

Development of analytical method for Isotianil in agricultural commodities using GC-NPD and GC-MSD

Jung-Ah Do, Mi-Young Lee, Il-Hyun Kang, Kisung Kwon and Jae-Ho Oh*

Food Chemical Residues Division, Department of Food Safety Evaluation, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Food and Drug Administration

(Received September 14, 2012; Revised October 15, 2012; Accepted October 15, 2012)

GC-NPD와 GC-MSD를 이용한 농산물 중 Isotianil의 공정분석법 개발

도정아 · 이미영 · 강일현 · 권기성 · 오재호*

식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 화학물질과
(2012. 9. 14. 접수, 2012. 10. 15. 수정, 2012. 10. 15. 승인)

Abstract: Isotianil is a novel fungicide which induces systemic acquired resistance in plants. It has excellent preventive effects as low dosages against rice blast which is one of the most serious diseases in rice. The Maximum Residue Limit (MRL) of Isotianil in republic of korea was set to 0.1 mg/kg in rice, so it is necessary to determine levels of Isotianil residues in agricultural commodities for controlling food safety. Therefore, The purpose of this study was to develop analytical method for the determination of isotiical residues in agricultural commodities using GC-NPD/MSD. Isotianil was extracted with acetonitrile from apple, chinese cabbage, hulled rice, mandarin, pepper, and soybean. The extract was diluted with saline water, and then dichloromethane partition was followed to recover this fungicide from the aqueous phase. A solid phase extraction with Florisil cartridge was additionally employed for final clean up. Isotianil was analyzed and quantitated by GC-NPD and confirmed by GC-MSD. Average recovery of Isotianil ranged from 70.0 to 103.9% in six representative agricultural commodities with relative standard deviations less than 10%, and limit of quantification (LOQ) was 0.05 mg/kg.

요 약: Isotianil은 쌀 도열병을 방제하기 위한 새로이 개발된 식물활성 살균제로 다른 식물활성제에 비해 소량으로도 장시간의 효과를 나타내는 특징을 가지고 있다. 신규 농약 Isotianil에 대한 기준은 국내의 경우 2010년 쌀에 대하여 0.1 mg/kg으로 최초 설정되었으며, 이에 따른 식품 중 안전관리를 위해 Isotianil을 분석하기 위한 검사법을 개발하였다. 검체 일정량에 acetonitrile을 가하고 균질화하여 대상농약을 추출하였으며, 액-액분배하고 florisil 카트리지를 이용한 고체상 추출 후 GC-NPD 및 GC-MSD로 분석하였다. 분석결과 농산물에 의한 간섭물질은 없었으며, 대표 농산물 현미 등 6 종에 대한 Isotianil의 분석 시험법의 정량한계와 직선성은 각각 0.05 mg/kg과 0.999(r^2)이었다. 회수율은 대표 농산물에서 70.0~103.9%이었으며, 분석오차는 10% 미만으로 CODEX 잔류분석 기준에 적합하였다.

Key words: Isotianil, analytical method, pesticide, GC-NPD, GC-MSD

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-4207 Fax : +82-(0)43-719-4200

E-mail : chopin68@korea.kr

1. 서 론

도열병에 대한 최초의 기록은 우리나라의 경우 1429년 농사직설에서 연구되었으며, 도열병으로 추정되는 벼 병해에 대한 기록이 있고, 최근 기록으로는 1928년 한국권업모범장 연구보고 15호 “조선병해작물 목록”에 도열병 이병물 채집에 대한 기록이 있다.^{1,2} 특히 쌀의 생산량 감소를 발생시키는 도열병을 예방하기 위한 노력을 계속되어 왔고 이러한 연구에 의하여 도열병 병원균을 직접적으로 저해하는 살균제를 개발하여 사용하고 있다. 이러한 살균제의 사용은 그 자체의 독성과 내성균의 발현 등의 문제점을 가지고 있어서 많은 연구자들은 최근 직접적인 살균효과를 나타내지 않으나, 식물의 자체적인 저항성을 가지게 하여 병의 발현을 방지하는 식물활성제(plant activator)에 관심을 가지게 되었다.³⁻⁶ Isotianil은 벼 도열병을 방제하기 위한 새로운 식물활성제로 개발되었다. Isotianil은 다른 식물활성제에 비해 소량으로도 장시간의 효과를 나타내는 특징을 가지고 있는 살균제이며 Masaomi 등⁴은 Isotianil의 물리화학적 특성, 방제 특성, 생물학적 안전성, 동물 및 식물에서의 대사작용, 환경에 미치는 작용 등을 구체적으로 설명하였다. 신규 등록된 Isotianil의 작물잔류성적 및 안전성 평가를 통해 쌀에 대한 잔류허용 기준은 0.1 mg/kg으로 설정되었다.⁶

이와 같이 신규 도열병 방제약으로 개발되어진 Isotianil에 대하여 선행 연구 보고들은 도열병균에 대한 작용과 생물학적, 환경적 안전성 정도에 대한 결과가 대부분이며, 농산물 잔류분석을 위한 전처리 및 정량분석에 관한 논문은 전무한 실정이다. 그러므로 잔류허용기준이 설정된 쌀 중 Isotianil을 분석하기 위한 분석법 개발과 동시에 살균제로 다른 작목에 대한 사용 가능성을 고려하여 대표 농산물에 대한 분석법 확립이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 신규 등록 농약 Isotianil의 대표 농산물에서의 잔류량 분석을 위한 정확성과 재현성이 확보된 분석법을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

분석에 이용한 시료는 분석법 확립을 위한 대표 농산물(현미, 대두, 배추, 사과, 고추, 감귤)로 대형유통마트에서 구입하여 사용하였으며, 모든 재료는 구입 후 즉시 잔류농약분석용 식품 전처리 방법에 의하여

수세 및 손질 후 균질화하여 밀봉된 용기에 담아 -70 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 시약 및 장비

Isotianil 표준품(98%)은 Bayer cropscience에서 분양받아 사용하였고, n-hexane, diethylene glycol, dichloromethane, acetone, acetonitrile 등은 HPLC grade로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 무수 황산나트륨과 수산화나트륨은 Wako (Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 여과지는 silicone treated filter papaer (IPS) 제품을 Whatman International Ltd. (Maidstone, England)으로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 기타 일반시약은 특급시약을 사용하였다.

2.3. 표준용액조제

Isotianil 표준물질을 정밀히 달아 acetone에 녹여 농도가 1,000 µg/mL가 되도록 조제하였다. 그리고 분석시 acetone으로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 µg/mL가 되도록 표준용액을 만들어서 검량선을 작성하였다.

2.4. 분석기기

식품 중 Isotianil을 분석하기 위하여 GC-NPD (GC-2010, Shimadzu, Japan)를 이용하였고 칼럼으로는 DB-17 (15 m×0.32 mm I.d, 0.25 µm film thickness)를 사용하였다. 검출된 Isotianil을 확인하기 위하여 GC-MSD (Quattro micro TM GC/Waters USA)를 사용하였다.

2.5. 실험방법

2.5.1. 시료 중 대상물질 추출

균질화된 검체 20 g을 각각 정밀히 달아 균질기 병에 넣고 acetonitrile/distilled water 혼합액(8/2, v/v) 100 mL를 넣은 후 균질기로 10분간 진탕 추출하였다. 이를 여과지가 깔려있는 부호너깔대기로 감압여과하고 잔류물은 acetonitrile/distilled water 혼합액(8/2, v/v)으로 씻어 위의 여액과 합하였다. 이 여액을 소량 남을 때 까지 40 °C 이하에서 감압농축한 뒤 이 농축액을 250 mL 분액깔대기에 옮기고 잔류물을 증류수로 씻어서 합하였다. 이에 5% 염화나트륨 용액 50 mL 및 dichloromethane 50 mL를 가하여 심하게 흔들어 정치한 후 dichloromethane층을 sodium sulfate anhydrous 15 g에 통과시켜 탈수하여 감압농축플라스크에 취하였다. 물층에 다시 dichloromethane층 50 mL

를 가하여 심하게 흔들어 정치한 후 dichloromethane층을 sodium sulfate anhydrous 15 g에 통과시켜 탈수하여 상기 감압농축플라스크에 합하였다. 여기에 2% diethylene glycol 0.2 mL를 첨가한 후, 40 °C 이하 수욕상에서 감압농축한 후 잔류물에 acetone/hexane (20/80, v/v) 5 mL를 가하여 용해시킨 후 hexane으로 활성화된 florisil 카트리지에 넣고 유출시킨 다음 고정상의 상단이 노출되기 직전에 acetone/dichloromethane 혼합액(20/80, v/v) 5 mL를 넣고 용출시켜 받은 다음 40 °C 이하의 수욕상에서 완전히 농축하였다. 농축된 잔류물을 acetone에 용해하여 최종부피 2 mL가 되도록 하여 시험용액으로 하였다.

2.5.2. 기기 분석

GC-NPD와 GC-MSD의 기기 분석 조건은 각각 Table 1 및 2에 나타내었다.

2.5.3. 회수율 측정

분석방법에 따른 회수율을 측정하기 위하여 대표농산물(배추, 사과, 고추, 감귤)에 표준용액을 첨가하여

Table 1. GC-NPD conditions for the analysis of Isotianil in agricultural products

Instrument	GC-NPD(GC-2010, Shimadzu, Japan)	
Column	DB-17(15 m × 0.32 mm I.d, 0.25 μm film thickness)	
Temperature	Injector	290 °C
	Oven	220 °C
	Detector	310 °C
Injection port	Packed inlet	
Injection volume	5 μL	
Carrier gas flow	1.5 mL/min (N ₂)	

Table 2. GC-MSD conditions for the analysis of Isotianil in agricultural products

Instrument	GC-MSD (Quattro micro TM GC/ Waters USA)	
Column	DB-5MS (30 m×0.25 mm I.d, 0.25 μm film thickness)	
Temperature	Injector	260 °C
	Oven	120 °C(2 min)-20 °C/min-220 °C(5 min)
	Ion source	200 °C
Injection mode	Splitless	
Injection volume	1 μL	
Carrier gas flow	1 mL/min (He)	

분석하였다. 수분함량이 낮은 시료(현미, 대두)는 물을 첨가하여 수화하고 난 후 표준용액을 첨가하였다. 이와 같이 준비된 시료를 30 분간 방치하여 대상 Isotianil이 조직 내부로 충분히 침투할 수 있도록 하여 사용하였다. 각 시료 중 Isotianil의 최종농도는 0.05, 0.1 및 0.2 mg/kg이 되도록 하였으며, 회수율 측정은 각각의 농도 및 시료에 대하여 3 번 반복하여 평균과 상대표준편차를 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Isotianil의 기기 조건 및 추출 정제 조건 확립

Isotianil은 분자구조 내에 질소를 포함하고 있으며 증기압이 8.71×10^{-9} Pa로 휘발이 가능하며, Log P_{ow} 값이 2.96으로 중간극성-비극성인 화합물이다. 따라서 Isotianil의 잔류량을 분석하기 위해서는 GC-NPD를 사용하는 것이 용이한 것으로 판단되어 이를 이용한 기기분석법을 확립하였다. 확립된 분석 조건에서 얻은 표준물질의 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 이때의 머무름 시간은 9.3 분으로 시료 분석에서 다른 간섭물질에 영향을 받지 않고 분석이 가능하였으므로, 이를 분석조건으로 선정하였다.

농산물 시료로부터 Isotianil을 추출하기 위한 용매 선정을 위한 예비실험에서 Isotianil의 각 용매별 (acetonitrile, acetone, methanol, dichloromethane 등) 용해도에 따른 추출되는 회수율을 비교한 결과 비극성이 강한 용매(acetone, ethylacetate)로 추출 할 경우 간섭물질들이 많아 분석 시 어려움을 주었으며 회수율이 40% 미만이어서 분석에 적합하지 않았다. 특히 농산물 중 잔류농약 분석을 위해 추출 용매로 acetone은 US FDA법이나 AOAC법에서 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매로서 많은 연구자들에 의하여 농약추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다.¹¹ 그러나 Isotianil의 경우에는 acetone 추출이 효과를 보이지 않았기 때문에 acetonitrile과 물

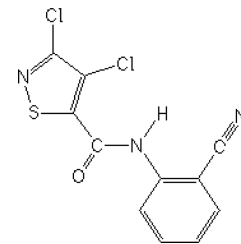


Fig. 1. Chemical structure of Isotianil.

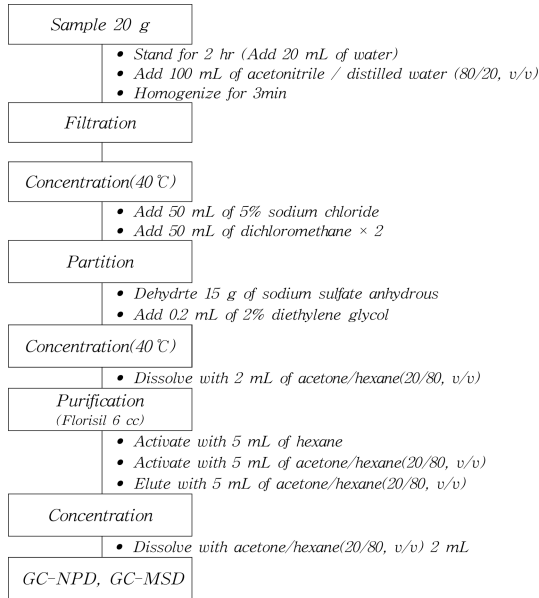


Fig. 2. Flow chart for Isotianil analysis.

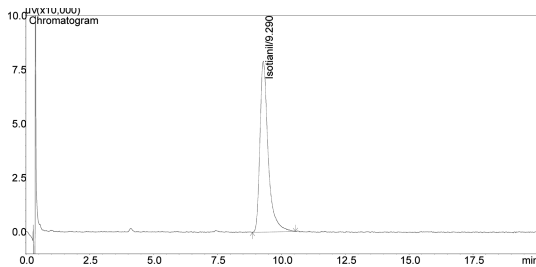


Fig. 3. Chromatogram of Isotianil standard.

을 적절하게 배합한 acetonitrile/distilled water (80/20, V/V)로 분석한 결과 방해물질도 제거 할 수 있었고 높은 회수율도 얻을 수 있었다. 또한 이 추출용매에 의한 추출 후에 dichloromethane으로 액-액분배를 한 후에 더 높은 회수율을 보임을 알 수 있었는데 이는 Isotianil의 dichloromethane에 용해도가 16.6 g/L으로 다른 용매들에 비하여 높은 용해도를 가지고 있어 더욱 회수율과 재현성을 높일 수 있음을 확인하였다.

액-액 분배를 거친 추출액은 상당한 간섭물질을 함유하고 있어 기기분석을 위하여 추가적인 정제과정이 필요하므로¹² 정제과정의 최적 조건을 위해 SPE 방법을 적용하였다. 예비실험에서 Isotianil의 비극성 성질을 감안하여 사용한 C₁₈ 카트리지는 회수율이 낮고 흡착이 용이하지 않아 Isotianil 분석에 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 극성도가 다른 카트리지를

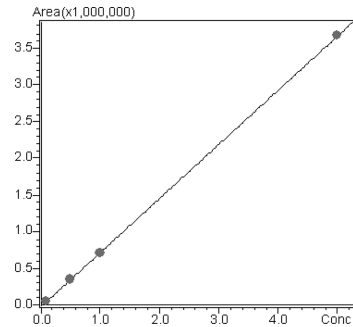


Fig. 4. Calibration curve of Isotianil standard solution using GC-NPD.

중에서 가장 회수율이 높은 florisil 카트리지를 이용한 정제 과정을 추가하여 다양한 농산물 중에 잔존하는 간섭물질을 제거하고자 하였다. 여러 종류의 흡착제가 농약 분석에 사용되고 있는데 이 중 florisil은 색소와 유지의 제거가 뛰어나서 다양한 농산물을 대상으로 분석하는 잔류농약시험법에서는 가장 보편적으로 사용되는 흡착제이다.⁷⁻⁸ 또한 정제 시 용출용매는 극성 조성별 비교 한 결과 회수율이 가장 좋게 나타난 acetonitrile/distilled water (80/20, V/V) 혼합액을 선정 하여 시료 전처리 조건으로 적용하였다.

3.2. Isotianil 시험법의 검증 및 정량 한계

Isotianil 표준품 농도를 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/kg의 수준으로 처리한 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었으며, 이때의 상관계수(R²)는 0.999로써 높은 직선성과 재현성이 높다는 것을 알 수 있었다

Isotianil의 선택성은 표준용액과 사과와 고추, 배추, 현미, 대두, 감귤, 무치리 시료에, 표준용액을 첨가한 각각의 시료의 크로마토그램을 서로 비교함으로써 평가하였다(Fig. 5).

Isotianil의 검출한계를 구하기 위한 최소검출량은 0.5 ng (S/N>3)이었으며 따라서 검출한계는 0.005 mg/kg이었다. 검체에서 Isotianil의 정량을 위한 최소검출량은 5 ng (S/N>10)으로 본 시험법의 정량한계는 0.05 mg/kg으로 나타났다.

3.3. Isotianil 분석법의 회수율 및 유효성

시험법의 정확성을 평가하기 위하여 0.05, 0.1 및 0.2 mg/kg 농도를 검체에 처리하여 회수율 시험을 수행한 결과를 Table 3에 나타내었다. 각 농도에서 평균 회수율은 70.0~103.9%로 비교적 높은 정확도와 정밀도를 갖는다는 것을 알 수 있었으며, 각 농산물에서

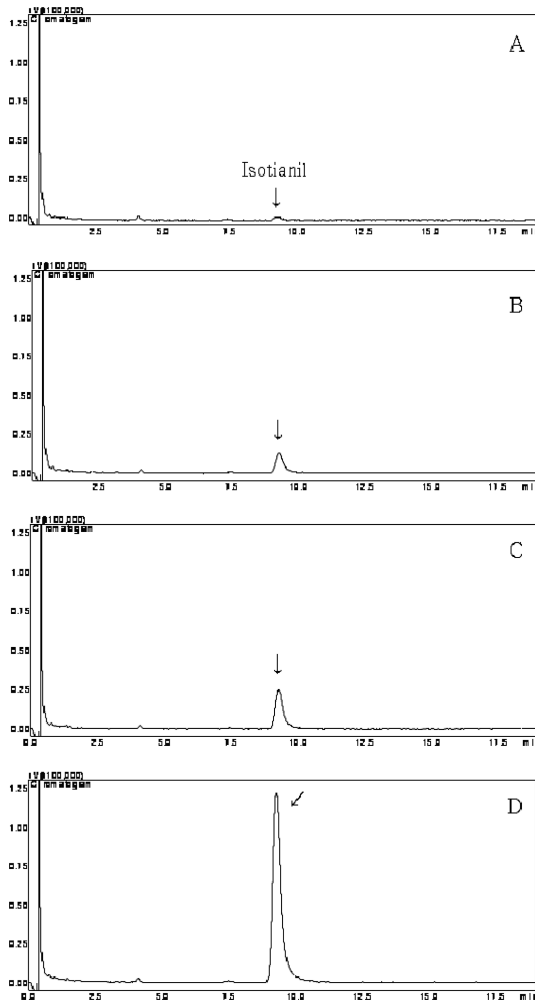


Fig. 5. GC-NPD chromatograms of Isotianil standard at 0.1 µg/mL (A), 0.5 µg/mL (B), 1.0 µg/mL (C), 5.0 µg/mL (D)

비교적 유사한 회수율을 나타내어 농도별로 비교하였을 때도 유의적인 차이는 보이지 않았다. 따라서 본 연구에 적용한 전처리 방법이 농산물 중에 잔류하는 Isotianil을 분석하는데 적합함을 알 수 있었다.

3.4. Isotianil의 재확인 및 분석법의 유효성 재검증

본 연구에서 확립된 분석법을 이용하여 분석된 잔류분의 신뢰성을 확보하기 위해 GC-MSD를 이용한 재확인 과정을 확립하였으며, 이때 사용한 분자량의 범위는 50~300 m/z이었다. Isotianil의 분자량은 298.15로 total ion chromatogram (TIC) mass spectrum으로 selected-ion monitoring (SIM) 분석한 결과 180, 117, 91 이온

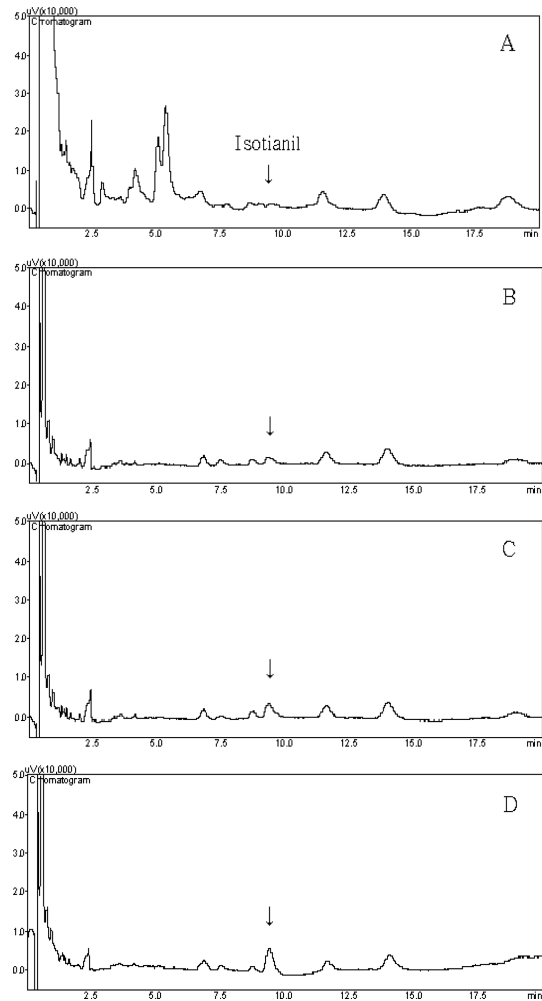


Fig. 6. GC-NPD chromatograms of Isotianil, control hulled rice (A), hulled rice at 0.05 mg/kg (B), 0.1 mg/kg (C) and 0.2 mg/kg (D).

을 특성이온으로 선정하였다. GC-MSD에서의 크로마토그램과 스펙트럼을 Fig. 7에 나타내었다.

4. 결론

GC-NPD와 GC-MSD를 이용하여 농산물 시료에서 벼 도열병 치료제로 개발된 살균제 Isotianil의 잔류분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 acetonitrile을 가하여 추출한 다음 잔류분을 dichloromethane을 이용한 분배법과 florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 분석 대상물질을 시료로 하였다. Isotianil의 높은 증기압과 구조적 특성을 이용하여 선정된 GC-NPD로 분

Table 3. Recovery results and limit of quantification (LOQ) of Isotianil from Isotianil spiked (0.05, 0.1, 0.2 mg/kg) samples using GC-NPD (n=3)

Sample	Fortification Conc. (mg/kg)	Recovery ± RSD (%)	LOQ (mg/kg)
Apple	0.05	86.2±4.0	0.05
	0.1	87.5±8.6	
	0.2	73.9±7.4	
Chinese cabbage	0.05	74.5±6.8	0.05
	0.1	81.4±6.5	
	0.2	83.4±4.1	
Hulled rice	0.05	103.9±2.6	0.05
	0.1	91.5±3.4	
	0.2	76.4±5.2	
Mandarin	0.05	94.4±4.9	0.05
	0.1	96.0±9.6	
	0.2	90.6±3.3	
Pepper	0.05	92.5±7.0	0.05
	0.1	88.5±4.8	
	0.2	82.1±4.2	
Soybean	0.05	85.7±2.4	0.05
	0.1	70.8±8.4	
	0.2	70.0±8.8	

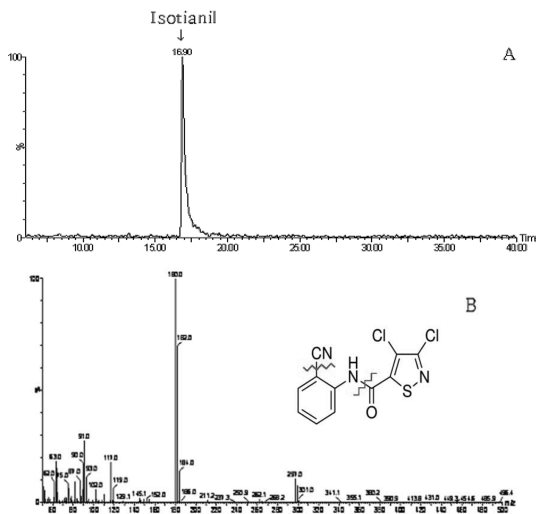


Fig. 7. Total ion chromatogram (A) and GC-MSD spectrum (B) of Isotianil.

석 결과 높은 감도와 재현성을 확인할 수 있었다. 대표 농산물 중 Isotianil의 정량한계는 0.05 mg/kg이었으며 전체 농산물에 대한 회수율은 70.0~103.9%로 높은 회수율을 보였다. 분석오차는 10% 미만을 나타내어 CODEX 잔류물질 분석 가이드라인에 만족하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 Isotianil의 잔류분석법은

검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석 기준을 만족할 뿐만 아니라 GC-MSD를 이용한 잔류분의 재확인한 결과를 살펴볼 때 신뢰성이 확보된 공정 분석법으로 사용가능 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 식품의약품안전청의 연구개발비 (10161식품안001)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. S. H. Ou, Rice disease. 2nd edition, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England., pp. 109-200 (1985).
2. 鄭鳳朝 외, 水稻의 病. 韓國植物保護 研究 論考. pp1-31. 韓國植物保護學會 (1976).
3. E. J. Lee, Pathogenic specialization of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav (1978).
4. O. Masaomi, Y. Tomoya, K. Atsushi and K. Orie, Applies development of a novel fungicide Isotianil. R&D report "SUMITOMO KAGAKU", 2011-1 (2011).
5. H. Sawadasponsored by Jap. Plant port. Assoc, "New development of pest control measures by pesticide" Abstract (2008).
6. H. W. Cheng, Y. G. Ha, M. H. Im, J. A. Do, J. H. Oh, Establishment of 22 pesticide MRLs in agricultural products based on risk assessment, *Kore J. Env. Ari.*, **30**(2), 166-172 (2011).
7. AOAC, Pesticide and industrial chemical residues, In official method of analysis, 17th.,pp1-88, AOAV International, Arlington, VA, USA (2000).
8. US FDA, Pesticide Analytical Manual, Vol1: Multi residue Method (3rd ed), US Food and Drug Administration, USA (1999).
9. Bayer to introduce two rice-pesticides in Japan : <http://news.agropages.com>
10. New rice fungicide Isotianil granted regulatory approval in Japan:[http://www.bayercropscience.com/bcsweb/crop-protection.nsf/id/EN_20100715/\\$file/2010-0366E.pdf](http://www.bayercropscience.com/bcsweb/crop-protection.nsf/id/EN_20100715/$file/2010-0366E.pdf)
11. C. H. Kown, M. I. Chang, M. H. Im, H. Choi, D. I. Jung and S. C. Lee, *Anal. Sci. Tech.*, **1**(6), 518-525 (2008).
12. 이영득, 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서, 식품의약품안전평가원 (2012).