

Research Article



CrossMark

Open Access

## LC-MS/MS를 이용한 농산물 중 Spiropidion 및 대사산물 Spiropidion-enol (SYN547305) 시험법 개발 및 검증

구선영<sup>1</sup>, 이수정<sup>1</sup>, 신혜선<sup>1</sup>, 강성은<sup>1</sup>, 정윤미<sup>2</sup>, 이정미<sup>\*</sup>, 정용현<sup>1</sup>, 문귀임<sup>1</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,

<sup>2</sup>식품의약품안전처 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

### Determination and Validation of an Analytical Method for Spiropidion and Its Metabolite Spiropidion-enol (SYN547305) in Agricultural Products with LC-MS/MS

Sun Young Gu<sup>1</sup>, Su Jung Lee<sup>1</sup>, Hye-Sun Shin<sup>1</sup>, Sung Eun Kang<sup>1</sup>, Yun Mi Chung<sup>2</sup>, Jung Mi Lee<sup>1\*</sup>, Yong-hyun Jung<sup>1</sup> and Guiim Moon<sup>1</sup> (<sup>1</sup>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, <sup>2</sup>Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju 61012, Korea)

Received: 15 April 2022/ Revised: 12 May 2022/ Accepted: 27 May 2022

Copyright © 2022 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article 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.

#### ORCID

Sun Young Gu  
<https://orcid.org/0000-0002-0070-2462>

Su Jung Lee  
<https://orcid.org/0000-0002-5325-8342>

Hye-Sun Shin  
<https://orcid.org/0000-0001-7364-3902>

Sung Eun Kang  
<https://orcid.org/0000-0002-2660-1301>

Yun Mi Chung  
<https://orcid.org/0000-0001-5118-5197>

Jung Mi Lee  
<https://orcid.org/0000-0003-2840-5010>

Yong-hyun Jung  
<https://orcid.org/0000-0002-7789-0836>

Guiim Moon  
<https://orcid.org/0000-0002-3726-6748>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Spiropidion and its metabolite are tetramic acid insecticide and require the establishment of an official analysis method for the safety management because they are newly registered in Korea. Therefore, this study was to determine the analysis method of residual spiropidion and its metabolite for the five representative agricultural products.

**METHODS AND RESULTS:** Three QuEChERS methods (original, AOAC, and EN method) were applied to

optimize the extraction method, and the EN method was finally selected by comparing the recovery test and matrix effect results. Various adsorbent agents were applied to establish the clean up method. As a result, the recovery of spiropidion was reduced when using the dispersive-SPE method with MgSO<sub>4</sub>, primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB) and octadecyl (C<sub>18</sub>) in soybean. Color interference was minimized by selecting the case including GCB and C<sub>18</sub> in addition to MgSO<sub>4</sub>. This method was established as the final analysis method. LC-MS/MS was used for the analysis by considering the selectivity and sensitivity of the target pesticide and the analysis was performed in MRM mode. The results of the recovery test using the established analysis method and

\* Corresponding author: Jung Mi Lee  
Phone: +82-43-719-4205; Fax: +82-43-719-4200;  
E-mail: [mythljm@korea.kr](mailto:mythljm@korea.kr)

inter laboratory validation showed a valid range of 79.4-108.4%, with relative standard deviation and coefficient of variation were less than 7.2% and 14.4%, respectively.

**CONCLUSION(S):** Spiropidion and its metabolite could be analyzed with a modified QuEChERS method, and the established method would be widely available to ensure the safety of residual insecticides in Korea.

**Key words:** Agricultural product, Analytical method, Insecticide, LC-MS/MS, Spiropidion

## 서론

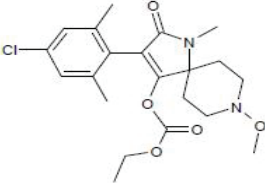
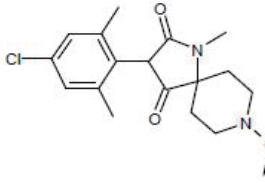
스피로피디온(spiropidion)은 tetramic acid 계열 살충제로 지방산 합성에 필수 기질인 malonyl-CoA의 형성을 촉진하는 acetyl-CoA carboxylase를 억제하여 지방산의 생합성을 저해하며, 진딧물, 흰가루, 총채벌레, 진드기 등을 방제하는데 사용한다[1,2]. Spiropidion은 *n*-octanol/water 분배 계수(Log  $P_{ow}$ )가 3.2이고 spiropidion-enol (SYN547305)은 2.9로 모두 비극성 화합물이며 분자구조 및 물리·화학적 특성은 Table 1과 같다.

Spiropidion과 대사산물에 대해 유럽(European Commission, EC), 미국(Environmental Protection Agency, EPA), 일본(Japan Food Chemical Research Foundation,

JFCRF)에서는 잔류허용기준(Maximum Residue Limits, MRL)과 잔류물의 정의가 설정되어 있지 않다. 그러나 최근 JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues)의 보고서에 따르면 농산물에 대한 잔류물의 정의를 spiropidion과 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 합을 spiropidion으로 하였으며 일일섭취허용량(Acceptable Daily Intake, ADI)은 0.02 mg/kg bw/day, 급성독성참고량(Acute Reference Dose, ARfD)은 0.3 mg/kg bw로 설정하였다. 호주(Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, APVMA)에서는 잔류물의 정의는 설정되어 있지 않으나 spiropidion의 ADI를 0.05mg/kg bw/day로 ARfD는 0.3 mg/kg bw로 설정하였다.

최근 국내외에서 시험법 개발에 사용하는 QuEChERS법(quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)은 비교적 간단한 시험법으로 다양한 매질에서 여러 물질을 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다. Yang 등[4]은 꿀에 있는 잔류 항생제 70종을 동시에 분석하였으며, Wu 등[5]은 248종의 차에서 36종의 농약과 대사체 14종을 분석하였다. Harischandra 등[6]은 비둘기콩에서 79종의 농약을, Harischandra 등[7]과 Melo 등[8]은 쌀에서 70종 이상의 농약을 분석하였다. HU 등[9]은 기존 QuEChERS법을 응용하여 흙, 물, 과일류에서 Indaziflam과 대사체 5종에 대한 시험법을 개발 및 검증하였으며, Guo 등[10]은 계란, 닭 근육 등에 대하여 Fipronil과 대사체 3종에 대한 시험법을 개발하였다. Rahman 등[11]은 돼지, 닭 근육, 계란에서 Phorate와

Table 1. Physicochemical characteristics of spiropidion and its metabolite

Property	Spiropidion	Spiropidion-enol (SYN547305)
Structure		
IUPAC name	[3-(4-chloro-2,6-dimethyl-phenyl)-8-methoxy-1-methyl-2-oxo-1,8-diazaspiro[4.5]dec-3-en-4-yl]ethyl carbonate	2-(4-chloro-2,6-dimethyl-phenyl)-1-hydroxy-8-methoxy-4-methyl-4,8-diazaspiro[4.5]dec-1-en-one
CAS no.	1229023-00-0	1229023-34-0
Molecular formula	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molecular weight (g/mol)	422.9	350.9
Exact mass (g/mol)	422.16	350.13
Melting point (°C)	134.3	-
Log $P_{ow}$	3.2	2.9
Vapor pressure	0.0±1.6 mmHg	-
Solubility in water (mg/L)	46	-
Solubility in organic solvent (g/L, 20°C)	-	-

대사체 5종에 대하여 분석하였다. QuEChERS original법은 추출용매로 아세토니트릴을 사용하며 salting out 원리로 추출용액과 물 층을 분리하고, 무수황산마그네슘과 염화나트륨을 첨가하여 시료 중 수분과 간섭물질을 제거하여 추출 효율을 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<sub>4</sub>)은 추출 후 시료에 남아있는 수분을 제거하여 추출액의 극성도를 낮아지게 하며[3] primary secondary amine (PSA)은 추출액 중 극성 유기산 등과 당이나 지방산 등을 제거한다. 또한 octadecyl (C<sub>18</sub>)은 지질과 같은 비극성 간섭물질을 제거하고, graphitized carbon black (GCB)은 스테롤뿐만 아니라 클로로필, 카로티노이드 같은 색소를 제거한다[15].

따라서 본 연구에서는 식품 중 잔류할 수 있는 spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 안전관리를 위해 대표 농산물 5품목(현미, 감자, 대두, 감귤, 고추)을 대상으로 시험법을 개발하여 spiropidion과 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 잔류허용기준 신설 및 잔류농약검사를 위한 공정시험법을 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

Spiropidion(98.8%)과 spiropidion-enol (SYN547305, 99.1%) 각각의 표준품은 신젠타에서 제공받아 사용하였고 아세토니트릴은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 포름산은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 추출에 사용된 시약 kit (Part No. 186006813)는 Waters (Leinster, Ireland)로부터 구입하여 사용하였으며, 정제에 사용된 시약 kit (Part No. QM15UK)는 CHROMAtific (Cacilienweg, Germany)에서 구입하였다. 멤브레인 필터(Nylon, 0.2 µm × 13 mm)는 Teknokroma (Barcelona, Spain)에서 구입하였으며 시료는 식품공전에서 규정하는 대표 농산물 5품목 현미(곡류, hulled rice), 감자(서류, potato), 대두(두류, soybean), 감귤(과일류, mandarin), 고추(채소류, green pepper) 모두 무농약 농산물을 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -20°C 이하에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 표준원액 및 표준용액의 조제

Spiropidion 20.24 mg과 spiropidion-enol (SYN547305) 20.18 mg을 20 mL의 아세토니트릴 : 물(50 : 50, v/v)에 용해하여 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 10 mL 첨가 후 30분간 방치) 아세토니트릴 20 mL를 가한 뒤 10분간 진탕하였다. 진탕 후 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g, 구연산 이나트륨·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<sub>4</sub>) 150 mg과 octadecyl (C<sub>18</sub>) 25 mg, Graphitized Carbon Black (GCB) 2.5 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 상층액 1 mL를 가하고 30초간 와류교반기 등을 이용하여 충분히 혼합한 후 이를 4°C, 4,000 g에서 10분간 원심 분리하였다. 정제된 상층액을 멤브레인 필터(Nylon, 0.2 µm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

### LC-MS/MS 분석조건

Spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)을 분석하기 위하여 LC-MS/MS (Waters, Milford, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼으로 Cadenza CD-C<sub>18</sub> HT (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 µm)를 선택하였으며, 이동상으로 0.1% 포름산이 함유된 아세토니트릴과 0.1% 포름산이 함유된 물을 사용하여 최적의 기울기 용리 방식을 적용하였다. 정량 분석을 위한 이온화 방식은 ESI (Electro-spray ionization)법의 positive-ion mode를 사용하였으며 LC-MS/MS의 분석조건은 Table 2와 같다.

### 시험법 유효성 검증

확립된 Spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 시험법은 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인 (MFDS, 2016)'과 'CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)'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 correlation, r<sup>2</sup>)를 구하였다. 또한 크로마토그램 상에서 신호(signal) 내 잡음(noise) 비(S/N ratio)가 각각 3과 10 이상이 되는 농도를 LOD와 LOQ로

Table 2. LC-MS/MS parameters for the analysis of spiropidion and its metabolite

Condition	Content																														
Instrument	LC : Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) MS/MS : Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA)																														
<i>Chromatographic separation</i>																															
Column	Cadenza CD-C <sub>18</sub> HT (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 μm)																														
Flow rate	0.2 mL/min																														
Injection volume	5 μL																														
Column temp.	40°C																														
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in acetonitrile B: 0.1% Formic acid in water																														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>4.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>10.5</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0.0	10	90	2.0	10	90	2.5	30	70	4.0	50	50	8.0	90	10	9.0	100	0	10.0	100	0	10.5	10	90	12.0	10	90
Time(min)	A(%)	B(%)																													
0.0	10	90																													
2.0	10	90																													
2.5	30	70																													
4.0	50	50																													
8.0	90	10																													
9.0	100	0																													
10.0	100	0																													
10.5	10	90																													
12.0	10	90																													
- Gradient																															
<i>MS/MS condition</i>																															
Capillary voltage	1 kV																														
Source temp.	150°C																														
Desolvation temp.	500°C																														
Desolvation gas flow	550 L/h																														
Cone gas flow	150 L/h																														

설정하였다. 시험법의 정확성과 반복성은 대표 농산물 5종에 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 광주지방식품의약품안전청과 실험실간 검증(Inter-laboratory validation)을 실시하고 변이계수(coefficient of variance, CV)를 구하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출 및 정제조건 확립

Spiropidion과 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)은 Log P<sub>ow</sub>의 값이 3.2와 2.9인 비극성 화합물이다. 검체 입자 표면이나 내부에 잔류농약이 존재하고, 검체 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 이를 추출하기 위해서는 검체 내부로의 침투가 용이한 수용성 유기용매를 사용하였다[3]. 분산상 SPE법을 적용하는 것이 추출 및 정제과정에서 검체의 유기산과 색소를 효율적으로 제거할 수 있을 것으로 판

단되어 이를 적용하는 QuEChERS법을 검토하였다. Anastassiades 등[3]이 개발한 original법과 acetate 또는 citrate 버퍼를 이용하여 추출하는 AOAC법과 EN 15662법[12-14]을 비교하였다. 5가지 대표 농산물 중 감귤과 대두 시료(건조 시료의 경우 물 10 mL 첨가 후 30분 방치)를 이용하여 세 가지 QuEChERS법의 회수율을 비교 검토하였다(Table 3). 그 결과 감귤에서는 세 가지 추출법 모두 우수하였으나 대두의 경우 spiropidion에서 회수율이 73.9-81.6%로 감귤에 비해 낮은 회수율을 보였다. 이는 대두 시료가 충분히 습윤화되지 않아 spiropidion이 추출되지 않은 것으로 판단되어 습윤화하는 물의 양을 10 mL로 증가시켜 검토한 결과 세 가지 추출법 모두에서 추출 효율이 증가하였다(Table 4). 현미와 감자, 고추 시료를 이용하여 세 가지 QuEChERS법의 회수율을 비교한 결과 회수율이 70% 이상으로 모두 만족할 만한 추출 효율을 보였으며(Table 5), 5가지 시료에 대하여 matrix effect를 비교하였다(Table 6). 검토 결과 식약처가 고시하고 있는 동시다성분 시험법의 통일성을 위하여 EN 15662법을 최종 추출 방법으로 확립하였다.

정제조건 확립을 위해 감귤과 대두 추출액을 이용하여 MgSO<sub>4</sub>와 PSA, C<sub>18</sub>, GCB를 각각 혼합한 조건으로 정제 효

Table 3. Comparisons of QuEChERS extraction for the determination of spiropidion and its metabolite in mandarin and soybean samples

Sample	Compound	Mean recovery $\pm$ RSD <sup>a</sup> (%)		
		Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Mandarin	Spiropidion	92.9 $\pm$ 0.9	87.3 $\pm$ 1.8	88.9 $\pm$ 1.0
	Spiropidion-enol (SYN547305)	90.9 $\pm$ 1.2	88.5 $\pm$ 1.7	87.0 $\pm$ 1.2
Soybean	Spiropidion	73.9 $\pm$ 3.1	81.6 $\pm$ 7.7	75.2 $\pm$ 4.5
	Spiropidion-enol (SYN547305)	81.6 $\pm$ 1.6	89.0 $\pm$ 4.4	80.9 $\pm$ 7.1

<sup>a</sup> Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

Table 4. Comparisons of QuEChERS extraction for the determination of spiropidion and its metabolite in soybean samples

Compound	Mean recovery $\pm$ RSD <sup>a</sup> (%)		
	Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Spiropidion	86.3 $\pm$ 2.0	84.2 $\pm$ 1.7	83.3 $\pm$ 0.9
Spiropidion-enol (SYN547305)	95.4 $\pm$ 1.3	94.4 $\pm$ 1.0	94.6 $\pm$ 1.6

<sup>a</sup> Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

Table 5. Comparisons of QuEChERS extraction for the determination of spiropidion and its metabolite in hulled rice, potato and green pepper samples

Sample	Compound	Mean recovery $\pm$ RSD <sup>a</sup> (%)		
		Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Hulled Rice	Spiropidion	77.4 $\pm$ 0.6	77.8 $\pm$ 4.5	75.7 $\pm$ 3.0
	Spiropidion-enol (SYN547305)	97.2 $\pm$ 9.9	97.7 $\pm$ 7.6	95.8 $\pm$ 4.4
Potato	Spiropidion	87.8 $\pm$ 1.8	90.7 $\pm$ 1.5	89.0 $\pm$ 1.4
	Spiropidion-enol (SYN547305)	88.6 $\pm$ 2.4	89.5 $\pm$ 2.0	87.1 $\pm$ 1.1
Green Pepper	Spiropidion	91.3 $\pm$ 0.6	89.8 $\pm$ 1.0	89.3 $\pm$ 1.7
	Spiropidion-enol (SYN547305)	90.2 $\pm$ 2.8	90.2 $\pm$ 2.6	87.3 $\pm$ 0.9

<sup>a</sup> Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

율을 비교하였다. 감귤 시료에서 Spiropidion의 경우 모든 조건에서 우수하였으나 대두 시료에서는 MgSO<sub>4</sub>와 PSA, C<sub>18</sub>, GCB를 모두 혼합한 경우 회수율은 49.9%로 부적합하다고 판단되었다(Table 7). 다른 조건들 중 MgSO<sub>4</sub>에 C<sub>18</sub>과 GCB를 모두 첨가한 조건이 색소의 간섭을 최소화하는데 적합하다고 판단하여 이를 최종 조건으로 선정하고 현미, 감자, 고추에 적용한 결과 모두 만족할 만한 추출 효율을 보였다(Table 8).

#### 기기분석조건 확립

Spiropidion과 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)은 구조내 C=O와 같은 발색단을 가지고 있어 UVD로 검출

이 가능하나 비교적 선택성이 높고, 낮은 농도 수준에서도 분석 감도를 확보하며 PLS (positive list system) 도입에 따른 정량한계 0.01 mg/kg 수준을 확보할 수 있는 액체크로마토그래프-질량분석기(liquid chromatograph-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)를 분석기기로 선정하였다. 컬럼은 잔류분석법에 많이 이용하는 C<sub>18</sub> 역상 컬럼을 선택하였고, 용리 방식은 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴과 0.1% 포름산 함유 수용액을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하였다. 이동상에 사용한 포름산은 protonation enhancer로서 spiropidion과 spiropidion-enol (SYN547305) 분자의 [M+H]<sup>+</sup> 이온 생성에 용이하게 작용하였다. 대상 성분의 이온화법으로는 ESI법의 positive-ion mode를 사용하였고,

Table 6. Comparisons of matrix effect between QuEChERS extractions for the determination of spiropidion and its metabolite in samples

Sample	Compound	Matrix effect <sup>a</sup>		
		Original	AOAC 2007.01	EN 15662
Hulled rice	Spiropidion	-59.70	-60.36	-59.52
	Spiropidion-enol (SYN547305)	-2.04	0.20	0.59
Potato	Spiropidion	9.67	15.07	7.60
	Spiropidion-enol (SYN547305)	-5.49	-5.17	-11.72
Soybean	Spiropidion	-22.56	-30.84	-25.85
	Spiropidion-enol (SYN547305)	-25.03	-22.04	-19.40
Mandarin	Spiropidion	-3.64	1.97	5.97
	Spiropidion-enol (SYN547305)	-12.21	-9.64	-6.88
Green pepper	Spiropidion	9.28	18.78	11.93
	Spiropidion-enol (SYN547305)	-9.83	-6.82	-8.04

<sup>a</sup> Matrix effect(%)=((Peak area of standard in matrix-peak area of standard in solvent)/peak area of standard in solvent)×100

Table 7. The recovery results of d-SPE for the determination of spiropidion and its metabolite in mandarin and soybean sample

Sorbent	Recovery ± RSD <sup>a</sup> (%)			
	Mandarin		Soybean	
	Spiropidion	Spiropidion-enol (SYN547305)	Spiropidion	Spiropidion-enol (SYN547305)
MgSO <sub>4</sub> 150mg, PSA 50mg, C <sub>18</sub> 50mg, GCB 7.5mg	80.2 ± 15.8	73.4 ± 13.9	49.9 ± 40.2	85.9 ± 20.6
MgSO <sub>4</sub> 150mg, PSA 25mg	93.4 ± 1.7	83.0 ± 3.1	87.4 ± 2.1	89.6 ± 2.2
MgSO <sub>4</sub> 150mg, C <sub>18</sub> 25mg	87.9 ± 3.2	90.4 ± 1.2	87.3 ± 4.2	99.8 ± 4.3
MgSO <sub>4</sub> 150mg, GCB 2.5mg	95.3 ± 3.0	94.4 ± 2.5	82.4 ± 0.6	94.1 ± 2.8
MgSO <sub>4</sub> 150mg, C <sub>18</sub> 25mg, GCB 2.5mg	90.3 ± 2.9	90.1 ± 1.1	85.7 ± 2.1	100.9 ± 2.1

<sup>a</sup> Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

Table 8. Comparisons of recovery results for spiropidion and its metabolite in hulled rice, potato and green pepper samples

Samples	Recovery ± RSD <sup>a</sup> (%)	
	Spiropidion	Spiropidion-enol (SYN547305)
Hulled rice	87.5 ± 1.2	106.5 ± 0.5
Potato	89.9 ± 1.0	85.7 ± 3.6
Green pepper	86.6 ± 2.9	84.6 ± 2.2

<sup>a</sup> Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation

Table 9. MRM (multiple reaction monitoring) conditions of spiropidion and its metabolite for analysis in ESI positive mode

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (g/mol)	Exact mass (g/mol)	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	CE <sup>b</sup> (eV)
Spiropidion	8.7	422.9	422.16	423	288 <sup>a</sup>	26
					264	34
					351	16
Spiropidion-enol (SYN547305)	6.5	350.9	350.13	351	288 <sup>a</sup>	22
					264	28
					319	14

<sup>a</sup> Quantification ion<sup>b</sup> Collision energy

확립한 분석조건을 바탕으로 TIC (total ion chromatogram)와 mass spectrum을 통해 최적 특성이온을 선정하고 SIM (selected-ion monitoring)으로 분석하였다. Spiropidion과 spiropidion-enol (SYN547305) 각각의 관측 질량은 422.16과 350.13이며 표준용액(0.1 mg/L)을 일정한 속도(10 µL/min)로 질량 검출기에 직접 주입한 결과 spiropidion과 spiropidion-enol (SYN547305)의 [M+H]<sup>+</sup>형태인 질량으로 각각 423과 351 *m/z* 값으로 확인하였다. 이 때 cone voltage의 변화에 따른 최적화 과정을 통해 spiropidion과 spiropidion-enol (SYN547305)는 각각 40 V와 56 V에서 최대 peak가 나타남을 확인하였다. 최적화된 cone voltage 상태에서 분석의 선택성과 검출 강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) 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 설정하여 확인하였다. 분석조건에서 선정된 특성 이온과 최적의 collision energy는 Table 9에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시 시료 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 5종의 농산물 시료에 대해 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

### 시험법 유효성 검증

Spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 선택성은 표준용액, 무처리시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 비교하여 평가하였다. 무처리 시료와 회수율 시료는 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 시료 중 spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 머무름 시간과 질량 대 전하비(*m/z*)가 같은 어떠한 방해물질도 검출되지 않았으므로 시료 중 spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)을 분석하기 위해 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). Matrix-matched 표준용액의 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 spiropidion 및 대사산물 spiropidion-

enol (SYN547305)의 표준용액을 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*<sup>2</sup>) 0.99 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(Fig. 2-3). 설정한 LOD와 LOQ로 계산한 결과 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg으로 나타났다. 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 spiropidion 및 spiropidion-enol (SYN547305)의 회수율 실험을 5반복으로 수행하였다. LOQ 50배 수준의 처리농도 시료는 무처리 추출물로 5배 희석하여 검량선의 범위 내에서 정량하였다. 각 농도에서 spiropidion 및 spiropidion-enol (SYN547305)의 평균 회수율은 79.4-108.4%이었다. 상대표준편차는 모두 7.2% 이하로 codex 가이드라인(codex alimentarius commission, CAC/GL 40-1993, 2003)의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 10-11).

### 실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성을 검증하기 위해 광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 타 실험실에 동일하게 제공한 후 분석한 회수율 및 상대표준편차를 비교하여 확인한 결과 각 농도에서 spiropidion 및 대사산물 spiropidion-enol (SYN547305)의 평균 회수율은 78.0-113.5%, 상대표준편차는 12.8% 이하로 확인되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 83.0-102.5%, 변이계수(CV)는 14.4% 이하로 나타났다(Table 10-11). 따라서 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993, 2003)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.

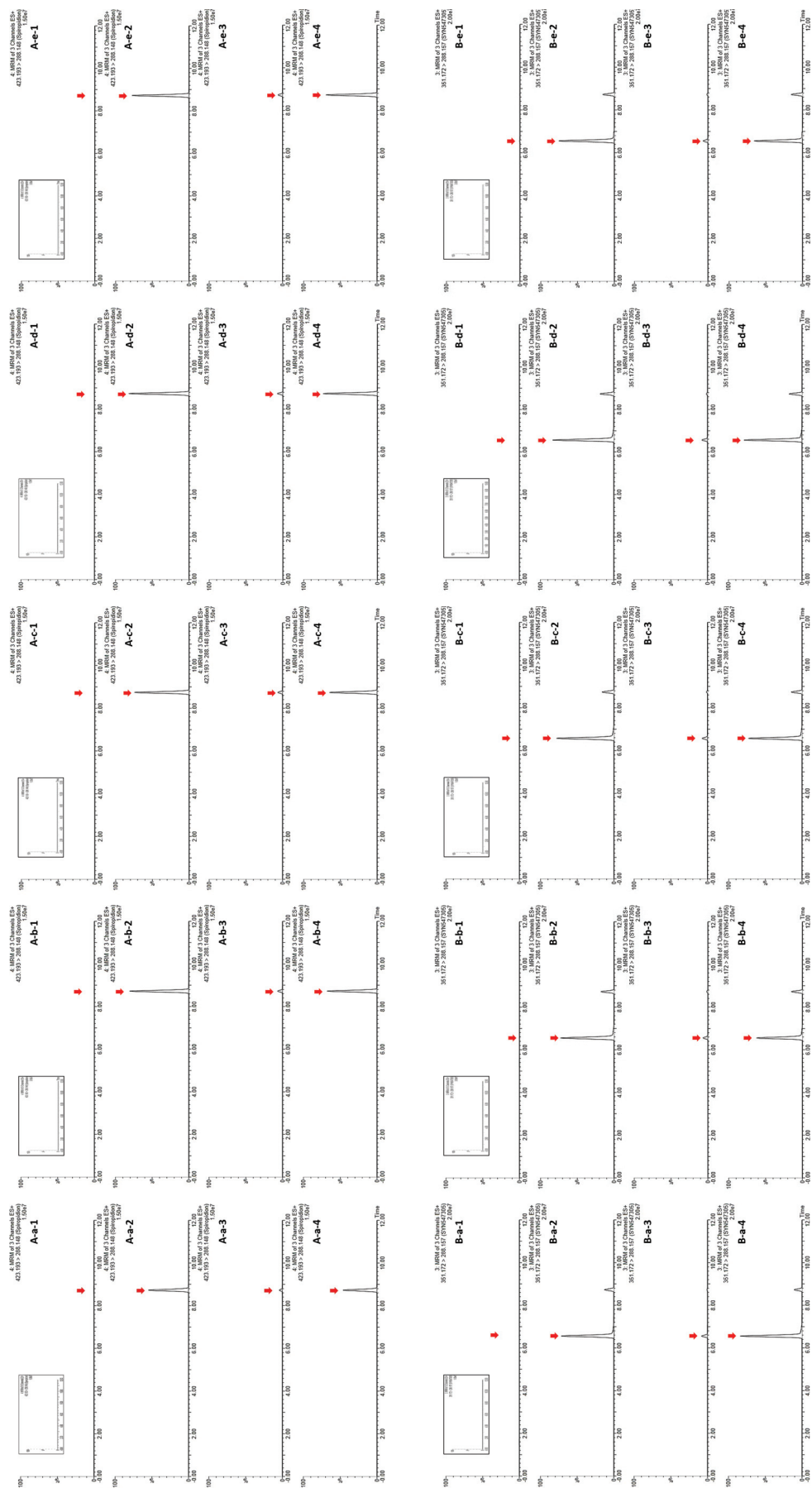


Fig. 1. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatograms of (A) spiropidion (423>288), (B) spiropidion-enol (351>288) corresponding to : (1) matrix-matched control, (2) matrix-matched standard solution at 0.025 mg/L, (3) sample spiked at 0.01 mg/kg in (a) hulled rice, (b) potato, (c) soybean, (d) mandarin, and (e) green pepper.



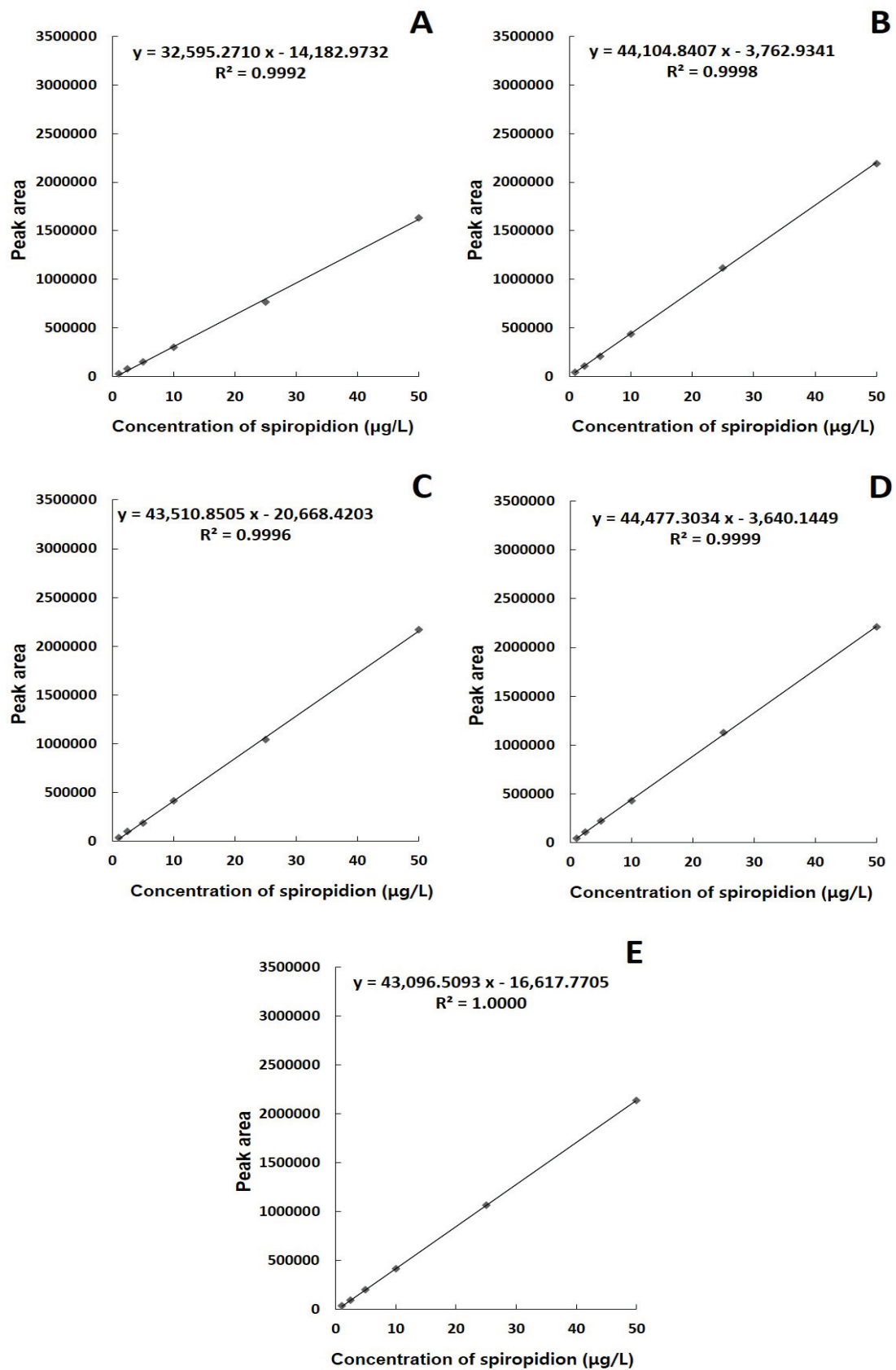


Fig. 2. Matrix-matched calibration curves of spiropidion in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

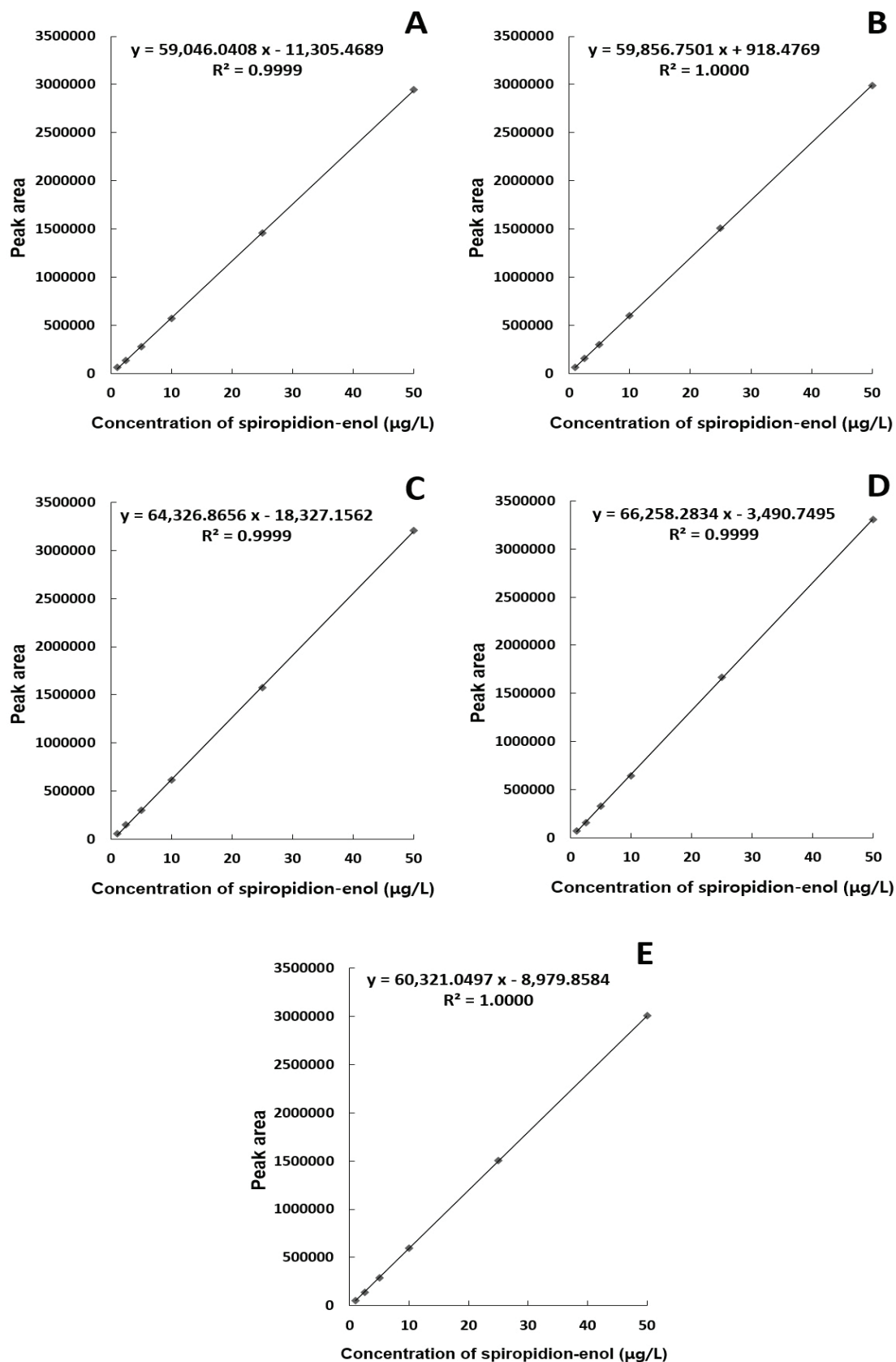


Fig. 3. Matrix-matched calibration curves of spiropidion-enol (SYN547305) in (A) hulled rice, (B) potato, (C) soybean, (D) mandarin and (E) green pepper.

Table 10. Validation results of analytical method for the determination of spiropidion residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery $\pm$ RSD <sup>a</sup> (%)		Ave <sup>d</sup> (%)	CV <sup>e</sup> (%)	LOQ <sup>f</sup> (mg/kg)
		Lab. A <sup>b</sup>	Lab. B <sup>c</sup>			
Hulled rice	0.01	91.4 $\pm$ 1.4	113.5 $\pm$ 8.0	102.5	12.8	0.01
	0.1	79.4 $\pm$ 5.3	101.3 $\pm$ 2.7	90.4	13.9	
	0.5	82.6 $\pm$ 1.8	89.1 $\pm$ 10.4	85.9	8.8	
Potato	0.01	89.5 $\pm$ 1.4	88.0 $\pm$ 0.4	88.8	1.4	
	0.1	86.0 $\pm$ 1.7	84.7 $\pm$ 0.7	85.4	1.6	
	0.5	86.7 $\pm$ 4.1	86.8 $\pm$ 0.7	86.8	3.0	
Soybean	0.01	98.5 $\pm$ 1.4	78.0 $\pm$ 5.1	88.3	13.3	
	0.1	85.3 $\pm$ 2.4	80.6 $\pm$ 2.0	83.0	3.9	
	0.5	88.7 $\pm$ 2.0	91.0 $\pm$ 0.6	89.9	2.0	
Mandarin	0.01	92.3 $\pm$ 2.8	82.3 $\pm$ 1.8	87.3	6.7	
	0.1	92.9 $\pm$ 1.8	85.0 $\pm$ 1.7	89.0	5.2	
	0.5	92.8 $\pm$ 3.0	91.0 $\pm$ 1.1	95.0	4.9	
Green pepper	0.01	98.2 $\pm$ 2.7	85.5 $\pm$ 4.2	91.9	8.3	
	0.1	92.0 $\pm$ 2.4	86.6 $\pm$ 2.1	89.3	4.0	
	0.5	94.9 $\pm$ 1.5	93.5 $\pm$ 1.8	94.2	1.8	

<sup>a</sup> Mean values of 5 or 3 times repetitions with relative standard deviation

<sup>b</sup> Ministry of Food and Drug Safety

<sup>c</sup> Gwangju Regional Food and Drug Administration

<sup>d</sup> Recovery average of inter-laboratory

<sup>e</sup> Coefficient of variation of inter-laboratory

<sup>f</sup> Limit of quantification

Table 11. Validation results of analytical method for the determination of spiropidion-enol (SYN547305) residues in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery $\pm$ RSD <sup>a</sup> (%)		Ave <sup>d</sup> (%)	CV <sup>e</sup> (%)	LOQ <sup>f</sup> (mg/kg)
		Lab. A <sup>b</sup>	Lab. B <sup>c</sup>			
Hulled rice	0.01	108.4 $\pm$ 5.3	88.9 $\pm$ 3.2	98.7	11.5	0.01
	0.1	102.6 $\pm$ 7.2	101.2 $\pm$ 1.4	101.9	4.6	
	0.5	104.5 $\pm$ 6.4	81.7 $\pm$ 4.2	93.1	14.4	
Potato	0.01	86.7 $\pm$ 1.8	86.1 $\pm$ 1.8	86.4	1.9	
	0.1	85.4 $\pm$ 0.6	96.4 $\pm$ 2.0	90.9	6.8	
	0.5	87.7 $\pm$ 2.3	100.2 $\pm$ 2.2	94.0	7.6	
Soybean	0.01	101.1 $\pm$ 1.4	91.5 $\pm$ 12.8	96.3	10.1	
	0.1	92.8 $\pm$ 1.8	90.2 $\pm$ 2.0	91.5	2.4	
	0.5	104.1 $\pm$ 1.7	92.8 $\pm$ 2.5	98.5	6.6	
Mandarin	0.01	94.1 $\pm$ 2.9	84.4 $\pm$ 2.7	89.3	6.6	
	0.1	92.7 $\pm$ 2.3	89.3 $\pm$ 4.9	91.0	4.3	
	0.5	94.5 $\pm$ 1.5	94.5 $\pm$ 6.8	94.5	4.7	
Green pepper	0.01	91.1 $\pm$ 1.4	84.1 $\pm$ 2.4	87.6	4.8	
	0.1	88.6 $\pm$ 1.6	91.2 $\pm$ 4.6	89.9	3.8	
	0.5	90.8 $\pm$ 1.6	98.0 $\pm$ 3.3	94.4	4.8	

<sup>a</sup> Mean values of 5 or 3 times repetitions with relative standard deviation

<sup>b</sup> Ministry of Food and Drug Safety

<sup>c</sup> Gwangju Regional Food and Drug Administration

<sup>d</sup> Recovery average of inter-laboratory

<sup>e</sup> Coefficient of variation of inter-laboratory

<sup>f</sup> Limit of quantification

## Note

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgement

This study was supported by the Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Republic of Korea under the paradigm of a study on risk assessment and establishment of new analytical method for safety management of pesticide residues in food (21161MFDS 364).

## References

1. Umetsu N, Shirai Y (2020) Development of novel pesticides in the 21st century. *Journal of Pesticide Science*, 45(2), 55-74. <https://doi.org/10.1584/jpestic.s.D20-201>.
2. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM (2006) Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 223-227. <https://doi.org/10.1042/BST0340223>.
3. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Chenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
4. Yang Y, Lin G, Liu L, Lin T (2022) Rapid determination of multi-antibiotic residues in honey based on modified QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 374, 131733. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131733>.
5. Wu Y, An Q, Li D, Kang L, Zhou C, Zhang J, Pan C (2022) Multi-residue analytical method development and risk assessment of 56 pesticides and their metabolites in tea by chromatography tandem mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 375, 131819. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131819>.
6. Harischandra NR, Pallavi MS, Bheemanna M, PavanKumar K, Reddy VCS, Udaykumar NR, Paramasivam M, Yadav S (2021) Simultaneous determination of 79 pesticides in pigeonpea grains using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 347, 128986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128986>.
7. Harischandra Naik R, Pallavi MS, Pavan Kumar K, Vanitha BK, Chandra Sekhara Reddy V, Shwetha A, Nandini S, Naveenkumar P, Udaykumar Nidoni R et al. (2021) 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(9), 1788-1805. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02000-9>.
8. Melo MG, Carqueijo A, Freitas A, Barbosa J, Silva AS (2020) Modified QuEChERS Extraction and HPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of 155 Pesticide Residues in Rice (*Oryza sativa* L.). *Foods*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.3390/foods901018>.
9. Hu M, Qiu J, Zhang H, Fan X, Liu K, Zeng D, Tan H (2018) Method development and validation of indaziflam and its five metabolites in soil, water, and fruits by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10300-10308. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04186>.
10. Guo Q, Zhao S, Zhang J, Qi K, Du Z, Shao B (2018). 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(8), 1543-1552. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1472395>.
11. Rahman MM, Kim SW, Na TW, Abd El-Aty AM, Lee YJ, Park JS, Ramadan A, Lee HS, Chung HS et al. (2016) 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. *Journal of Separation Science*, 39(11), 2079-2086. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600151>.
12. Rejczak T, Tuzimski T (2015) A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 13(1), 980-1010. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>.
13. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N (2010) Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2548-2560. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>.

- 
14. Lehotay SJ, Maštovská K, Lightfield AR (2005) 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. *Journal of AOAC International*, 88(2), 615-629. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.615>.
  15. Wilkowska A, Biziuk M (2011) Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125, 803-812. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094>.