

Development of analytical method for determination of spinetoram residues in livestock using LC-MS/MS

Ah-Young Ko¹, Heejung Kim², Jung Ah Do¹, Jin Jang¹, Eun Hyang Lee¹, Yun Ji Ju¹,
Ji Young Kim³, Moon-Ik Chang¹,★ and Gyu-Seek Rhee¹

¹Pesticide 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,

²Dental and Gastroenterology Devices Division, Medical Device Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety,

³Imported Food Analysis Division, Seoul Regional Food and Drug Administration, Seoul 07978, Korea

(Received March 8, 2016; Revised April 7, 2016; Accepted April 7, 2016)

LC-MS/MS를 이용한 축산물 중 Spinetoram 공정시험법 개발 및 검증

고아영¹ · 김희정² · 도정아¹ · 장 진¹ · 이은향¹ · 주윤지¹ · 김지영³ · 장문익¹,★ · 이규식¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과,
²식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의료기기심사부 구강소화기과,
³서울지방식품의약품안전청 수입식품분석과
(2016. 3. 8. 접수, 2016. 4. 7. 수정, 2016. 4. 7. 승인)

Abstract: An analytical method was developed to determine the amount of spinetoram (spinetoram J and spinetoram L) in livestock samples. The spinetoram was extracted with acetonitrile and purified through a primary secondary amine (PSA) sorbent. The spinetoram residues were then quantified and confirmed using a liquid chromatography–tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) in the positive ion mode using multiple reactions monitoring (MRM). Matrix-matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.005-0.5 mg/kg) into a blank extract with $r^2 > 0.994$. The limits of detection and quantification were 0.002 and 0.01 mg/kg, respectively. The recovery results of spinetoram ranged between 81.9-106.4% at different concentration levels (LOQ, 10LOQ, 50LOQ, $n=5$) with relative standard deviations (RSDs) less than 10%. All values were consistent with the criteria ranges requested in the Codex guidelines (CAC/GL40, 2003). An interlaboratory study was conducted to validate the method. The proposed analytical method proved to be accurate, effective, and sensitive for spinetoram determination. The method will be used as an official analytical method in Korea.

요 약: 이 연구는 수입을 포함한 국내 유통 축산물 중 spinetoram의 안전관리를 위한 공정시험법을 확립하기 위해 수행하였으며 시험법의 선택성, 검출한계 및 정량한계, 회수율에 대한 검증을 통하여 공정 시험법으로의 유효성을 확인하였다. Spinetoram을 효과적으로 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 분석기기로 사용하였고, acetonitrile으로 추출 후 PSA를 이용한 d-SPE정제법을 적용하여 시료의 불순물을 정제하

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-4204 Fax : +82-(0)43-719-4200

E-mail : 1004@korea.kr

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.

였다. 개발된 spinetoram 시험법의 직선성은 농도 대비 피크면적과의 결정계수(r^2)가 0.994 이상으로 우수하였으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 0.002, 0.01 mg/kg으로 높은 감도를 나타내었다. 축산물 시료 중 모든 처리구에서 평균 회수율은 81.9-106.4%였고, 분석오차는 10% 이하로 정확성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 광주청과의 실험실간 검증 결과에서도 평균 회수율 87.4-109.1%를 나타내어 모두 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)의 기준을 부합하는 것을 확인하였다. 따라서 개발된 시험법은 낮은 검출한계 및 정량한계, 우수한 직선성, 회수율 시험을 통한 양호한 정밀성 및 재현성 등이 입증되어 축산물 중 spinetoram을 분석하기 위한 식품공전 공정시험법으로 활용하고자 한다.

Key words: spinetoram, LC-MS/MS, analytical method, livestock

1. 서 론

국민소득 수준의 향상에 따른 식생활의 서구화 및 국경 없는 식품 유통구조의 발전 등으로 한국인의 육류 소비는 급증하였고, 육식의 대중화가 진행되었다. 국민 1인당 육류소비량은 2014년 조사에 따르면 2000년에 비해 약 34% 증가한 42.7 kg으로, 육류 수요가 높아지면서 국내 공급으로 부족한 부분을 수입에 의존하여 수입량도 함께 증가하는 추세이다.^{1,2} 특히 2004년 칠레와 자유무역협정(FTA, free trade agreement)을 최초로 체결한 이후 아세안(10개국), EU(28개국), 미국, 호주, 중국 등 FTA체결 국가가 확대되면서 축산물 시장개방이 가속화되어 육류의 수입량이 2004년 47,680건에서 2015년 131,490건으로 크게 증가하였다.^{3,4} 국내에 유통되는 수입 축산물의 양이 증가함에 따라 중국산 닭고기 발암물질 검출 등 유통 축산물에 대한 위해사고가 꾸준히 발생하고 있으며, 소비자들이 식품에 대한 의식수준이 높아져 가격 보다는 안전성을 중시하여 축산물을 소비하므로 축산물의 안전성 확보와 국민 건강 증진을 위해 체계적인 관리가 필요하였다.

축산물의 위해요소는 농약, 중금속, 식품첨가물, 동물용의약품 등 화학적 요인과 식중독 유발세균, 항생제 내성균 등 생물학적 요인 등으로 나뉜다. 그 중 농약은 다양한 경로를 통해 식육, 지방, 계란, 우유와 같은 동물유래 식품에 잔류하여 인체건강에 잠재적인 위해영향을 일으키는데, 농약이 잔류되는 경로는 벼짚, 옥수수 등 사료로 이용되는 농산물에 잔류하여 가축이 섭취하거나, 동물용의약품과 동일한 목적으로 가축에 직접적용, 또는 해충방지를 위해 가축사육지역에 살포되는 경우 등이 있다.^{5,6} 이러한 이유로 우리나라는 국내유통 축산물의 안전성 확보를 위하여 1994년 유기인계, 유기염소계, 카바메이트계 17종의 농약에 대하여 최초로 잔류허용기준을 신설한 이후 2016년

총 82종의 농약에 대한 기준을 설정하여 관리하고 있다.⁷

Spinetoram은 토양 방선균의 일종인 *Saccharopolyspora spinosa*의 배양액으로부터 추출된 천연 살충성분 spinosyn계통 화합물의 일부 화학구조를 전환하여 상용화된 약제로 spinetoram J형(50-90%), spinetoram L형(50-10%)의 혼합물로 구성되어 있다. Spinosad와 유사하게 나방류 애벌레(lepidopterous larvae), 굴나방(leafminer) 및 총채벌레 등 해충 내의 신경자극 전달체 중 nicotinic acetylcholine receptor를 활성화하여 정상적 자극전달을 저해하는 작용기작을 갖는다고 보고되었다.⁸⁻¹⁰ 또한, 다른 neonicotinoid계 살충제와는 별개의 생화학적 기전을 저해하므로 neonicotinoid계 살충제에 저항성을 갖는 해충에 대한 방제효과가 뛰어나다는 장점을 가지고 있다.¹¹

Spinetoram은 2007년 뉴질랜드에서 최초로 승인되었으며 유럽연합, 미국, 일본, 호주, 캐나다, 홍콩 등 전 세계적으로 사용하고 있고, 사용 작물 및 적용해충이 광범위하다. 따라서 축산물에 여러 경로를 통해 잔류 및 오염되어 잔류할 가능성이 있으므로 축산물에 대한 기준을 설정하여 관리할 필요가 있다. Spinetoram에 대한 잔류물의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정되나 두개 유효성분(spinetoram J형, spinetoram L형)의 총합으로 한다. 2016년 현재 spinetoram에 대한 축산물 중 국외 잔류허용기준은 국제식품규격위원회(Codex), 일본(Japan), 유럽연합(EU), 미국(USA)에서 소, 돼지, 닭, 우유, 알 등에 0.01-5.5 mg/kg 수준으로 설정하여 관리하고 있고,¹²⁻¹⁵ 국내에서는 가금류고기 외 7종의 축산물에 0.01-0.2 mg/kg 수준으로 잔류허용기준을 설정하여 관리할 예정이다(식품의약품안전처 공고 제 2015-325호, '15.10.15.).¹⁶ 따라서 본 연구에서는 수입을 포함한 국내 유통 축산물에 잔류할 수 있는

spinetoram에 대한 안전관리를 위하여 잔류허용기준 초과 여부를 판단할 수 있는 공정시험법을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 재료

Spinetoram (96.71 %) 표준품은 Dow Agrosicence (Indiana, USA)에서 제공받아 분석물질로 사용하였고 (Table 1), acetonitrile (ACN), methanol 등은 HPLC 등

급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 또한 ammonium acetate는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, PSA (primary secondary amine)는 Agilent Technologies (CA, USA)에서 구입하였다. 검체는 식품의약품안전처에서 축산물 중 잔류농약 시험법 개발 시 고려하는 대표축산물 5 종인 소고기(등심), 돼지고기(목살), 닭고기(닭가슴살), 알(전란)을 시중에서 구입하여 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50 °C에 보관하여 실험에 사용하였고, 우유는 구입 후 실험에 바로 사용하였다.

Table 1. Chemical structures and physicochemical properties of spinetoram

Property	Spinetoram	
Structure		
Composition	Spinetoram J (major component)	Spinetoram L (minor component)
IUPAC name	Mixture 50-90% (2R, 3aR, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-deoxy-3-O-ethyl-2,4-di-O-methyl- α -L-mannopyranosyloxy)-13-[(2R, 5S, 6R)-5-(dimethylamino)tetrahydro-6-methylpyran-2-yloxy]-9-ethyl-2, 3, 3a, 4, 5, 5a, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16a, 16b-hexadecahydro-14-methyl-1H-as-indaceno[3,2-d] oxacyclododecine-7-15-dione	Mixture 50-10% (2R, 3aR, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-deoxy-3-O-ethyl-2,4-di-O-methyl- α -L-mannopyranosyloxy)-13-[(2R, 5S, 6R)-5-(dimethylamino)tetrahydro-6-methylpyran-2-yloxy]-9-ethyl-2,3, 3a, 5a, 5b, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16a, 16b-tetradecahydro-4,14-dimethyl-1H-as-indaceno[3,2-d] oxacyclododecine-7-15-dione
CAS No.	187166-40-1	187166-15-0
Classification	Insecticide	Insecticide
Molecular formula	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₀	C ₄₃ H ₆₉ NO ₁₀
Molecular weight	748.0	760.0
Melting point	143.4 °C	70.8 °C
Density	1.1495 mg/cm ³ (19.5 °C)	1.1807 mg/cm ³ (19.5 °C)
Log P _{ow}	2.44 (pH 5) 4.09 (pH 7) 4.22 (pH 9)	2.94 (pH 5) 4.49 (pH 7) 4.82 (pH 9)
pKa	7.86 (25 °C)	7.59 (25 °C)
Vapor pressure	5.3 × 10 ⁻² mPa (20 °C)	2.1 × 10 ⁻² mPa (20 °C)
Solubility in water	423 (pH 5) 11.3 (pH 7) 6.27 (pH 10) all in mg/L, 20 °C	1630 (pH 5) 46.7 (pH 7) 0.706 (pH 10) all in mg/L, 20 °C
Solubility in solvent	acetone: >250 methanol: >250 n-oxtanol: 132	acetone: >250 methanol: >250 n-oxtanol: 132
	ethyl acetate: >250 1,2-dichloroethane: >250 xylene: >250 heptane: >61.0 all in g/L, 20 °C	ethyl acetate: >250 1,2-dichloroethane: >250 xylene: >250 heptane: >61.0 all in g/L, 20 °C

2.2. 표준원액 및 표준용액의 조제

Spinetoram 표준품 20.7 mg을 10 mL의 acetonitrile에 용해하여 1,000 µg/mL의 표준원액을 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 각 축산물 시료의 무처리 추출물 900 µL에 10 µg/mL 표준용액 100 µL를 넣어 1.0 µg/mL의 matrix-matched 표준용액을 조제한 뒤 무처리 추출액을 이용하여 단계적으로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 및 0.5 µg/mL의 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4 °C에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.3. 추출 및 정제

균질화된 검체 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 취하여 acetonitrile 20 mL를 가하고 5 분간 진탕한 후 원심분리기를 이용하여 4 °C, 3000 G로 5 분간 원심분리한 뒤 상층액을 취해 새로운 원심분리관에 옮겼다. 남아있는 검체에 acetonitrile 20 mL를 추가로 가하여 5 분간 진탕하고 4 °C, 3000 G로 5 분간 원심분리한 후 상층액을 취해 앞의 추출물과 합하였다. 합

한 추출물에 acetonitrile을 더하여 50 mL로 정용한 뒤, 상층액 20 mL를 PSA 500 mg이 담긴 50 mL 원심분리관에 옮겨 2 분간 강하게 흔들고 이를 4 °C, 3000 G로 5 분간 원심분리하였다. 정제된 상층액 중 10 mL를 40 °C이하의 수욕 중에서 감압하여 용매를 모두 날려버린 다음 2 mM ammonium acetate in methanol/acetonitrile (50/50, v/v) 용액으로 용해하여 최종부피 2 mL가 되게 한 뒤 멤브레인 필터로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

2.4. LC-MS/MS 분석조건

축산물 시료 중 spinetoram 잔류분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS, Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer)를 사용하였고, 역상(C₁₈) 칼럼을 선택하였으며 이동상으로 2 mM ammonium acetate in methanol/acetonitrile (50/50, v/v) 과 2 mM ammonium acetate in water를 사용하여 최적화된 기울기 용리방식을 적용하였다. 대상성분의 이온화법은 ESI (electro-spray ionization)법의 positive-

Table 2. Analytical conditions for the determination of spinetoram

Instrument	LC:Acquity UPLC(Waters, MA, USA) MS/MS: US/Quattro Premier XE (Waters, MA, USA)	
UPLC conditions		
Column	XBridge [®] C ₁₈ (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 µm)	
Column temp.	40 °C	
Flow rate	0.2 mL/min	
Injection volume	5 µL	
Mobile phase	A: 2 mM ammonium acetate in methanol/acetonitrile (50/50, v/v) B: 2 mM ammonium acetate in distilled water	
		Mobile phase
	Time (min)	A(%)
		B(%)
	0	70
	4	70
Gradient table	9	100
	10	100
	12	70
	16	70
		30
		30
		0
		0
		30
		30
MS/MS conditions		
Ion mode	ESI positive mode	
Capillary voltage	4.5 kV	
Source temp.	150 °C	
Desolvation temp.	350 °C	
Desolvation gas flow	600 L/h	
Cone gas flow	50 L/h	

ion mode를 사용하였다. LC-MS/MS 분석조건은 Table 2와 같다.

2.5. 시험법의 검증

확립된 spinetoram 시험법의 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 회수율(recovery), 재현성(reproducibility)에 대해 유효성(availability)을 검증하였다. 직선성의 확인을 위하여 spinetoram을 각 무처리 시료 시험용액으로 희석하여 조제한 표준용액 0.005-0.5 µg/mL의 농도 범위에 대한 각각의 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 검출한계와 정량한계는 크로마토그램상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 각각 3, 10 이상으로 하였다. 시험법의 정확성 및 재현성을 평가하기 위하여 각 시료의 무처리 시료에 spinetoram 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 처리농도는 대표축산물 5종에 대하여 정량한계, 정량한계의 10 배, 정량한계의 50 배에 해당하는 농도로 각 시료에 5 반복으로 수행하였으며, 평균과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)를 계산하여 시험법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한 서울지방식품의약품안전청과 실험실간 검증을 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 최적기기분석조건 확립

Spinetoram의 물리화학적 특성은 분자량이 748 (spinetoram J), 760 (spinetoram L)으로 다른 농약에 비해 분자량이 크고, 증기압이 5.3×10^{-2} mPa (spinetoram J), 2.1×10^{-2} mPa (spinetoram L)로서 휘발성이 낮으며, 헤리성 화합물이므로 기기분석에는 주로 HPLC를 이용한다. 현행 식품공전(4.1.4.126)에서는 HPLC-UVD (High Pressure Liquid Chromatograph-UV/Vis absorption detector)를 이용하여 246 nm 파장에서 분석하는 방법을 선택하였다.¹⁷ 그러나 본 시험법에서는 현재 spinetoram에 대한 축산물에 설정된 MRL이 농산물에 비해 낮은 수준으로 고감도 분석이 요구되기 때문에 시료의 간섭물질에 영향을 받지 않아 선택성이 높고 감도가 우수한 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS, Liquid Chromatograph-Tandem Mass spectrometer)를 분석기기로 선정하였다. 기기 특성상 잔류시험법 개발 후 재확인을 위한 분석기기로 사용되므로 spinetoram

에 대한 잔류물의 정확성 및 신뢰성을 동시에 확보할 수 있었다. 분석용 칼럼은 분석대상 물질의 Log P_{ow} 가 2.44-4.82 (pH 5-9)로 pH 변화에 따라 중간극성-비극성의 특성을 띠는 점을 고려하여 극성물질에서 비극성물질까지 폭넓게 분리 가능한 C_{18} 칼럼을 이용하였고 2 mM ammonium acetate in methanol/acetonitrile (50/50, v/v)과 2 mM ammonium acetate in water를 이 동상으로 사용하는 기울기 용리 방식으로 분석하였다. 이 동상에 사용한 ammonium acetate는 protonation enhancer로서 spinetoram 분자의 dimethylamine기에서 protonation을 용이하게 하여 $[M+H]^+$ 이온을 생성하도록 하였다. 이때 spinetoram J형과 L형은 각각의 최적 분석 조건을 설정하여 분석하였는데, total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 통해 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. Spinetoram (spinetoram J형, L형 혼합) 표준용액(1 µg/mL)을 일정한 속도 (10 µL/min)로 질량검출기에 직접 주입하고 cone voltage의 변경(10-70 V)을 통해 45 V에서 두 화합물 모두 각 분자의 $[M+H]^+$ 이온의 peak가 최대 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 분석의 선택성과 검출강도를 극대화시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였다. 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. 최적 기기분석 조건은 Table 2에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성 이온과 머무름 시간은 Table 3에 나타내었다. 또한 LC-MS/MS 분석 시에는 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강현상이 나타날 수 있으므로 검체별로 matrix-matched calibration법에 준하여 정량하였다.

3.2. 추출 및 정제조건의 확립

현행 식품공전(4.1.4.126) spinetoram 시험법에서는 균질 된 농산물 시료에 acetone을 가하여 추출하고 흡인여과한 뒤 pH 5.5-6.5로 조절한 후 dichloromethane으로 분배하여 농축한 다음 silica cartridge로 정제한 뒤 HPLC-UVD로 분석하였다.¹⁷ Spinetoram은 Log P_{ow} 값이 2.4-4.5 (pH 5-7)인 화합물로 중간-비극성 농약 추출에 주로 사용하는 수용성 유기용매인 acetone, acetonitrile이 추출용매로 사용가능하나, acetone을 축

Table 3. Selected-ion of LC-MS/MS for isoxaflutole and diketonitrile

Compound	Retention time (min)	Molecular weight	Precursor ion (m/z)	Fragment monitored (m/z)	CE ^{a)}
Spinetoram J	6.5	748.0	748.7	98.2	40
				142.2 ^{b)}	30
Spinetoram L	6.7	760.0	760.6	98.2	40
				142.2 ^{b)}	30

^{a)}Collision energy(eV)

^{b)}Quantitation ion

Table 4. Effects of extraction solvents on spinetoram extraction efficiency

Sample	1 Time extraction		2 Times extraction	
	Mean±RSD(%), (n=3)		Mean±RSD(%), (n=3)	
	Spinetoram J	Spinetoram L	Spinetoram J	Spinetoram L
Beef	62.5±11.7	58.0±8.4	101.5±24.2	107.4±18.5
Pork	69.4±9.1	70.7±13.0	90.6±14.6	107.1±21.3
Chicken	85.5±16.2	80.0±17.0	115.2±22.3	108.7±32.0

Table 5. Comparisons of purification solvents for spinetoram analysis

Sample	<i>n</i> -Hexane		<i>n</i> -Hexane (saturated ACN)	
	Mean±RSD(%), (n=3)		Mean±RSD(%), (n=3)	
	Spinetoram J	Spinetoram L	Spinetoram J	Spinetoram L
Beef	61.6±7.9	49.6±9.8	75.8±11.8	73.8±13.4
Pork	71.6±4.6	92.8±14.8	74.6±6.1	69.1±10.4
Chicken	81.8±19.9	82.5±5.0	84.2±12.8	77.6±4.5
Egg	-	-	59.1±11.5	58.9±13.0
Milk	-	-	80.5±14.1	95.1±11.2

산물 시료에 적용 시 시료 내 지방을 포함한 비극성 간섭물질이 동시에 추출 될 것으로 판단하였다. 축산물 시료의 경우 농산물에 비해 시료의 성분이 복잡하고 30% 내외의 지방 및 단백질을 포함하고 있어 추출 및 정제에 어려움이 있다. Acetonitrile은 비극성 간섭물질의 추출률이 비교적 낮고, 단백질을 변형시켜 침전물의 형태로 제거할 수 있는 장점이 있어¹⁸⁾ acetonitrile을 추출용매로 선정하였다. 그러나 acetonitrile로 1회 추출하였을 때 추출효율은 58.0-85.5%로 낮았고, 2회 추출 하였을 때 추출효율이 90.6-115.2%로 증가하였으나 재현성이 낮았다(Table 4). 이는 유지에 대한 용해성이 상대적으로 낮은 acetonitrile을 추출용매로 사용할 경우 1회 추출로는 효과적인 추출효율을 얻을 수 없었고, 2회 추출하였을 때 추출효율이 높아지는 것으로 확인하였다. 다만, 1회 추출보다 2회 추출하였을 때 재현성이

낮았는데 이는 추출효율이 높아짐에 따라 시료 내 간섭물질의 양도 증가하여 matrix effect가 크게 나타나는 것으로 보여 acetonitrile로 2회 추출 후 추가적인 정제과정이 요구되었다.

Matrix effect를 최소화하기 위하여 유지를 비롯한 비극성 간섭물질의 정제는 *n*-hexane과 acetonitrile을 이용한 분배법을 적용하였다. 100% *n*-hexane과, 미리 acetonitrile로 포화시킨 *n*-hexane을 이용하여 spinetoram에 대한 분배효율을 비교한 결과, 미리 acetonitrile로 포화된 *n*-hexane으로 분배하는 것이 100% *n*-hexane을 이용하는 것 보다 효과적임을 확인할 수 있었으나 분배과정 중 손실되는 spinetoram의 양이 많아 일부 시료에서 회수율이 저조하였다. 특히 알의 경우 회수율이 60% 미만으로 CODEX 가이드라인에 부합하지 않아 적용이 불가하였다(Table 5). 때문에 spinetoram의 손실량은 최소화하고, 보다 우수한 정제효과를 얻기 위해

Table 6. Comparisons of purification sorbent for spinetoram analysis

Sample	PSA		C ₁₈	
	Mean±RSD (%), (n=3)		Mean±RSD (%), (n=3)	
	Spinetoram J	Spinetoram L	Spinetoram J	Spinetoram L
Beef	90.0±2.6	86.8±5.2	64.4±11.3	58.9±10.7
Pork	87.3±12.5	82.3±3.3	68.0±6.3	67.2±0.9
Chicken	85.4±8.0	84.4±2.0	67.0±6.4	62.7±1.4
Egg	90.4±5.6	98.3±7.5	61.3±16.8	65.4±5.5
Milk	98.4±2.0	95.7±2.7	60.5±20.4	66.2±6.7

PSA (primary and secondary amine) 또는 C₁₈ (octadecylsilane)을 흡착제로 사용하는 d-SPE(dispersive-solid phase extraction)정제방법을 적용 후 각각의 효율을 비교하였다(Table 6).

그 결과, PSA를 이용할 경우 82.3-98.4%로 양호한 회수율을 보였고, 재현성이 우수한 반면 C₁₈을 이용할 경우에는 58.9-68.0%로 상대적으로 낮은 회수율을 보였다. 이는 spinetoram의 Log P_{ow}가 중성-약염기성(pH 7-9) 상태일 때 4.09-4.82인 비극성 화합물이므로 비극성을 띠는 C₁₈에 일부가 흡착하여 회수율이 낮게 나타나는 것으로 보이며, PSA를 사용할 때에는 spinetoram의 구조상 PSA와 결합할 수 있는 작용기가 포함되어 있지 않아 회수율에는 영향을 미치지 않고 PSA가 갖는 두 개의 아미노(-NH₂) 그룹이 카복실(-COOH) 그룹을 갖는 축산물 시료 내 유기산 및 지방산 등과 강한 수소결합을 하여 효과적인 제거가 가능한 것으로 보인다. 이러한 과정으로 인해 matrix effect와 분석대상 물질의 손실을 최소화 하여 높은 회수율과 우수한 재현성을 얻을 수 있었다.

3.3. 시험법의 검증

3.3.1. 선택성 및 직선성

Spinetoram의 선택성(selectivity)은 표준용액, 무처리 시료, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 비교 평가하였다. 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 시료를 확립된 시험방법에 따라 분석한 결과, 무처리 시료 중 spinetoram의 J형과 L형의 머무름 시간과 질량대 전하비(m/z)가 같은 어떠한 간섭물질도 검출되지 않아 본 시험법의 높은 선택성을 확인할 수 있었다. 또한, 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 표준원액을 각 무처리 추출물로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 그리고 0.5 µg/mL 5 µL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 결정계수(r²)가 0.994 이상으로 높은 직선성을 보였다(Fig. 1).

3.3.2. 검출한계와 정량한계

Spinetoram의 검출한계는 기기 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio) 3 이상으로 결정하여 분석기기의 최소검출량 0.005 ng에 따른 검출한계는 0.002 mg/kg이었고, 정량한계는 신호 대 잡음비(S/N ratio) 10 이상으로 결정한 정량 가능한 최소검출량 0.025 ng으로 계산식에 따라 0.01 mg/kg이었다. 검출한계 및 정량한계의 산출식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned} \text{검출한계 (mg/kg)} &= \text{최소검출량 (ng)} \times \\ &\frac{1}{\text{시료량(g)}} \times \frac{\text{추출용매(mL)}}{\text{분획량(mL)}} \times \frac{\text{최종희석부피(mL)}}{\text{시료 주입량(µL)}} \\ &= 0.005(\text{ng}) \times \frac{1}{5(\text{g})} \times \frac{50(\text{mL})}{10(\text{mL})} \times \frac{2(\text{mL})}{2(\text{µL})} = 0.002 \text{ mg/kg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{정량한계 (mg/kg)} &= \text{최소검출량 (ng)} \times \\ &\frac{1}{\text{시료량(g)}} \times \frac{\text{추출용매(mL)}}{\text{분획량(mL)}} \times \frac{\text{최종희석부피(mL)}}{\text{시료 주입량(µL)}} \\ &= 0.025(\text{ng}) \times \frac{1}{5(\text{g})} \times \frac{50(\text{mL})}{10(\text{mL})} \times \frac{2(\text{mL})}{2(\text{µL})} = 0.01 \text{ mg/kg} \end{aligned}$$

3.3.3. 시험법의 회수율

시험법의 정확성을 평가하기 위하여 5종의 축산물 시료에 정량한계, 정량한계의 10 배, 정량한계의 50 배 수준인 0.01, 0.1과 0.5 mg/kg의 농도로 회수율 실험을 5회 반복하여 수행하였다. 시험 결과 각 농도에서 spinetoram의 평균 회수율은 81.9-106.4%이었고, 이때 상대표준편차는 9.7% 미만으로 조사되어 잔류물 분석에 관한 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)¹⁹의 잔류농약 분석 기준에서 상대표준편차가 처리농도 >0.001 mg/kg ≤0.01 mg/kg의 30%, >0.01 mg/kg ≤0.1 mg/kg의 20%, >0.1 mg/kg ≤1 mg/kg의 15%보다 낮아 기준에 부합하므로 모든 분석물질에 대한 높은 정확성, 재현성, 효율성 확인 및 잔류농약 분석 기준에 적합함

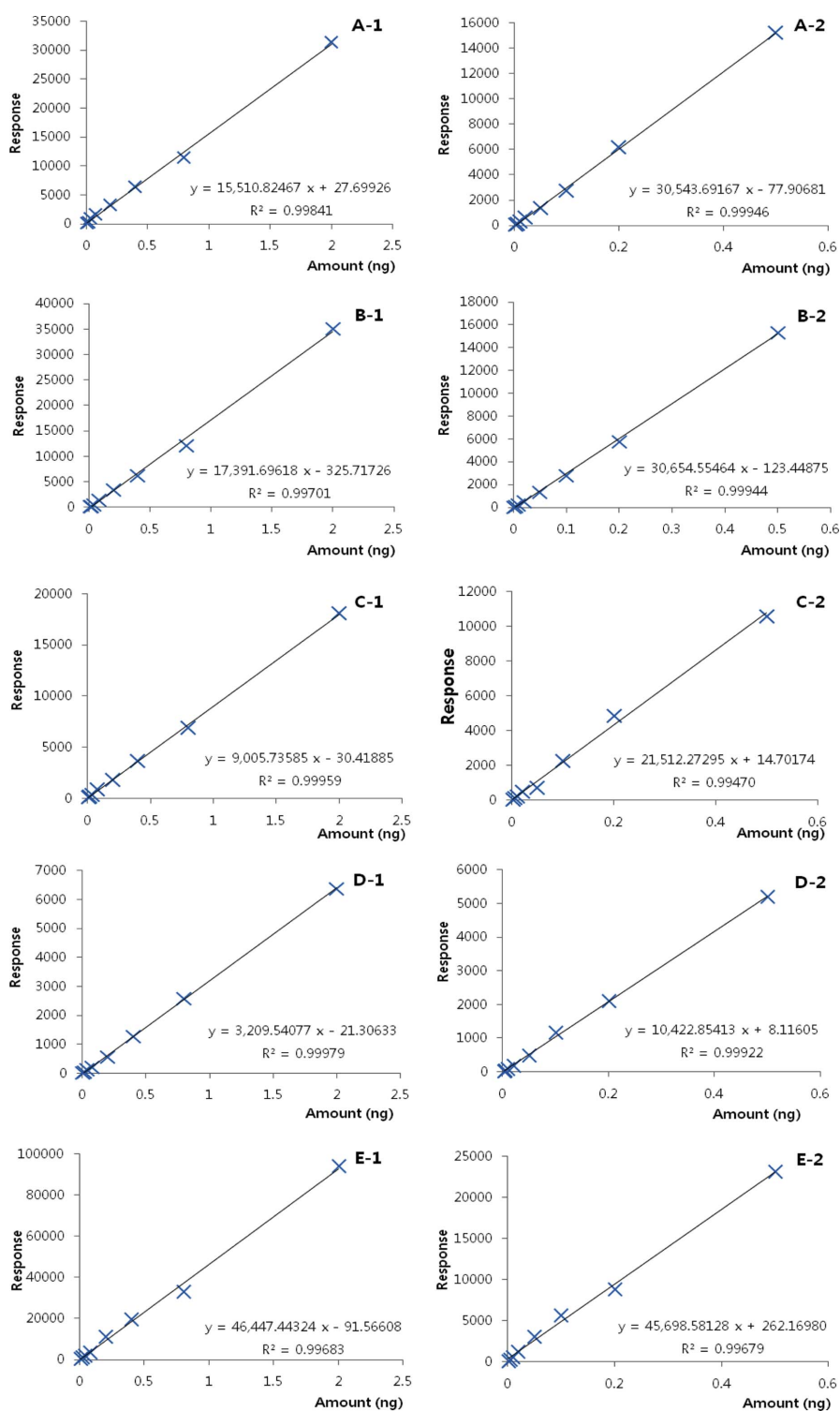


Fig. 1. Matrix matched calibration curves of (1) spinetoram J and (2) spinetoram L in (A) beef, (B) pork, (C) chicken, (D) Egg and (E) milk.

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

Sample	Fortification (mg/kg)	Mean ^{a)} ± RSD (%)	LOQ (mg/kg)
Beef	0.01	100.7 ± 8.1	0.01
	0.1	106.4 ± 3.1	
	0.5	104.3 ± 8.2	
Pork	0.01	81.9 ± 8.9	
	0.1	84.6 ± 4.7	
	0.5	97.7 ± 6.2	
Chicken	0.01	87.7 ± 6.4	
	0.1	89.3 ± 9.7	
	0.5	106.2 ± 7.3	
Egg	0.01	103.3 ± 7.1	
	0.1	102.6 ± 5.9	
	0.5	90.8 ± 7.3	
Milk	0.01	104.1 ± 4.7	
	0.1	92.4 ± 2.1	
	0.5	101.5 ± 6.7	

^{a)}Mean values of 5 times repetitions with relative standard deviation.

을 확인할 수 있었다(Table 7). LC-MS/MS를 이용하여 분석한 spinetoram의 회수율 크로마토그램은 Fig. 2에 제시하였다.

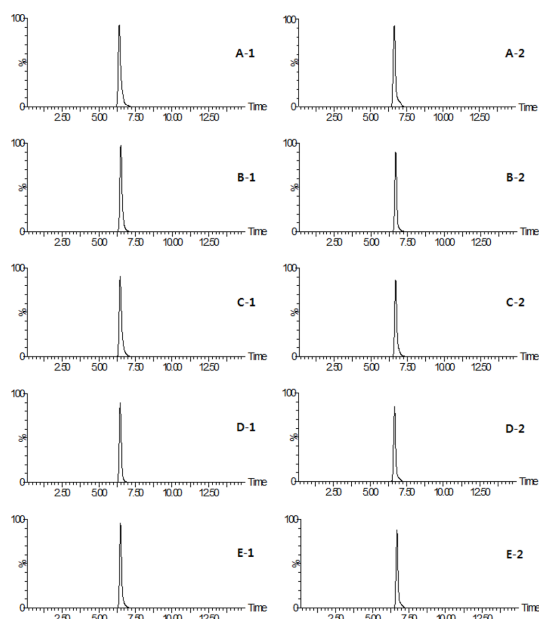


Fig. 2. Representative MRM (quantification ion) recovery chromatogram (fortification concentration: 0.5 mg/kg) of (1) spinetoram J (748.7>142.2) and (2) spinetoram L (760.6>142.2) in (A) beef, (2) chicken, (3) pork, (4) egg, and (5) milk.

3.4. 실험실간 검증

시험법의 유효성 입증을 위해 광주지방식품의약품

Table 8. Inter-laboratory validation results of analytical method for spinetoram in livestock samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD(%)		Average ^{c)} (%)	CV ^{d)} (%)
		LAB1 ^{a)}	LAB2 ^{b)}		
Beef	0.01	100.7 ± 8.1	84.1 ± 0.6	92.4	12.6
	0.1	106.4 ± 3.1	111.9 ± 4.1		
	0.5	104.3 ± 8.2	110.9 ± 4.8		
Pork	0.01	81.9 ± 8.9	92.9 ± 8.3	87.4	8.8
	0.1	84.6 ± 4.7	104.0 ± 1.5		
	0.5	97.7 ± 6.2	96.1 ± 7.8		
Chicken	0.01	87.7 ± 6.4	104.1 ± 9.3	95.9	12.1
	0.1	89.3 ± 9.7	113.1 ± 4.6		
	0.5	106.2 ± 7.3	107.1 ± 4.7		
Egg	0.01	103.3 ± 7.1	102.5 ± 0.9	102.9	0.6
	0.1	102.6 ± 5.9	115.2 ± 1.8		
	0.5	90.8 ± 7.3	107.8 ± 0.9		
Milk	0.01	104.1 ± 4.7	99.0 ± 2.4	101.5	3.5
	0.1	92.4 ± 2.1	102.3 ± 5.7		
	0.5	101.5 ± 6.7	106.7 ± 5.0		

^{a)}Ministry of Food and Drug Safety

^{b)}Seoul Regional Food and Drug Administration

^{c)}Recovery average of inter-laboratory

^{d)}Coefficient of variation of inter-laboratory laboratory

안전청 유해물질분석과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 광주지방식품의약품안전청에 제공하고 동일한 방법으로 분석을 수행한 후 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 검증 결과 각 농도별 spinetoram의 평균 회수율은 84.1-115.2%이고 표준편차는 9.3% 미만으로 측정되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 87.4-109.1%, 변이계수(CV%) 또한 17% 미만으로 모든 처리구에서 CODEX 가이드라인에서 제시한 기준 처리농도 $> 1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $\leq 0.01 \text{ mg}/\text{kg}$ 의 45%, $> 0.01 \text{ mg}/\text{kg}$, $\leq 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$ 의 32%를 모두 만족하는 것으로 확인되었다(Table 8).

감사의 글

This study was carried out with the support of "Safety Evaluation and Analysis Method on Pesticide Residues in Foods-2015(15161MFDS042)" from Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea in 2015.

References

1. K. J. Lee and M. S. Cho, *Korean J. Food Culture.*, **27**(5), 422-433 (2012).
2. Ministry of Agricultural Food and Rural Affairs, Major statistics of agricultural food and rural affairs (2015).
3. KCS(Korea Customs Service), FTA Trend in Korea. <http://www.customs.go.kr/kcshome/site/index.do?layout-siteId=ftaportalkor>, Assessed 1 January 2016.
4. Animal and Plant Quarantine Agency, Quarantine statistics of animal and livestock http://eminwon.qia.go.kr/statistics/statistics_No1.jsp, Assessed 2016.
5. OECD Guidance Document, OECD guidelines for the testing of chemicals, Residues in livestock (2007).
6. M. LeDoux and *J. Chromatogr. A.*, **1218**, 1021-1036 (2011)
7. Ministry of Food and Drug Safety(MFDS), MRLs for Pesticide in Foods, 2013.
8. EPA(United states Environmental Protection Agency), office of prevention, pesticides and toxic substances. Pesticide fact sheet for spinetoram (2009).
9. EPSA(European Food Safety Authority), Setting of an import tolerance for spinetoram in peaches (including nectarines) and apricots, *EPFA Journal*, **7**(9), 1312 (2009).
10. C. Macbean, The pesticide manual, 16th ed, BCPC, pp. 1040-1041, hampshire, UK, 2012.
11. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Analytical methods of pesticide residues in foods, pp. 824-829, 4th ed. Korea, 2013.
12. CODEX, Pesticide Residue in Food and Feed. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pes-tes/pesticide/enAssessed> 2014.
13. Japan, The Japan Food Chemical Research Foundation. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>, Assessed 2015.
14. EU(European Commission), Pesticide database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>, Assessed 2014.
15. EPA(United states Environmental Protection Agency) <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/ECFR?SID=69440ce5a203b1b965485809036fa4d0&mc=true&page=simple>, Assessed 2011.
16. Ministry of Food and Drug Safety NO. 2015-325 (2015.10.15),
17. Ministry of Food and Drug Safety, Korean Food Standards Codex, 2015.
18. C. Polson, P. Sarkar, B. Inledon, V. Raguvaran, and R. Grant, *J. Chromatogr. B.*, **785**, 263-275 (2003).
19. CAC(CODEX Alimentarius Commission), Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy, 2003.