

pH조절 분배추출에 의한 식물체 중 Methoxyfenozide와 Bentazone의 HPLC 분석

노석초 · 황철환 · 유기용 · 한성수*

원광대학교 생명환경학부
(2007년 7월 4일 접수, 2007년 9월 19일 수리)

Analysis of Methoxyfenozide and Bentazone in Plant with HPLC by pH-Adjusted Liquid-liquid Partition Cleanup

Seog-Cho Lo, Cheol-Hwan Hwang, Ki-Yong Yoo, and Seong-Soo Han* (Division of Bio-Environmental Science, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea)

ABSTRACT: This study was performed to enhance the cleanup efficiency of methoxyfenozide and bentazone by pH adjustment in the course of liquid-liquid partition and to develop an optimum analytical conditions using HPLC coupled with DAD for two matrices, brown rice and rice straw. Preparation procedure of brown rice sample was "extraction→coagulation→liquid-liquid partition→florisil C.C", and this procedure was samely applied to two compounds. In rice straw, preparation procedure of methoxyfenozide sample was "extraction→alkalization→liquid-liquid extraction→coagulation→florisil C.C", and in the case of bentazone, "extraction→alkalization→liquid-liquid partition→acidification→liquid-liquid extraction→florisil C.C". All these purified samples were redissolved in the mobile phases, acetonitrile : 20 mM sodium acetate (75:25, v/v) for methoxyfenozide and acetonitrile : 75 mM sodium acetate, pH 6.0 (40:60, v/v) for bentazone. Recoveries of methoxyfenozide analysis in brown rice and rice straw were 83.5-97.4 and 86.4-97.3%, and detection limits were 0.02 and 0.04 mg/kg, respectively. Recoveries of bentazone in brown rice and rice straw were 86.8-101.9 and 88.3-94.5% and detection limits were 0.005 and 0.01 mg/kg, respectively. This methods seem to be usefully applied to the residue analysis of two compounds in the view of producing stable analytical condition and fair reproducibility.

Key Words: methoxyfenozide, bentazone, residue analysis, pH, HPLC

서 론

Methoxyfenozide[N-tert-butyl-N'-(3-methoxy-o-toluoyl)-3,5-xylohydrazide]는 1996년 개발되어 1998년 Rohm & Haas사가 상품화한¹⁾ diacylhydrazine계의 곤충생장조절(IGR)계 살충제로 곤충 molting hormone인 20-hydroxyecdysone의 agonist로 작용하여²⁾ 벼의 이화명나방과 흑명나방, 목초지의 멸강나방 및 배추, 고추, 파, 감, 사과, 감귤, 수박, 고구마, 딸기의 나방류 해충방제에 폭넓게 사용되고 있다³⁾. 1972년 독일 BASF사에서 개발된 bentazone [3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-

dioxide]은 광합성의 Hill 반응을 저해하여 살초효과를 나타내는 enzothiadiazinone계 접촉형 제초제⁴⁾이며, 논 잡초 방동사니파와 광엽잡초 방제에 유효하다⁵⁾. 국내에서는 단제 또는 합제로 수도 일년생 및 다년생 잡초와 보리와 옥수수의 광엽잡초 방제 약제로 현재까지 널리 사용되고 있다³⁾.

Methoxyfenozide의 분석은 과일과 채소를 대상으로 SPE나 액액분배 추출에 의한 정제 후 LC-MS/MS^{6,7)} 또는 HPLC-UV⁸⁾를 이용한 분석법이 주로 사용되며, 토양 시료의 경우 분배추출 후 Florisil 또는 silica gel column chromatography하여 HPLC-UV⁹⁾로 분석하는 방법 등 소수의 보고가 이루어져 있다. 이동상으로 대부분 acetonitrile과 물 혼합액을 사용하였으며⁶⁾, 컬럼 상태에 따라 ammonium acetate가 첨가되기도 하였다⁷⁾. 그러나 methoxyfenozide의 회수율 폭은 최소 27.8%에서 최대 73.9%로 상당히 큰 것으로 조사되어 분석법

*연락처:

Tel: +82-63-850-6678 Fax: +82-63-850-6678
E-mail: seshan@wonkwang.ac.kr

개선의 여지가 있었다^{7,24}.

Bentazone은 약산성의 화합물로 diazomethane에 의한 methylation에 의해 methyl ester로의 유도체화 과정을 거친 후 GLC-ECD에 의한 분석법이 제시되어 있긴 하지만^{10,11}, 액액분배와 SPE에 의한 정제 후 HPLC로 분석하는 것이 보편화 되어 있다. 이동상으로는 triethylamine(TEA)을 이용한 ion-pairing(or buffering)을 SPE에 의한 정제 과정과 역상컬럼을 이용한 분리에 적용하거나¹², 산해리상수(pKa) 이하에서 약산성 화합물의 이온화를 억제하여 역상컬럼에 머무름과 분리도가 향상되도록 hydrochloric acid¹³, formic acid¹⁴, acetic acid¹⁵, phosphoric acid^{16,17} 등에 의한 산성화를 통한 이온화억제(ionization-suppression)법도 적용되고 있으나 pH 2~3 이하의 강산성에서 컬럼의 silanol기를 분해시켜 컬럼 고정상에 손상을 줄 수 있어 중성의 온화한 조건에서 분리가 이루어지고 있다¹⁸. Bentazone 이외의 기타 산성 화합물에 대하여 phosphate buffer(pH 2.0-3.7)와 같은 산성 완충액을 사용하여 이온화 억제와 완충작용을 동시에 적용하거나 이온화억제와 ion-pairing을 동시에 적용하는 방법도 제시되어 있으며¹⁹, 새로운 컬럼 지지체 개발을 통한 분리력을 향상시키려는 시도도 이루어지고 있다¹³. 또한 근래에 액액분배(LLP), 초임계 유체추출(SFE), 겔 크로마토그래피(GPC), 고체상 추출(SPE)과 같은 방법이 방해성분의 제거와 검출한계를 낮추기 위한 간편한 정제도구로 사용되고 있고²⁰, 더불어 역상 컬럼을 이용한 이온성 성분의 분리를 위해 여러 buffering 시약의 소개와 함께, 위와 같이 실제 분석에 이용되고 있다²¹.

본 연구에서는 HPLC-UV 분석시 회수율이 낮거나 반복간 회수율 변동이 큰 경향을 보여 개선의 여지가 있는 methoxyfenozide의 회수율 변동폭을 줄이고 벚짚과 같이 방해성분이 다량 함유되어 있어 정제에 어려움이 있는 시료에 대한 methoxyfenozide와 bentazone의 정제도를 높이고자 현미와 벚짚에 대하여 응고법 적용과 액액분배시 pH조절을 통한 methoxyfenozide와 bentazone의 정제 가능성을 모색하고, 완충작용과 이온화 억제 효과가 가능한 sodium acetate buffer를 이용, 중성 영역의 pH에서 안정되고 효율적인 reversed-phase HPLC 분리 조건을 설정하고자 수행한 연구결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료 및 분석용 시약

공시재료인 현미와 벚짚 무처리 시료는 원광대학교 시험포장에서 재배된 남평벼를 10월 중 수확시기에 맞추어 sampling한 뒤 탈곡하여 현미와 벚짚으로 분리한 뒤 3일간 건조하였다. 현미는 정미기로 도정하여 1분도로 왕겨를 벗긴 현미를 cutting mill로 마쇄하였고, 벚짚은 cutter로 잘게 절단한 벚짚을 cutting mill로 마쇄하였으며, 각 마쇄시료를 40 mesh체를 통과시켜 지퍼백에 담아 -20℃에 냉동보관하면서 시료

로 사용하였다.

사용한 2종 농약의 표준품은 순도 97.0%의 methoxyfenozide와 순도 99.6%의 bentazone을 동부한농화학(주)로부터 분양받아 사용하였다(Fig. 1). 잔류분석을 위해 사용된 acetone, n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate 등의 유기용매는 잔류분석용으로 J. T. Baker(USA)사 제품을 구입하여 사용하였고, 추출시 여과보조제로 사용한 celite는 Hyflo Super Cel[®] medium(Fluka, USA)을, 정제를 위해 사용한 흡착제는 60~100 mesh의 Florisil(Aldrich, USA)을 사용하였으며, 탈수를 위해 Merck(Germany)사의 10~60 mesh의 무수황산나트륨을 사용하였다. 기기 분석시 이동상으로 J. T. Baker사의 HPLC급 water와 acetonitrile을 사용하였고, 기타 완충액 조제 및 응고법에 사용된 분석용 고체 및 액체시약들은 모두 Shinyo(Japan)와 Showa(Japan)사의 일급 또는 잔류용 특급시약을 사용하였다.

분석기기 및 장치

분석에 사용된 고성능액체크로마토그래프는 diode-array UV/VIS detector(NS 2100-D), degasser(Uniflows, Japan), dual piston pump(NS-2004 GP), column oven(AT 3000)으로 구성된 국산 Futecs HPLC system(Futecs, Korea)이었다. 각각의 성분분리를 위한 역상(reversed-phase) 컬럼은 methoxyfenozide 분석시 Gemini C18, Particle size 5 μm, 150×4.6 mm I.D.(Phenomenex, USA)를, 그리고 bentazone 분석시는 Luna C18(2), Particle size 5 μm, 250 × 4.6 mm I.D.(Phenomenex, USA)를 사용하였으며, 25℃로 유지되는 column oven에 장착하여 항온조건에서 재현성 있게 분리되도록 하였다. 또한 두 컬럼 모두 1.0×4.6 mm I.D.의 guard 컬럼(Phenomenex, USA)을 장착하여 보호하였다. 이외에 시료의 전처리 과정 중 현미검용정미기 DA-888(동아산업, Korea)을 이용하여 도정하였으며, 벚짚의 마쇄에 사용한 cutting mill은 J-NCM(Jisico, Korea), 회전전탕기는 SK-20

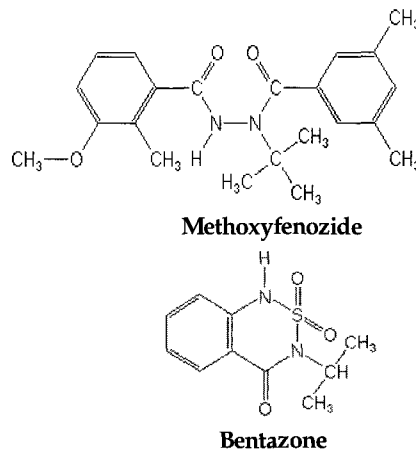


Fig. 1. Structural formulae of methoxyfenozide and bentazone.

(Hanshin, Korea), rotary vacuum evaporator 및 aspirator는 R-114(Büchi, Germany)와 SB-651(Eyela, Japan) 기종을 사용하였다.

이동상 및 기기 운용조건

Methoxyfenozide와 bentazone 분석을 위한 HPLC 이동상으로 sodium acetate buffer와 acetonitrile 혼합액을 사용하였다. 물, acetonitrile 및 acetonitrile : water(50:50, v/v)를 각각 1시간 이상 흘려 보내 column conditioning을 실시한 후 methoxyfenozide의 분리조건을 설정하기 위해 acetonitrile 함량을 45, 60, 75, 90%의 비율로 조제 후 각각의 혼합 조제액에 대하여 HPLC를 운용, 4 mg/kg이 되도록 희석된 표준용액을 5회 연속 주입하여 peak height의 재현성을 체크하였다. Bentazone의 경우는 AOAC법에 제시된 제품 분석방법²²⁾을 적용, sodium acetate buffer의 pH를 6.0으로 조절한 acetonitrile : 75 mM sodium acetate(40:60, v/v) 혼합액을 이동상으로 사용하였으며, 마찬가지로 2 mg/kg이 되도록 희석된 표준용액을 조제하여 5회 연속 주입하여 재현성을 체크하였다. UV 검출과장과 이동상의 유속은 두 약제 모두 220 nm와 0.5 mL/min이었으며, 시료 주입은 Rheodyne 7125i valve injector에 20 µL loop를 장착하여 20 µL가 주입되도록 하였다. HPLC 운용 전 이동상으로 사용된 모든 용매와 시료는 체크밸브 또는 컬럼오염 등을 방지하기 위해 0.45 µm Nylon 66 membranes(Altech, USA)을 통과시켰으며, 이동상을 degasser를 통과시켜 탈기시키면서 분석하였다.

표준용액 조제 및 검량선 작성

표준용액은 두 약제 모두 100 mg/kg이 되도록 methoxyfenozide 표준품은 10.3 mg, bentazone 표준품은 10.04 mg을 평량하여 100 mL의 acetonitrile에 녹여 조제하고, 호일로 빛을 차단하여 4°C에 저장하면서 분석조건 설정을 위한 희석액 조제에 사용하였으며, 표준 검량선 작성을 위한 working solution은 methoxyfenozide의 경우 acetonitrile에 용해된 100 mg/kg 표준용액 4 mL와 acetonitrile : 20 mM sodium acetate(75:25, v/v) 혼합액 96 mL를 혼합하여 4 ng/mL 용액을 조제하였으며, 이 용액을 acetonitrile : 20 mM sodium acetate(75:25, v/v)로 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ng/mL의 농도가 되도록 희석하여 조제하였다. Bentazone은 acetonitrile에 용해된 100 mg/kg의 표준용액 2 mL와 75 mM sodium acetate(pH 6.0) : acetonitrile(60:40, v/v) 혼합액 98 mL를 혼합하여 2 ng/mL 용액을 조제하였으며, 이 용액을 75 mM sodium acetate(pH 6.0) : acetonitrile (60:40, v/v)로 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ng/µL의 농도가 되도록 희석하여 조제하였다. 표준검량선은 각 성분의 희석 조제액 20 µL씩을 HPLC에 주입하여 얻어진 chromatogram상의 peak height를 기준으로 작성하였다.

시료 전처리 및 정제 과정

현미와 벧짚시료에서 대상 성분의 추출

Methoxyfenozide 분석시 현미시료와 벧짚시료는 각각 20 g과 10 g을, bentazone 분석시는 각각 40 g과 10 g을 평량하여 250 mL Erlenmeyer flask에 취한 후 증류수 40 mL와 acetone 100 mL를 가하여 40°C에서 30분간 진탕추출 한 후 이 추출액을 celite에 통과시켜 감압여과하고, acetone 50 mL로 용기 및 잔사를 씻어 감압여과한 뒤 감압농축하여 acetone을 유거한 수용액을 추출액으로 하였다.

응고법에 의한 현미시료의 분배추출

현미에 대하여 pH만을 조절하여 액액분배할 경우 유화하여 층 분리가 이루어지지 않아 분석과정에서 적용하지 않았고, 응고법을 적용한 후 액액분배하였을 때에는 유화없이 유기용매층으로 methoxyfenozide와 bentazone의 95%이상이 적용되었으며, 응고법 적용만으로 충분한 정제효과가 인정되어 두 약제 모두 응고법만을 적용하였다. 전처리 과정은 두 약제 모두 acetone이 유거된 각각의 현미 추출 수용액에 acetone 10 mL, 응고촉진제[H₃PO₄:NH₄Cl:H₂O(20 mL:10 g:780 mL)] 50 mL 및 celite 2 g을 가하여 30분 이상 방치한 후 celite와 함께 여과하여 고형 침전물을 제거하고 acetone 10 mL와 응고촉진제 50 mL로 용기 및 잔사를 씻어 감압여과하였다. 이 여과액을 합하여 300 mL 분액여두에 옮기고 methoxyfenozide는 n-hexane 100 mL와 50 mL로 각각 2회 분배추출하고 bentazone의 경우, dichloromethane 100 mL와 70 mL로 각각 2회 분배추출한 후 무수황산나트륨을 넣은 여과지를 통과시켜 수분이 제거된 n-hexane 추출액과 dichloromethane 추출액을 농축건고하여 각각 n-hexane 5 mL와 acetone : n-hexane(30:70, v/v) 5 mL에 용해시켜 Florisil column chromatography 정제용 시료로 하였다.

벧짚시료의 pH 조절을 통한 분배추출

Methoxyfenozide는 액액분배시 수용액층을 알칼리성으로 조절하여 3회 반복추출하였을 때 유기용매로 전용되는 양이 증가하였던 결과를 토대로 추출액을 알칼리화한 후 수용성 불순물을 제거하고 methoxyfenozide만을 추출하였다. 즉, acetone이 유거된 수용액을 10% NaCl 용액 50 mL로 씻어 300 mL 분액여두에 옮긴 뒤 1 M NaOH 용액 1 mL를 가하여 혼합한 뒤 n-hexane 100 mL씩으로 3회 분배추출한 후 무수황산나트륨을 넣은 여과지를 통과시켜 수분이 제거된 추출액을 감압농축 하였다. 그러나 HPLC 분석을 위해서는 잔여 불순물로 인해 직접주입이 불가하여 정제과정이 더 필요하였는데, 산성화하였을 때 pH에 따라 methoxyfenozide가 n-hexane 층으로 일부가 전용되어, 추출 또는 정제과정에 적용할 수 없어 산성화에 의한 추출 과정은 생략하고 응고법을 적용하였다. 적용과정은 알칼리화한 후 추출한 n-hexane 농축액을 acetone 10 mL로 용해시킨 다음 응고촉진제 50 mL

및 celite 2 g을 가한 후 1시간 이상 방치하여 색소 및 응고물을 침전시킨 뒤 celite와 함께 여과하였으며, acetone 10 mL와 응고촉진제 50 mL로 용기 및 잔사를 씻어 앞의 여과액과 합하였다. 이 여과액을 300 mL 분액여두로 옮기고 *n*-hexane 100 mL와 50 mL로 2회 분배추출하고 무수황산나트륨을 넣은 여과지를 통과시켜 수분을 제거한 다음 *n*-hexane 추출액을 농축 건조하여 *n*-hexane 5 mL에 재용해시켜 컬럼크로마토그래피 정제용 시료로 하였다. Bentazone 분배추출의 경우 알칼리성에서 유기용매로 전용되지 않았던 결과를 토대로 알칼리화한 후 지용성 불순물을 제거하였다. 이를 위해 acetone이 유거된 수용액을 5% NaCl 용액 50 mL로 씻어 300 mL 분액여두에 옮기고 1 M NaOH 용액 1 mL을 가하여 혼합한 뒤 dichloromethane 100 mL로 2분간 1회 진탕한 다음 dichloromethane 층을 버렸다. 다음으로 bentazone은 산성조건에서 유기용매 층으로 전용되며, 2회 추출만으로도 충분한 회수율을 얻었던 결과에 의거, 알칼리화 된 수용액층을 산성화하여 유기용매 층으로 전용시켜 추출해 내기 위해 12 M HCl 1 mL을 가하여 혼합하고 dichloromethane 100 mL와 50 mL로 2회 분배추출한 후 무수황산나트륨을 넣은 여과지를 통과시켜 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 dichloromethane 추출액을 농축 건조하여 acetone : *n*-hexane(30:70, v/v) 5 mL로 재용해시켜 컬럼크로마토그래피 정제용 시료로 하였다.

현미와 벧짚시료의 column chromatography

Glass column(1.5×30 cm)에 활성화시킨 Florisil 5 g을 *n*-hexane으로 습식충전하고 상단에 무수황산나트륨 1 g을 넣은 후 용매가 무수황산나트륨과의 경계면에 오도록 하였다. 이 컬럼에 methoxyfenozide는 상기의 *n*-hexane 5 mL에 용해된 시료를 column에 loading시킨 후 *n*-hexane : ethyl acetate (90:10, v/v) 50 mL로 세정하여 버리고, *n*-hexane : ethyl acetate (60:40, v/v) 50 mL로 methoxyfenozide를 용출하였으며, 이 용출액을 감압농축하여 acetonitrile : 20 mM sodium acetate(75:25, v/v) 4 mL(현미와 벧짚)로 정용하고, 이 중 20 µL를 HPLC(UVD)에 주입하여 분석하였다. 또한 bentazone은 상기의 acetone : *n*-hexane(30:70, v/v) 5 mL에 용해된 시료를 column에 loading시킨 후 acetone : *n*-hexane(30:70, v/v) 50 mL로 세정하여 버리고, *n*-hexane : ethyl acetate (80:20, v/v) 50 mL로 bentazone을 용출하였다. 이 용출액을 감압 농축하여 75 mM sodium acetate(pH 6.0) : acetonitrile(60:40, v/v) 4 mL(현미)와 2 mL(벧짚)로 각각 정용하고, 이 중 20 µL를 HPLC(UVD)에 주입하여 분석하였다. 두 약제의 전체 전처리 과정을 그림 2에 요약 비교하였다.

분석법의 적합성 검증

위와 같이 설정된 두 성분에 대한 분석방법이 적합한지 검증하기 위해 methoxyfenozide와 bentazone 두 성분

에 대한 검출한계의 10배와 40배의 농도로 spiking하고 3반복으로 회수율 실험을 수행하였다. Methoxyfenozide는 무처리 현미시료(20 g)에 0.2 mg/kg과 0.8 mg/kg, 벧짚시료(10 g)에 0.4 mg/kg과 1.6 mg/kg이 되도록 5 mg/kg과 20 mg/kg 표준용액 800 µL를 각각 가하고 균일하게 혼합하여 상기시료의 분석절차에 따라 추출, 정제한 후 HPLC로 분석하여 회수율을 구하였으며, bentazone의 경우는 무처리 현미시료(40 g)에 0.05 mg/kg과 0.2 mg/kg이 되도록 4 mg/kg과 16 mg/kg 표준용액 500 µL, 벧짚시료(10 g)에 0.1 mg/kg과 0.4 mg/kg이 되도록 2 mg/kg과 8 mg/kg 표준용액 500 µL를 각각 가하고 균일하게 혼합하여 상기 시료의 분석절차에 따라 추출, 정제한 후 HPLC로 분석하여 회수율을 구하였다. 회수율은 HPLC 분석 후 얻어진 크로마토그램 상의 peak height의 값을 직선회귀식에 대입, 각 성분량으로 환산하여 구하였다.

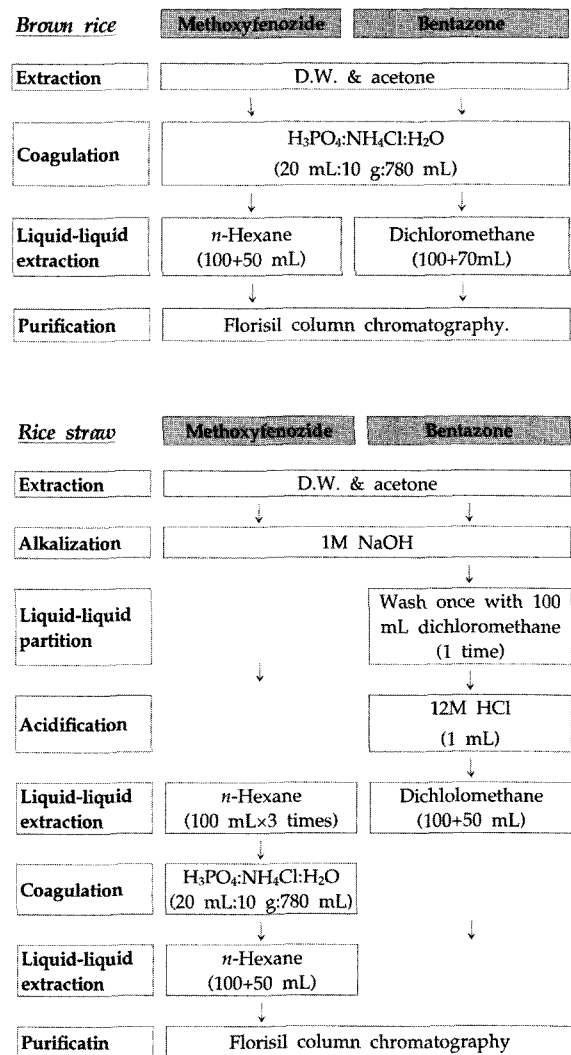


Fig. 2. Extraction and purification procedures of methoxyfenozide and bentazone in brown rice and rice straw.

결과 및 고찰

HPLC 분리조건 및 재현성

Bentazone의 경우 AOAC법²²⁾에 의한 acetonitrile : 75 mM sodium acetate(pH 6.0) (40:60, v/v) 혼합액에서 안정적으로 분석되었다. 그러나 methoxyfenozide의 경우 buffer와 acetonitrile의 비율에 따라 반복 주입하였을 때 재현성이 떨어져 sodium acetate buffer와 acetonitrile의 조성비를 변동시켜 실험한 결과 그림 3에 나타낸 바와 같이 acetonitrile 75% 수준에서 변이가 적고 안정적인 조건을 나타내어 이동상 조성비를 acetonitrile : 20 mM sodium acetate(75:25, v/v)로 설정하였다. 위 이동상을 사용하여 분석한 결과 methoxyfenozide와 bentazone의 머무름시간은 각각 6.2 min. 과 6.3 min.이었으며 반복 주입시 우수한 재현성을 보였다.

분배추출시 pH조절의 영향

분배 추출시 pH에 따른 영향을 검토하고자 각 성분의 일정농도를 spiking한 후 산과 알칼리 조건하에서 두 성분의 유기용매 층으로의 전용정도를 시험 한 결과 표 1의 결과와 같이 methoxyfenozide는 알칼리 조건에서 추출 횟수가 증가함

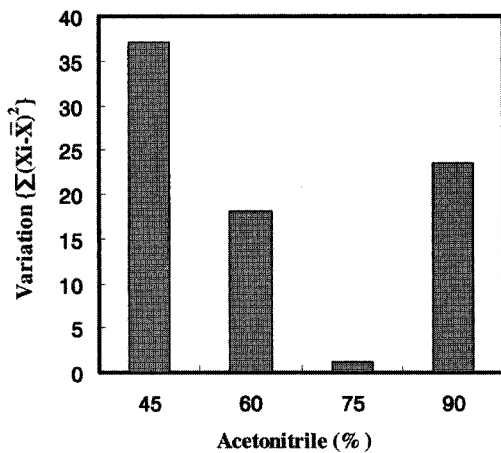


Fig. 3. Effect of acetonitrile content in the mobile phase for methoxyfenozide analysis.

에 따라 유기용매로 전용되는 양이 증가하였으며, bentazone은 전용되지 않았다. 또한 두 성분을 산성화하여 추출하였을 때 methoxyfenozide는 pH 변화에 따라 전용되지 않거나 전용되어도 전용되는 양이 적었으나, bentazone의 경우 추출 횟수가 증가함에 따라 90% 이상이 유기용매로 전용되었다. 또한 응고법 적용을 위한 시험에서는 두 약제 모두 응고법 적용으로 유기용매로의 전용이 용이해진 결과를 얻었다(자료 미제시). 위의 두 결과를 토대로 현미 무처리 추출액 시료에 대하여 알칼리화나 산성화를 통한 pH 조절 후 분배추출하였을 때 분배용매가 유화하여 층 분리에 어려움이 있었고, 두 약제 모두 응고법 적용이 가능하다는 위 결과를 근거하여 응고법을 적용한 뒤 분배추출하였을 때는 유화현상 없이 층 분리가 이루어졌다. 벗짚 추출액에 대해서는 methoxyfenozide의 경우 알칼리화하여 n-hexane으로 분배추출 하고, bentazone은 알칼리 조건에서 액액분배한 후 산성화하여 dichloromethane으로 분배추출한 뒤 HPLC에 주입하였을 때 두 성분의 크로마토그램상에서 상당량의 방해성분이 제거되는 효과가 있었다.

표준검량선 작성 결과

그림 4에 나타낸 바와 같이 최소자승법에 의해 구한 methoxyfenozide와 bentazone의 직선회귀식은 검량선 작성 범위인 2-80 ng과 1-40 ng에서 각각 $y=880.76x+122.59$ 와 $y=1275.3x+109.88$ 이었으며, 두 약제의 결정계수는 두 약제 모두 0.999 이상으로 검량선 작성 농도범위에서 주입농도와 peak height 간에 직선적 정의 상관관계가 인정되었다.

분석법의 회수율 및 검출한계

Methoxyfenozide와 bentazone 두 성분에 대한 분석방법의 적합성을 검증하기 위한 회수율 실험을 수행한 결과, methoxyfenozide의 경우 표 2에 나타낸 바와 같이 현미시료와 벗짚시료의 반복간 회수율 범위는 각각 83.5~97.4%와 86.4~97.3%로, Codex 분석기준에서 0.1 mg/kg 이상의 농도인 경우의 회수율 허용범위인 80-110%(C.V. 20%)에 적합하였을 뿐만 아니라²³⁾, Hall 등⁷⁾의 연구에서의 mint를 제외한 과일과 채소 분석시 회수율(81~129% 및 72~124%)과 Pest Management Regulatory Agency²⁴⁾의 regulatory note에

Table 1. Extraction efficacy by liquid-liquid partition frequencies after pH adjustment

| Compound | Spiking (mg/kg) | pH adjustment | Recovery (%) by partition frequency | | |
|-------------------------------|-----------------|---------------|-------------------------------------|------------|------------|
| | | | once | twice | thrice |
| Methoxyfenozide ^{a)} | 0.4 | alkalization | 63.2 ± 3.5 | 90.4 ± 3.2 | 93.3 ± 3.0 |
| | | acidification | 13.4 ± 1.9 | 15.7 ± 1.6 | 16.0 ± 1.5 |
| Bentazone ^{b)} | 0.4 | alkalization | NR ^{c)} | NR | NR |
| | | acidification | 83.3 ± 3.2 | 91.3 ± 4.2 | 91.6 ± 3.8 |

^{a)}Extraction volume; 100 mL (once), 100 mL (twice), 100 mL (thrice)

^{b)}Extraction volume; 100 mL (once), 50 mL (twice), 50 mL (thrice)

^{c)}Not recovered

서의 57.1~131%(pome fruits), 70-120% 범위내(grapes, peppers, tomatoes), 83.3-111.1%(cotton) 회수율 범위에 비해 안정되고 변이 폭이 작은 양호한 회수율을 보였다. 또한 본 연구에서 methoxyfenozide의 평균 회수율은 현미와 벧짚에서 각각 92.1%와 93.7%로 김 등⁸⁾이 분석한 목초 중 회수율 85.7%와 비교하여 향상된 결과를 나타내었다. Bentazone의 경우 각각 88.3~101.9%와 88.3~94.5% 범위로 농촌진흥청 농약잔류분석기준²⁵⁾에 준하는 결과와 함께 방해성분을 대부분 제거하는 결과를 얻었다. 벧짚 중 methoxyfenozide와 bentazone 분석 크로마토그램은 그림 5에 나타낸 바와 같이 현미 분석시와 동일한 크로마토그램 양상을 보였으며, 정량에

문제가 없어 충분한 정제가 이루어졌음을 알 수 있었다. 전 분석과정을 거쳐 해당 성분의 peak가 명확히 확인될 수 있는 조건에서 signal대 noise 비(S/N)의 3배로 한 최소검출량과 분석시료량, 정용액양, 주입량에 의해 계산한 두 성분의 검출한계는 현미와 벧짚에서 methoxyfenozide의 경우 각각 0.02와 0.04 mg/kg, bentazone의 경우 0.005와 0.01 mg/kg이었다. 위 결과에서와 같이 pH에 의해 해리상태에 영향을 받는 약제의 경우, pH 조절을 통한 분배추출로 불순물을 효과적으로 제거하고 목적 화합물이 효율적으로 추출되는 부분정제 효과를 얻을 수 있으며, HPLC 분석시 column 고정상의 특성과 분석성분의 해리성을 고려한 적절한 buffer 선택 및 용매와의

Table 2. Linearity, minimum detectable amount (MDA), limit of detection (LOD) and recoveries for the determination of methoxyfenozide and bentazone residues from brown rice and rice straw

| Compound | Linear range (ng/20 μ L) | Matrix | Spiking level (mg/kg) | Recovery(%) | | LOD (mg/kg) | MDA (ng) |
|-----------------|------------------------------|------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|----------|
| | | | | Mean \pm SD ^{a)} | C.V. ^{b)} | | |
| Methoxyfenozide | 2~80 | Brown rice | 0.2 | 96.0 \pm 1.4 | 1.4 | 0.02 ^{c)} | 2 |
| | | | 0.8 | 88.2 \pm 4.4 | 5.0 | | |
| | | Rice straw | 0.4 | 94.9 \pm 4.0 | 4.1 | 0.04 ^{d)} | 2 |
| | | | 1.6 | 92.5 \pm 1.1 | 1.2 | | |
| Bentazone | 1~40 | Brown rice | 0.05 | 91.4 \pm 2.8 | 3.0 | 0.005 ^{e)} | 1 |
| | | | 0.2 | 90.2 \pm 5.3 | 5.7 | | |
| | | Rice straw | 0.1 | 91.4 \pm 3.1 | 3.4 | 0.01 ^{f)} | 1 |
| | | | 0.4 | 90.2 \pm 1.2 | 1.3 | | |

a) Percent recovered \pm standard deviation of 3 replicates

b) (SD/Mean of recovery) \times 100

c) 2 ng \times 4 mL/20 μ L \times 1/20 g = 0.02 ppm

d) 2 ng \times 4 mL/20 μ L \times 1/10 g = 0.04 ppm

e) 1 ng \times 4 mL/20 μ L \times 1/40 g = 0.005 ppm

f) 1 ng \times 2 mL/20 μ L \times 1/10 g = 0.01 ppm

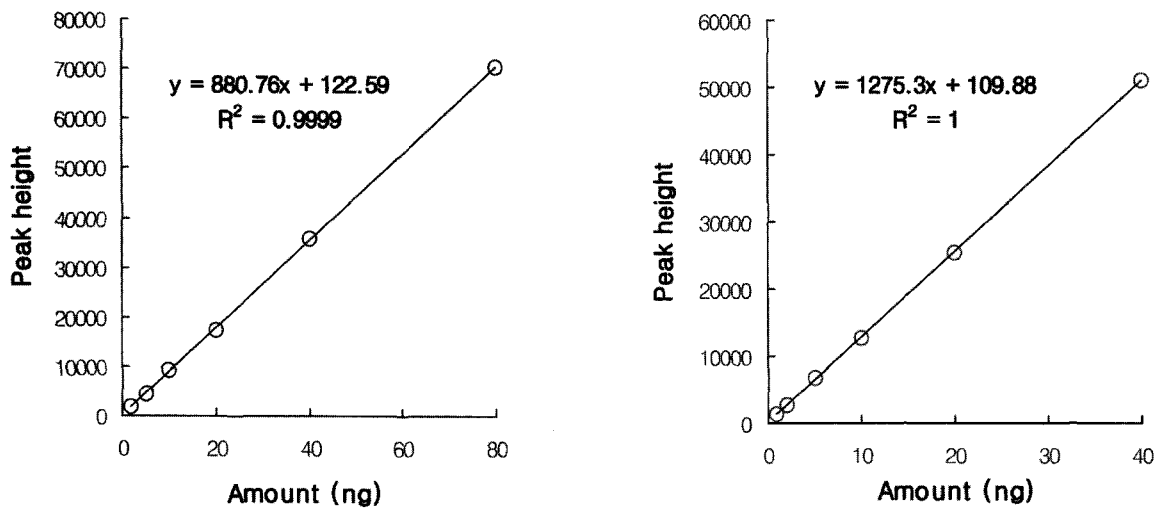


Fig. 4. Calibration curve, regression equation and coefficient of determination of methoxyfenozide (left) and bentazone (right) for the analysis of brown rice and rice straw.

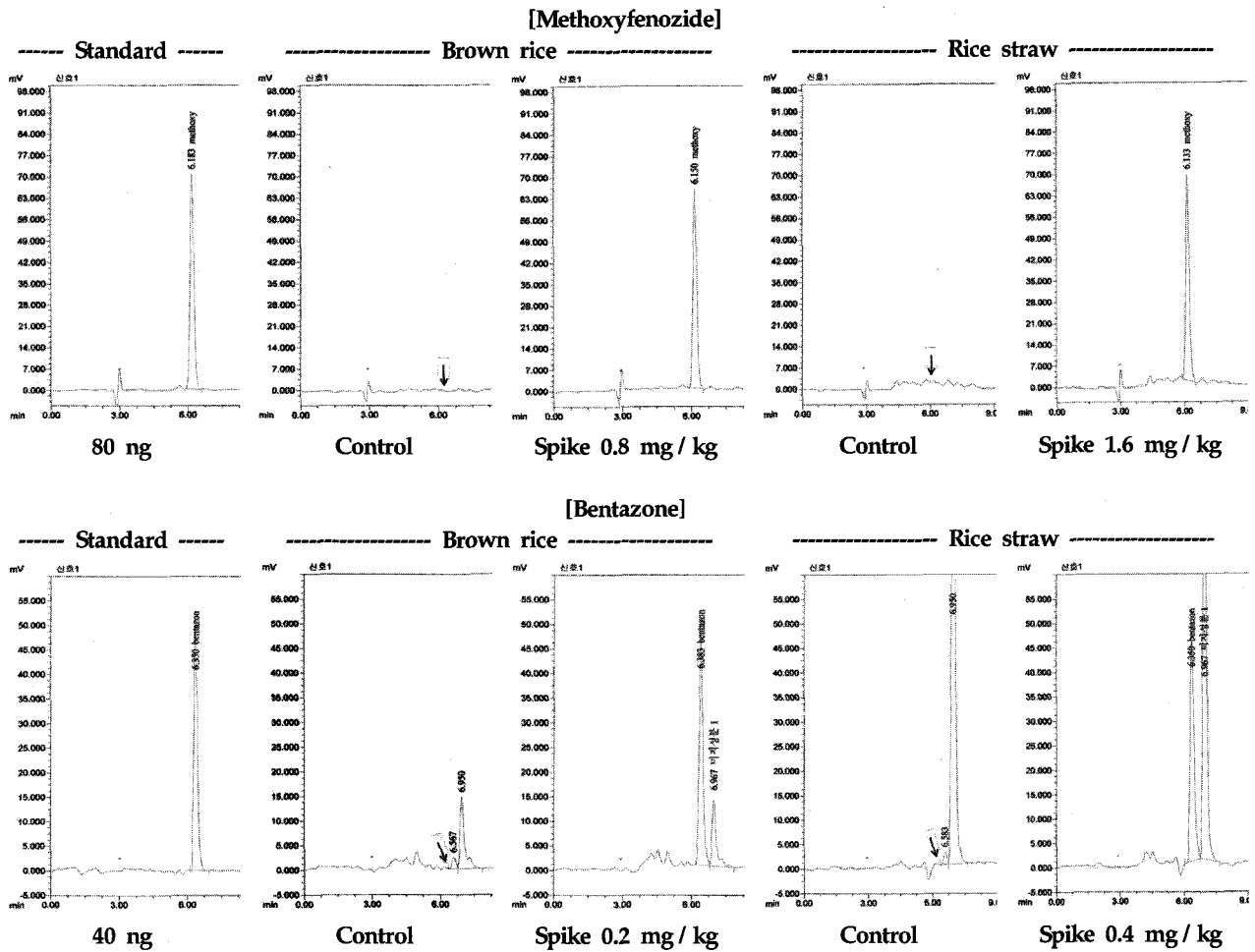


Fig. 5. HPLC chromatograms of standard, control and spiked samples in the analysis of methoxyfenozide and bentazone.

혼합비율 선정을 통한 최적 원충조건이, 벼짚과 같이 방해성분이 많은 시료의 경우 불순물을 효과적으로 제거함과 동시에 안정적 분석을 위한 중요한 요인으로 작용할 것으로 판단하며, 본 연구결과에서 얻은 위 방법은 안정적 분석조건을 제공하고 재현성이 뛰어나다는 점에서 두 약제의 잔류분석에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다. 더불어 다른 식물체에 대한 분석에의 적용과 기타 이온성 또는 pH의 영향을 받는 농약의 다성분 동시분석을 위한 분석조건 확립에 관한 연구도 병행되어야 할 것이다.

요 약

이 연구는 액액분배과정 중 pH 조절에 의한 diacylhydrazine계의 곤충생장조절(IGR)계 살충제 methoxyfenozide와 benzothiadiazinone계의 제초제 bentazone의 분배효율을 향상시키기 위하여 수행하였다. 현미시료는 두 약제 모두 “추출→응고법→분배추출→florisil column chromatography”의 동일한 과정을 거쳤다. 벼짚시료에 있어서 methoxyfenozide는 “추출→1 M-NaOH 용액에 의한 알칼리화→분배추출→응

고법→florisil column chromatography”의 과정을 거친 후 용리액인 acetonitrile : 20 mM sodium acetate(75:25, v/v)로 정용, HPLC로 분석하였다. Bentazone의 경우는 “추출→1 M-NaOH 용액 첨가에 의한 알칼리화→유기용매 세척→12 M-HCl에 의한 산성화→분배추출→florisil column chromatography”의 과정을 거쳤으며, acetonitrile : 75 mM sodium acetate(pH 6.0) (40:60, v/v)로 정용, HPLC로 분석하였다. Methoxyfenozide의 회수율은 현미 83.5-97.4%, 벼짚 86.4-97.3%였으며, 분석법의 검출한계는 현미 0.02 mg/kg, 벼짚 0.04 mg/kg이었다. Bentazone의 회수율은 현미 86.8-101.9%, 벼짚 88.3-94.5%였으며, 분석법의 검출한계는 현미 0.005 mg/kg, 벼짚 0.01 mg/kg이었다. 본 연구결과에서 얻은 위 방법은 재현성 있는 안정적 분석조건을 제공한다는 점에서 두 약제의 잔류분석에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Tomlin, C. D. S. (2000) The pesticide manual 12th edition, The British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom, p. 624.
2. Smagghe, G., Carton, B., Wesemael, W., Ishaaya, I. and Tirry, L. (1999) Ecdysone agonists -Mechanism of action and application on *spodoptera* species, *Pesti. Sci.* 55, 386-389.
3. Korea Crop Protection Council (2005) Pesticides application manual, Seoul, Korea, pp. 366-670.
4. Tomlin, C. D. S. (2000) The pesticide manual 12th edition, The British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom p. 80.
5. Kim, K. U. (1998) Principles of weed science, Kyungpook university press, Korea, p. 221.
6. Choi, B. K., Hercules, D. M. and Gusev, A. I. (2001) Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression, *J. Chromato. A.* 907, 337-342.
7. Hall, G. L., Engebretson, J., Hengel, M. J. and Shibamoto, T. (2004) Analysis of methoxyfenozide residues in fruits, vegetables, and mint by liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS), *J. Agric. Food Chem.* 52, 672-676.
8. Kim, S. S., Lee, S. M., Koo, M. Y., Park, D. S. and Hur, J. H. (2003) Residual analysis and safety uses of methoxyfenozide and etofenprox in pastures, *J. Agri. Sci.* 14, 59-66.
9. Wu, S., Stein, R., Desai, T. B., Hofmann, C. K. and Burnett, T. F. (1998) Rohm and Haas Technical Report No. 34-98-71; Residue analytical method for parent RH-2485 in soil, Philadelphia, USA, p. 1-17.
10. Research group for pesticide residue analysis method (1995) Recent pesticide analysis method, Chuohoki publishers, Tokyo, Japan, p. 68-70.
11. Vink, M. and van der Poll, J. M. (1996) Gas chromatographic determination of acid herbicides in surface water samples with electron-capture detection and mass spectrometric confirmation, *J. Chromato. A.* 733, 361-366.
12. Balinova, A. (1996) Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water, *J. Chromato. A.* 728, 319-324.
13. Fontanals, N., Galiá, M., Marcé, R. M. and Borrull, F. (2004) Solid-phase extraction of polar compounds with a hydrophilic copolymeric sorbent, *J. Chromato. A.* 1030, 63-68.
14. Lee, P. W., Aizawa, H., Barefoot, A. C. and Murphy, J. J. (2003) Handbook of residue analytical methods for agrochemicals, Wiley, Delaware, USA, p. 773.
15. Aguilar, C., Ferrer, I., Borrull, F., Marcé, R. M. and Barceló, D. (1999) Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta.* 386, 237-248.
16. Hogendoorn, E. A., Westhuis, K., Dijkman, E., Heusinkveld, H. A. G., den Boer, A. C., Evers, E. A.I.M. and Baumann, R. A. (1999) Semi-permeable surface analytical reversed-phase column for the improved trace analysis of acidic pesticides in water with coupled-column reversed-phase liquid chromatography with UV detection determination of bromoxynil and bentazone in surface water, *J. Chromato. A.* 858, 45-54.
17. Choi, J. C., Lee, Y. J., Kim, S. H., Choi, S. Y., Choi, H. J., Jeong, S. W., Park, H. J. and Kim W. S. (2005) Multiresidue analytical method of pesticides in rice by HPLC, *J. Environ. Sci.* 14 (4), 445-449.
18. Dollan, J. W. (2002) Mobile-phase buffers, Part II-buffers selection and capacity, *LCGC NORTH AMERICA.* 20 (12), 1114-1118.
19. Dollan, J. W. (2003) Mobile-phase buffers, Part III-preparation of buffers, *LCGC NORTH AMERICA.* 21 (1), 28-32.
20. Tekel, J., Hudecová, T. and Pecníková, K. (2001) Isolation and purification techniques for pesticide residue analyses in samples of plant or animal origin, *Eur. Food Res. Technol.* 213, 350-358.
21. Neue, U. D. (2002) HPLC troubleshooting guide. Waters. USA. p. 20.
22. Horwitz, W. (2000) Official methods of analysis of AOAC international 17th edition. AOAC international, Gaithersburg, USA, p. 43-44.
23. Choi, D. M., Jeong, J. Y., Chang, M. I., Im, M. H., Park, K. S. and Hong M. K. (2005) Determination of tetracycline antibiotics in food, *Anal. Sci & Tech.* 18(3) : 250-256.
24. Pest management regulatory agency (2004) Regulatory note; REG2004-08, Canada, pp. 1-8.
25. Rural development administration & Korea crop protection association (2003) Text book for pesticide registration experiment, Korea, pp. 173-176.