrometry, Acquity UPLC-Xevo TQ-S)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Unison UK-C_{18} (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 μm, Imtakt, Kyoto, Japan)를 이용하여 분리하였다. 컬럼 온도는 40°C를 유지하였으며 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 2와 같다.

시험법의 유효성 검증

실험 방법이 동일하여도 매트릭스(matrix)에 따라서 검량선의 기울기, 검출한계 및 정량한계가 달라지므로 각 매트릭스별 유효성 검증이 필요하다[19]. 그러므로 확립된 시험법의 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 재현성(reproducibility), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery)에 대한 유효성은 식약처 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)' 및 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)을 토대로 검증하였다[20,21]. 직선성 확인을 위하여 broflanilide, DM-8007 및 S(PFP-OH)-8007 혼합표준원액을 0.0025~0.2 μg/mL 농도가 되도록 무처리 시료 시험 용액으로 희석하였다. 각 농도 범위에 대한 peak의 면적을 이용하여 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하였고, 검량선의 결정계수(R^2)를 구하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(*S/N* ratio)를 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 검증하기 위해 대표 농산물 5종의 무처리 시료에 대하여 broflanilide 및 대사산물 혼합표준용액을 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배에 해당하는 농도로 처리하였으며 각각의 농도 및 시료에 대하여 5반복으로 수행하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 시험법의 정밀성과 정확성, 재현성을 평가하였다.

Results and Discussion

최적기기분석조건 확립

Broflanilide는 분자 구조에 Br 및 F가 많아 할로겐 원소에 대하여 선택성이 우수한 GC-ECD로 분석하는 것이 적합해보이나 화합물 구조상 벤젠 구조 및 케톤기를 포함하고 있으므로 UVD 분석이 용이할 것이라고 판단되었다. 그러나 간섭물질에 대한 영향을 배제하며 모화합물 및 대사산물 2종의 동시분석을 위하여 높은 선택성과 낮은 정량한계 설정을 위해 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 분석용 칼럼은 C_{18} 역상칼럼을 선택하였고, 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다.

Broflanilide의 관측질량은 662.01, DM-8007은 647.99, S(PFP-OH)-8007은 660.01으로, 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 665, 649, 661 *m/z* 값으로 확인하였다. Broflanilide의 경우 대상성분의 분자 내 Br 및 F를 다량 함유하여 동위원소 비

Table 3. MRM (multiple reaction monitoring) conditions of broflanilide, DM-8007 and S (PFP-OH)-8007 for analysis in ESI positive mode

Compound	Molecular weight	Exact mass	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE[1] (eV)
Broflanilide	663.29	662.01	665.15	645.13[2]	50
				625.10	45
DM-8007	649.27	647.99	649.13	242.12[2]	48
				629.06	49
S(PFP-OH)-8007	661.30	660.01	661.13	641.04[2]	44
				256.17	36

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

Table 4. Recovery results of QuEChERS extraction method for the determination of broflanilide and its metabolites [DM-8007 and S(PFP-OH)-8007]

Compound	Recovery ± RSD[1](%)		
	Orignal	AOAC	EN
Broflanilide	93.1 ± 2.8	92.3 ± 1.9	87.5 ± 2.8
DM-8007	91.2 ± 1.2	90.2 ± 1.7	85.2 ± 3.4
S(PFP-OH)-8007	94.5 ± 2.5	92.2 ± 2.6	85.1 ± 2.9

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

율이 1:1로 존재하므로 663 및 665 mass가 관찰되었다. Julie 등[22]은 분자 구조상 Cl을 많이 함유하는 triforine의 mass spectrum 확인시 동위원소 비율에 의하여 세 개의 이온을 확인하였고 각각의 이온의 product ion의 검출강도를 비교하여 MS 조건을 확립하였다. 이와 같이 broflanilide 검출강도를 비교하여 665 m/z를 선구 이온으로 선택하였다. Cone voltage의 변화(5-70 V)에 따른 최적화 과정을 통해 broflanilide는 69 V, DM-8007는 55 V, S(PFP-OH)-8007는 54 V에서 최대 peak가 나타남을 확인하였다. 최적화된 cone voltage상태에서 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM mode로 분석하였다. Collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온으로 설정하여 확인하였다. 분석조건에서 선정된 특성 이온과 최적의 collision energy는 Table 3에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 matrix에 따른 분석성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

추출 및 정제 조건 확립

Broflanilide는 Log P_{ow} 값이 5.2로 비극성을 띄며 pKa가 존재하지 않는 비해리성 화합물이다. 수분이 많은 검체의 경우 표면이나 그 주위가 수화되어 존재하므로 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 추출 용매로 사용할 경우 침투성이 낮아 대상 농약성분에 대한 추출 효율이 불량하므로 주로 검체 내부로의 침투성이 용이한 수용성 유기용매를 사용한다[23]. Broflanilide는 메탄올 및 아세톤에서 높은 용해도를 보이나 Xiaokang 등[3]이 아세토니트릴을 이용하여 broflanilide 및 대사산물을 추출한 방법이 보고되어 이를 추출 용매로 선정하였다. 또한 추출액의 유기산과 당과 같은 극성 간섭물질과 유지 성분 등의 무극성 간섭물질 및 색소를 제거하기 위하여 dispersive solid phase extraction(d-SPE)을 적용하여 정제하는 QuEChERS법을 검토하였다. 추출액에 무수황산마그네슘과 염화나트륨 등을 첨가하여 수분과 간섭물질 제거 및 층 분리의 효율을 높이고자 하였으며 정제를 위해 무수황산마그네슘과 PSA, C_{18}, GCB를 이용하여 정제 효율을 비교하였다. 감귤 시료를 이용하여 QuEChERS법 중 아세토니트릴을 이용한 Original법과 1% acetic acid 함유한 아세토니트릴과 acetate buffer를 사용하는 AOAC 2007.01[17], citrate buffer를 이용한 EN 15662법[18]의 추출 과정을 비교 검토한 결과 Original법에서 91.2~94.5%로 가장 좋은 결과를 보였다(Table 4). 정제과정에서는 무수황산마그네슘과 PSA를 사용하였을 때와 C_{18}을 추가적으로 사용하였을 때 회수율 차이가 크게 나타나지 않았으나 대두 및 현미 시료의 경우 지질과 같은 비극성 간섭물질을 제거 및 매트릭스 간섭을 최소화하기 위하여 C_{18}을 추가하는 것이 적합하다고 판단되었다.

Table 5. Recovery results of d-SPE for the determination of broflanilide and its metabolites [DM-8007 and S(PFP-OH)-8007]

Compound	Recovery ± RSD[1)](%)			
	$MgSO_4$+PSA	$MgSO_4$+PSA+C_{18}	$MgSO_4$+PSA+GCB	$MgSO_4$+PSA+C_{18}+GCB
Broflanilide	102.8 ± 1.9	100.2 ± 0.5	96.1 ± 5.6	91.9 ± 4.3
DM-8007	98.2 ± 5.8	101.0 ± 3.8	90.3 ± 2.9	85.5 ± 2.0
S(PFP-OH)-8007	97.5 ± 1.1	92.5 ± 1.8	91.6 ± 5.8	83.9 ± 13.5

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

Table 6. Recovery results of wetting for the determination of broflanilide and its metabolites [DM-8007 and S(PFP-OH)-8007]

Compound	Recovery ± RSD[1)](%)		
	0 min	30 min	60 min
Broflanilide	99.7 ± 0.9	99.1 ± 2.2	97.0 ± 2.7
DM-8007	101.5 ± 1.9	103.8 ± 1.6	101.5 ± 1.5
S(PFP-OH)-8007	89.2 ± 3.4	91.5 ± 1.9	81.1 ± 10.0

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

또한 GCB를 추가적으로 사용할 때와 C_{18}과 GCB를 혼합하여 사용하였을 때 대사산물 2종의 회수율이 크게 감소함을 확인할 수 있었다(Table 5). 또한 건조시료의 경우 습윤화 과정이 필요하므로 대두(두류)를 이용하여 물 10 mL를 첨가하여 방치 시간에 따른 회수율을 비교한 결과 60분간 방치시 대사산물 S(PFP-OH)-8007의 회수율이 크게 감소하였다. 따라서 대상성분 모두 회수율이 우수하며 충분한 습윤화 시간을 위하여 30분간 방치하는 것으로 시험법을 확립하였다(Table 6). 따라서 본 시험법에서는 QuEChERS Original법을 이용한 추출과 무수황산마그네슘과 PSA, C_{18}를 이용한 d-SPE 정제를 통해 다양한 매트릭스 간섭물질로부터 broflanilide 및 대사산물을 효과적으로 추출 및 정제할 수 있었다.

시험법 유효성 검증

Broflanilide 및 대사산물 DM-8007과 S(PFP-OH)-8007의 선택성(selectivity)은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하여 확인하였다. 무처리 시료 중 broflanilide와 대사산물 2종의 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. 3). 개발된 시험법의 직선성을 확인하기 위하여 혼합표준원액을 무처리 시험용액으로 희석하여 0.0025~0.2 μg/mL으로 제조한 후 5 μL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 농산물 5종 시료 표준용액에서 결정계수(R^2) 0.99이상으로 높은 직선성을 확인하였다(Fig. 4). Broflanilide 및 대사산물 2종의 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 0.001 μg/mL(S/N≥3)이었고 아래의 계산식에 따라 0.004 mg/kg이었으며, 정량한계는 최소검출농도가 0.0025 μg/mL(S/N≥10)으로 아래 계산식에 따라 0.01 mg/kg이었다.

검출한계(mg/kg)

= 최소기기검출농도(mg/mL, S/N≥3) × 희석배수

$$= 0.001(\mu g/mL) \times \frac{20(mL)}{5(g)} = 0.004 \text{ mg/kg}$$

정량한계(mg/kg)

= 최소검출농도(mg/mL, S/N≥10) × 희석배수

$$= 0.0025(\mu g/mL) \times \frac{20(mL)}{5(mL)} = 0.01 \text{ mg/kg}$$

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 broflanilide의 평균 회수율은 90.7~113.7%, DM-8007의 평균 회수율은 88.2~105.0%, S(PFP-OH)-8007의 평균 회수율은 79.8~97.8%이었다. RSD는 모두 8.8% 이하로 확인되어(Table 7-9) 본 연구 결과는 잔류물 분석에 관한 Codex 가이드라인의 잔류농약 분석 기준(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40-1993, 2003) 및 식품의약품안전평가원 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 부합하므로[20,21] 농산물 중 잔류하는 broflanilide 및 대사산물 2종을 분석하는데 적합함을 확인할 수 있었다. 농산물 5품목에 대한 회수율 크로마토그램은 다음과 같다(Fig. 3).

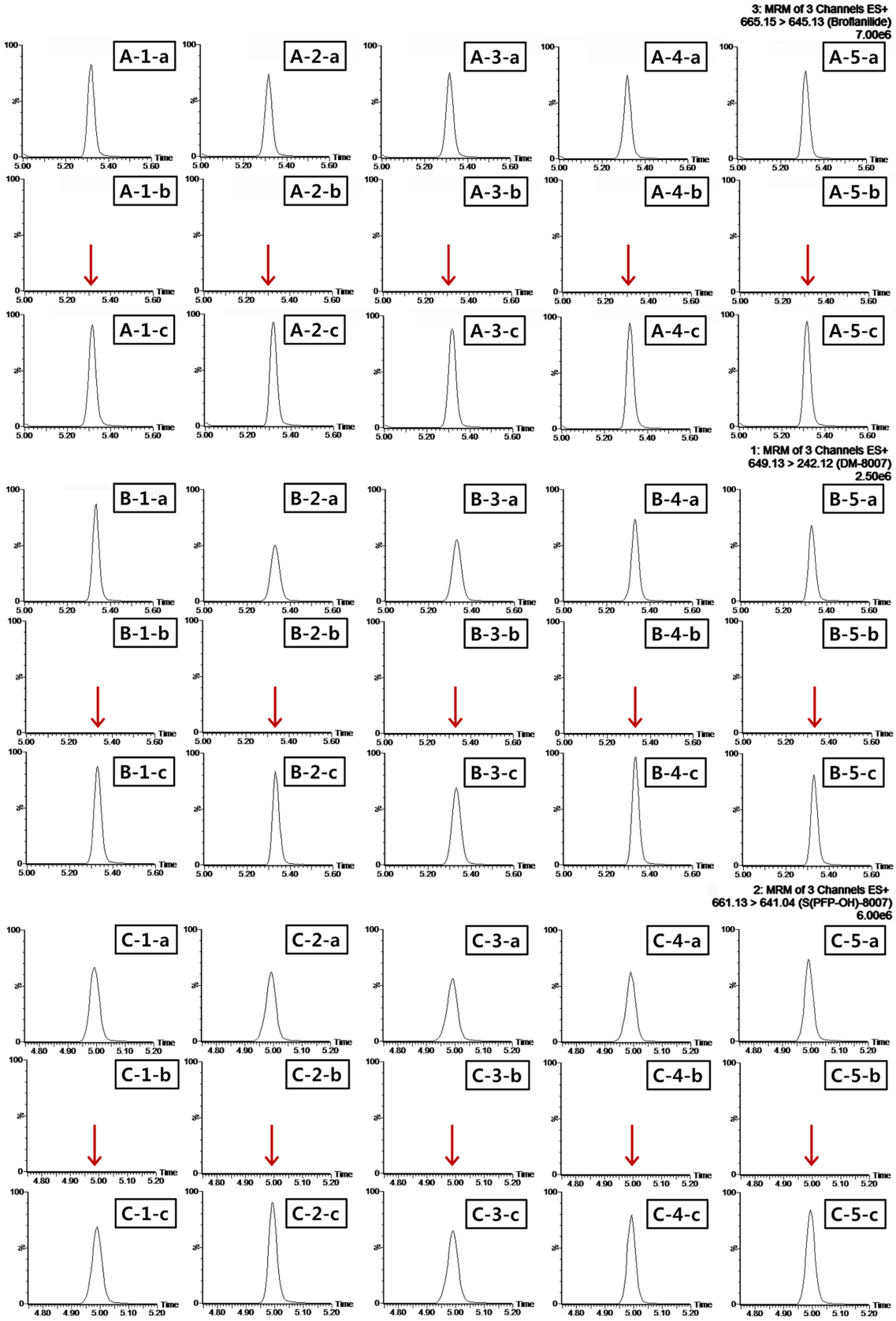

Fig. 3. Representative MRM(quantification ion) recovery chromatogram (fortification concentration: 0.1 mg/kg) of (A) broflanilide (665>645), (B) DM-8007 (649>242) and (C) S(PFP-OH)-8007 (661>641) in (1) hulled rice, (2) potato, (3) soybean, (4) mandarin and (5) green pepper at (a) matrix-matched standard, (b) control and (c) recovery.

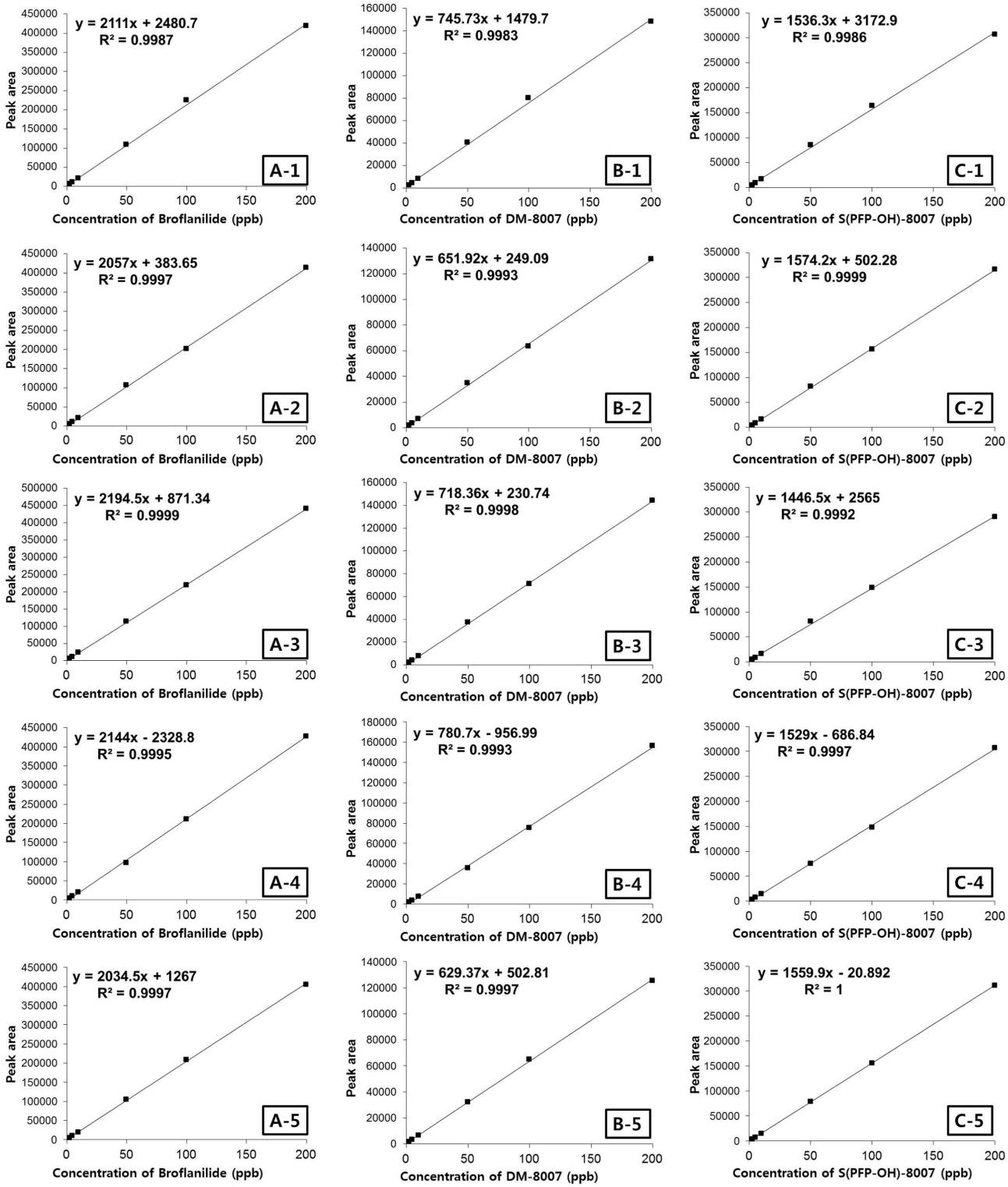

Fig. 4. Matric-matched calibration curves of (A) broflanilide, (B) DM-8007 and (C) S(PFP-OH)-8007 in (1) hulled rice, (2) potato, (3) soybean, (4) mandarin and (5) green pepper.

실험실간 시험법 검증

시험법의 유효성을 확인하기 위해 외부실험기관인 서울지방식품의약품안전청과 실험실간 검증을 수행하고자 개발한 시험법을 제공한 후 동일한 방법으로 분석을 수행하여 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 broflanilide의 평균 회수율은 80.1~116.0%, DM-8007은

Table 7. Inter-laboratory validation results of analytical method for Broflanilide in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1](%)		Average[2] (%)	RSD[3] (%)
		Lab1[4]	Lab2[5]		
Hulled rice	0.01	92.8 ± 2.0	89.5 ± 3.2	91.2	3.3
	0.1	94.8 ± 1.3	98.8 ± 1.9	96.8	2.7
	0.5	93.9 ± 8.7	116.3 ± 0.3	105.1	12.8
Potato	0.01	104.4 ± 2.0	94.8 ± 1.1	99.6	5.5
	0.1	99.4 ± 3.1	106.2 ± 0.6	102.8	4.1
	0.5	94.2 ± 3.4	105.6 ± 4.9	99.9	7.3
Soybean	0.01	90.7 ± 1.9	81.8 ± 11.2	86.3	10.1
	0.1	93.1 ± 2.0	94.3 ± 2.4	93.7	2.2
	0.5	92.0 ± 3.1	89.7 ± 3.1	90.9	3.4
Mandarin	0.01	113.7 ± 4.5	80.1 ± 1.6	96.9	19.2
	0.1	102.1 ± 1.4	116.0 ± 2.4	109.1	7.2
	0.5	96.3 ± 1.6	115.6 ± 3.5	106.0	10.2
Green pepper	0.01	107.6 ± 4.8	97.2 ± 4.0	102.4	6.8
	0.1	103.4 ± 3.4	107.7 ± 2.5	105.6	3.4
	0.5	99.9 ± 2.4	101.0 ± 4.5	100.5	3.3

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

Table 8. Inter-laboratory validation results of analytical method for DM-8007 in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1](%)		Average[2] (%)	RSD[3] (%)
		Lab1[4]	Lab2[5]		
Hulled rice	0.01	97.8 ± 3.3	92.1 ± 9.3	95.0	7.3
	0.1	88.2 ± 1.1	96.9 ± 2.7	92.6	5.5
	0.5	88.6 ± 6.0	114.0 ± 2.1	101.3	14.3
Potato	0.01	105.0 ± 2.8	86.7 ± 6.0	95.9	11.3
	0.1	98.7 ± 3.0	102.3 ± 4.3	100.5	3.8
	0.5	93.2 ± 3.7	99.8 ± 5.5	96.5	5.7
Soybean	0.01	93.2 ± 3.3	102.2 ± 14.4	97.7	10.8
	0.1	96.0 ± 2.5	90.6 ± 2.2	93.3	3.9
	0.5	94.6 ± 2.4	82.7 ± 3.2	88.7	7.9
Mandarin	0.01	103.6 ± 8.8	71.9 ± 0.4	87.8	20.8
	0.1	103.9 ± 4.2	115.5 ± 0.9	109.7	6.3
	0.5	100.0 ± 3.4	111.2 ± 5.0	105.6	6.8
Green pepper	0.01	101.9 ± 4.4	90.2 ± 15.0	96.1	12.3
	0.1	101.7 ± 3.1	113.5 ± 4.4	107.6	6.8
	0.5	99.1 ± 4.2	109.1 ± 4.7	104.1	6.5

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

Table 9. Inter-laboratory validation results of analytical method for S(PFP-OH)-8007 in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD[1](%)		Average[2] (%)	RSD[3] (%)
		Lab1[4]	Lab2[5]		
Hulled rice	0.01	90.6 ± 4.3	113.5 ± 9.0	102.1	13.8
	0.1	82.8 ± 5.9	92.5 ± 2.9	87.7	7.7
	0.5	90.4 ± 3.0	113.8 ± 4.0	102.1	12.9
Potato	0.01	95.0 ± 7.0	78.4 ± 3.4	86.7	11.9
	0.1	92.9 ± 5.1	87.0 ± 2.3	90.0	5.3
	0.5	94.1 ± 3.8	86.3 ± 3.2	90.2	5.9
Soybean	0.01	86.3 ± 4.0	113.2 ± 1.0	99.8	15.0
	0.1	89.8 ± 0.9	77.8 ± 4.0	83.8	8.4
	0.5	89.8 ± 3.0	78.1 ± 1.5	84.0	8.0
Mandarin	0.01	79.8 ± 7.1	77.8 ± 3.4	78.8	6.5
	0.1	91.8 ± 2.6	105.6 ± 5.0	98.7	8.5
	0.5	89.6 ± 3.6	103.9 ± 12.9	96.8	11.9
Green pepper	0.01	90.9 ± 3.8	96.6 ± 2.8	93.8	4.6
	0.1	96.9 ± 3.7	79.2 ± 7.1	88.1	12.5
	0.5	97.8 ± 4.2	75.0 ± 8.3	86.4	16.0

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

71.9~115.5%, S(PFP-OH)-8007은 75.0~113.8%이었고, RSD는 15.0%이하로 조사되었다(Table 7-9). 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 broflanilide는 86.3~109.1%, DM-8007은 87.8~109.7%, S(PFP-OH)-8007은 78.8~102.1%이며 RSD는 모두 20.8%이하로 모든 처리구에서 Codex 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)[21] 및 식품의약품안전평가원의 가이드라인(2016)[20]에서 제시한 기준 처리농도 >1 mg/kg와 ≤0.01 mg/kg의 45%, >0.01 mg/kg와 ≤0.1 mg/kg의 32%보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다.

Acknowledgement

본 연구는 2018년도 식품의약품안전평가원 “2018년 식품 중 잔류농약 안전관리를 위한 위해평가 및 신규 시험법 확립 연구(18161식품위013)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 농산물 중 2019년 기준신설 예정농약 Broflanilide에 대한 공정시험법을 개발하고자 수행하였다. Broflanilide는 meta-diamide계 살충제로 중추신경계 억제성 신경전달물질인 gamma-aminobutyric acid (GABA) 수용체에 대하여 비경쟁적으로 작용하여 해충을 마비시키는 강한 살충작용을 하고 담배거세미나방 방제에 효과적이다. 잔류물의 정의는 모화합물 broflanilide로 규정하여 관리할 예정으로 향후 대사산물의 안전관리를 고려하여 broflanilide 및 대사산물의 동시시험법을 확립하고자 하였다. 아세토니트릴으로 추출 후 무수황산마그네슘 및 염화나트륨을 첨가하였고 원심분리하였다. 상등액을 취하여 PSA와 C_{18} 흡착제를 사용해 간섭물질을 효과적으로 제거한 후 LC-MS/MS로 분석하는 시험법을 개발하였다. 개발된 broflanilide 시험법의 직선성은 결정계수(r^2)가 0.99 이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.004, 0.01 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 대표 농산물 5품목(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)에 대하여 시험법 검증결과 평균 회수율(5반복)은 broflanilide는 90.7~113.7%, DM-8007은 88.2~105.0%, S(PFP-OH)-8007은 79.8~97.8%이었으며 RSD는 8.8% 이하로 정확성 및 반복성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 외부실험기관인 서울지방식약청과의 실험실간 평균 회수율은 broflanilide의 경우 86.3~109.1%, DM-8007은 87.8~109.7%, S(PFP-OH)-8007은 78.8~102.1%으로 상대표준편차(RSD)는 모두 20.8%이하로 국제식품규격위원회 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 ‘식품등 시험법 마련 표준절차에 관한

가이드라인(2016)'에 적합한 수준임을 확인하였다. 개발된 시험법은 낮은 검출한계 및 정량한계, 우수한 직선성, 회수율 실험을 통한 정확성과 정밀성, 재현성 등이 입증되어 농산물 중 broflanilide의 잔류검사를 위한 공정시험법으로 활용되기에 적합한 것으로 판단된다.

Reference

1. Stephane, J., Andrew, J. F. E., Clemens, L., Martin, P.: Synthetic approaches to the 2010-2014 new agrochemicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **24**, 317-341 (2016).
2. Toshifumi, N., Shinichi, B.: Broflanilide: A meta-diamide insecticide with a novel mode of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **24**, 372-377 (2016).
3. Xiaokang, A., Jun, X., Fengshou, D., Xingang, L., Xiaohu, W., Ran, W., Yongquan, Z.: Simultaneous determination of broflanilide and its metabolites in five typical Chinese soils by a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *JSS*., **41**, 1-10 (2018).
4. Cho, S. R., Kyung, Y. J., Shin, S. E., Kang, W. J., Jung, D. H., Lee, S. J., Park, G. H., Kim, S. I., Cho, S. W., Kim, H. K., Koo, H. N., Kim, G. H.: Susceptibility of field populations of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua* to four diamide insecticides. *Korean J. Appl. Entomol.,* **57(1)**, 43-50 (2018).
5. Timo, S., Timothy, A. S., Christopher, J. S., Christopher, C. M., Thomas, C., Michael, P. W., Sergio, C. N.: QuEChERS multiresidue method validation and mass spectrometric assessment for the novel anthranilic diamide insecticides chlorantraniliprole and cyantraniliprole. *J. Agric. Food Chem*., **59,** 814-821 (2011).
6. Xiaojun, C., Ping, W., Zhiyuan, M., Si, C., Haotian, G., Xiaoling, S.: Degradation dynamics and residue analysis of flubendiamide in cabbage and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with dispersive solid phase extraction. *Agricultural Sciences*., **5**, 850-857 (2014) (2016).
7. Jianpeng, S., Nan, F., Congfeng, T., Dongmei, Q.: Determination of cyantraniliprole and its major metabolite residues in pakchoi and soil using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol.,* **89,** 845-852 (2012).
8. Lee, D. Y., Kim, Y. J., Kim, S. G., Kang, K. Y.: Residual characteristics of insecticides used for oriental tobacco budworm control of paprika. *Korean J. Environ Agric.,* **32(1)**, 84-93 (2013).
9. Kim, H. G., Kim, J. Y., Hur, K. J., Kwon, C. H., Hur, J. H.: Establishment of pre-harvest residue limits (phrl) of flubendiamide and pyriofenone on strawberry(*Fragaria ananassa* Duch.). *Korean J. Pestic. Sci.,* **21(1)**, 62-67 (2017).
10. Do, J. A., Lee, M. Y., Chang, M. I., Hong, J. H., Oh, J. H.: Development of analytical method for cyantraniliprole residues in welch onion (Allium species). *Analytical Science & Technology.*, **28(3)**, 175-181 (2015).
11. Lee, J. W., Kim, J. Y., Kim, H. G., Hur, K. J., Kwon, C. H., Hur, J. H.: Residual characteristics of bistrifluron and chlorantraniliprole in strawberry(*Fragaria ananassa* Duch.) for establishing pre-harvest residue limit. *Korean J. Environ Agric.,* **36(1)**, 57-62 (2017).
12. Seo, E. K., Kim, T. K., Hong, S. M., Kwon, H. Y., Kwon, J. H., Son, K. A., Kim, J. E., Kim, D. H.: Analysis of systemic pesticide imidacloprid and its metabolites in pepper using QuEChERS and LC-MS/MS. *Korean J. Pestic. Sci.,* **17(4)**, 264-270 (2013).
13. Mustiqur, R., Kim, S. W., Tae, W. N., A. M. Abd E.A., Lee, Y. J., Park, J. S., Amer, R., Lee, H. S., Chung, H. S., Choi, J. H., Shin, H. C., Shim, J. H.: QuEChERS method for the simultaneous quantification of phorate and its metabolites in porcine and chicken muscle and table eggs using ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.,* **39**, 2079-2086 (2016).
14. Kwon, H. Y., Kim, C. S., Park, B. J., Jin, Y. D., Son, K. A., Hong, S. M., Lee, J. B., Im, G. J.: Multiresidue analysis of 240 pesticides in apple and lettuce by QuEChERS sample preparation and HPLC-MS/MS analysis. *Korean J. Pestic. Sci.,* **15(4),** 417-433 (2011).
15. Yang, I. C., Hong, S. M., Kwon, H. Y., Kim, T. K., Kim, D. H.: Multi-residue pesticide analysis in cereal using modified QuEChERS sample preparation method. *Korean J. Pestic. Sci.,* **17(4),** 314-334 (2013).
16. Kim, J. W., Kwon, H. Y., Hong, S. M., Shim, J. H., Lee, H. S., Kim, D. B., Moom, B. C.: Method development of multiple pesticides residues in rice straw silage. *Korean J. Pestic. Sci.,* **21(4),** 395-416 (2017).
17. AOAC Official Method 2007.07 Pesticide Residues in food by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tamdem Mass Spectrometry, First action 2007.
18. European Committee for Standardization/Technical Committee CEN/TC275(2008), Foods of plant origin: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleaup by dispersive SPE QuEChERS-method.
19. Park, M.S., Lee, J.J., Myung, S.W.: Analysis of phosim residue in animal food production (cattle and pig) by LC/ESI-MS/MS. *J. the Korean Chem. Soc.,* **55(4),** 626-632 (2011).
20. Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Cheongju, Korea (2016).
21. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993. CAC (Codex Alimentarius Commission), Rome, Italy (2003).
22. Julie, A. H., Mark, D. S., Martin, G., Richard, J. F.: Determination of triforine using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **18**, 775-779 (2004).
23. Lee, Y.D.: Practical book of Korea Food Code pesticide residue analysis method, 4 th ed, 11-15, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Cheongju, Korea (2013).