

Research Article

Open Access

GC/ECD와 GC/MS를 이용한 농산물 중 Picoxystrobin의 분석법 개발

권혜영,^{1*} 김찬섭,¹ 박병준,² 김일환,¹ 홍수명,¹ 손경애,¹ 진용덕,¹ 이제봉,¹ 임건재,¹ 김두호¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부, ²농촌진흥청 국제기술협력과

Development of Analytical Method for Picoxystrobin in Agricultural Commodities Using GC/ECD and GC/MS

Hye-young Kwon,^{1*} Chan-Sup Kim,¹ Byung-Jun Park,² Il-Hwan Kim,¹ Su-Myeong Hong,¹ Kyung-Ae Son,¹ Yong-Duk Jin,¹ Je Bong Lee,¹ Geon-Jae Im¹ and Doo Ho Kim¹ (¹Department of Agro-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea, ²International Technology Cooperation Center, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea)

Received: 5 April 2012 / Accepted: 3 May 2012

© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract

BACKGROUND: This study was conducted to develop analytical method for picoxystrobin in agricultural commodities using GC/ECD and GC/MS.

METHODS AND RESULTS: Each steps of analytical method were optimized for determining picoxystrobin residues in various agricultural commodities. The developed methods include acetone extraction, *n*-hexane/saline water partition and florisil column chromatography for analysis of all samples (apple, potato, green pepper, hulled rice and soybean), and in addition to these steps, solid phase extraction (SPE) was used for analysis of green pepper and *n*-hexane/acetonitrile partition was used for analysis of hulled rice and soybean. The instrumental conditions were tested for quantitation in GC/ECD and for confirmation in GC/MS. Recovery was in the range of 86~109% with RSD ≤ 10.2% and the quantitation limits (LOQ) of method were 0.025 mg/kg in all agricultural commodities.

CONCLUSION: The result showed that the developed method can be used to determine picoxystrobin residue in agricultural commodities.

Key Words: GC/ECD, GC/MSD, Picoxystrobin, Residue

서 론

농약은 작물을 재배하는 과정에서 병해충 방제를 위해 필수적으로 필요하나 인체와 환경생물에 독성학적 위해요인으로 작용할 가능성을 갖고 있다. 농약은 꾸준히 개발되고 있으며 개발된 농약은 각 나라의 등록 시스템에 맞춰 국가별로 관리되고 있다. 우리나라의 경우 농촌진흥청이 농약관리법에 따라 농약의 등록·취소 등의 관리를 맡고 있어 매년 농약의 등록을 위해 제출되는 농약들에 대한 평가를 하고 있다(제정, 농촌진흥청 고시 제1997-2호, 일부개정, 제2012-13호). 농약이 등록되기 위해서는 인체 및 환경에 대한 독성학적인 안전성이 확보되어야 하고, 다양한 농산물에 대한 안전성을 검증할 수 있는 잔류 분석법이 필수적으로 요구된다.

Picoxystrobin, methyl(E)-3-methoxy-2-[2-(6-trifluoromethyl-2-pyridyloxymethyl) phenyl]acrylate는 천연 strobilurin-A와 유사하게 행동하는 strobilurin으로 불리는 합성 살균제로서 cytochrome b의 Qo site와 결합하여 mitochondrial respiration을 억제함으로써 효과를 나타낸다(Bartlett *et al.*, 2002). Picoxystrobin은 엽면 왁스층에 침투하여 확산하고 대기 중에서 분자구조가 재배치되는 독특한 분포 특성을 가지는 보호 및 치료 살균제로서(TomLin, 2011) 구조식과 이 화학적 특성은 Fig. 1에 나타내었다.

*교신저자(Corresponding author),

Phone: +82-31-290-0516; Fax: +82-31-290-0506;

E-mail: kwonhy91@korea.kr

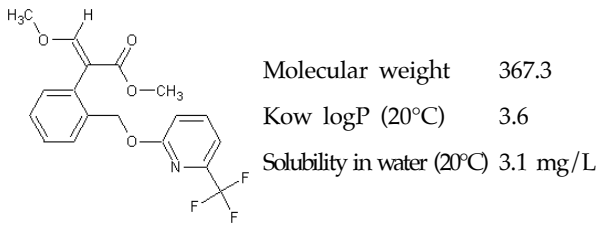


Fig. 1. Chemical structure and properties of picoxystrobin.

Picoxystrobin은 2000년에 Zeneca agrochemicals (현 Syngenta-AG)에 의해 소개되었으며(Balba, 2007) 2011년에 우리나라에 처음 등록이 허가되어(농촌진흥청 고시 제 2012-15호) 감, 고추, 사과, 오이에서 탄저병, 노균병, 역병, 갈색무늬병 등의 방제용으로 등록되었으며(한국작물보호협회 농약사용지침서, 2011) 2012년 3월 현재 고추와 사과에 각각 0.5, 0.3 mg/kg으로 잔류허용기준(MRLs, Maximum Residue Limits)이 설정되어 있다(식품의약품안전청 고시 제2011-23호).

Picoxystrobin에 대한 분석법은 Solid-phase microextraction (SPME)-gas chromatography-mass spectrometry를 이용하여 유아식을 분석하는 방법(Vinas *et al.*, 2009), Micellar electrokinetic capillary chromatography를 이용하여 소변을 분석하는 방법(Souza *et al.*, 2009)등이 보고되어 있으며, 농축산물에 대해서는 Bo 등(2008)이 다양한 농축산물을 대상으로 초음파 추출과 gel permeation chromatography 정제 후 GC/MS로 분석하는 방법을 제시한 바 있으나 농산물에 대한 GC나 HPLC 등을 이용한 관행적인 분석방법은 보고되어있지 않다.

따라서 본 연구에서는 다양한 농산물 시료로부터 picoxystrobin을 분석하기 위한 보편적인 분석법을 개발하기 위하여 사과, 고추, 감자, 현미, 대두를 대상으로 효율적인 전처리 방법과 기기분석법을 확립하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

Picoxystrobin 표준품(99.9%)은 경농(주)으로부터 분양받아 사용하였으며, *n*-hexane을 이용하여 1000 mg/L의 표준용액을 만들고 적당한 농도로 희석하여 시험에 이용하였다. 정제과정에 사용된 용매는 잔류농약 분석용을 사용하였다. Florisil (60~100mesh)은 Merck제품을 사용하였으며 활성화를 위해 130°C에서 6시간 이상 가열한 후 데시케이터에서 식혀 시험에 이용하였다. SPE-NH₂ (2 g)은 Chromabond 사로부터 구입하여 사용하였다. 시료 전처리를 위한 분쇄기는 BLIXER 5 Plus (Robot coupe, USA)를 이용하였으며 균질기는 Ultra-turrax T-25 (IKA, USA)를 이용하였다.

농산물 시료

본 시험의 분석대상 농산물은 다양한 농산물의 대표시료로서 분석법이 설정될 수 있도록 사과, 고추, 감자, 현미, 대

두 등 5작물을 선정하였으며 시료는 대형마트에서 구입한 후 분쇄하여 -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

추출

농산물 중 picoxystrobin의 분석을 위해 시료 20 g을 정밀히 달아 500 mL 비이커에 넣고 수분함량이 적은 시료인 현미와 대두는 물 20 mL를 더 넣고 30분간 방치한 후 추출 과정을 실시하였다. 여기에 acetone 100 mL를 넣은 후 균질기로 2~3분간 균질화하였으며, 이를 여과지가 깔려있는 부호너갈때기로 감압여과했다. 잔류물을 acetone 40 mL로 씻어 내려 위의 여액과 합친 후 1 L 분액갈때기로 옮기고 *n*-hexane 100 mL, 포화염화나트륨 용액 50 mL와 물 450 mL를 가한 후 10분간 격렬하게 진탕하고 층이 완전히 분리될 때까지 정지한 후 수용액 층을 버리고 *n*-hexane 층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수시켰다. 이액을 40°C 이하에서 감압농축하여 건조시킨 후 잔류물을 *n*-hexane 10 mL에 용해하였다. 현미와 대두 시료의 경우 상기 건조물을 acetonitrile로 포화된 *n*-hexane 50mL로 녹여 500 mL 분액갈때기로 옮기고 *n*-hexane으로 포화된 acetonitrile 50 mL로 2회 분배추출 후 acetonitrile 층을 40°C 이하에서 감압농축하여 건조시키고 *n*-hexane 10 mL에 용해했다.

Florisil column 정제

농산물 중 picoxystrobin의 정제를 위해 안지름 11 mm, 길이 40 cm의 유리 칼럼에 Florisil 10 g과 그 위에 2 cm 높이로 무수황산나트륨을 차례로 건식충전하고 *n*-hexane 100 mL를 가하여 칼럼 표면이 노출되기 직전까지 내려주었다. 이후 위의 *n*-hexane 용해액을 칼럼에 가하여 칼럼 표면이 노출되기 직전까지 내려준 후 *n*-hexane/ethylacetate (95:5, v/v)용액 150 mL를 칼럼에 가하여 씻어서 버렸다. 칼럼 표면이 노출되기 직전 *n*-hexane/ethylacetate (80:20, v/v)용액 100 mL를 가하여 용리하여 받아 40°C 이하에서 감압농축하여 *n*-hexane 2 mL로 재용해하여 기기분석에 이용했다.

Solid-phase extraction (SPE) cartridge 정제

고추의 경우 Florisil column 정제 후에도 불순물이 방해성분으로 작용하여 추가 정제과정이 필요했다. 위의 Florisil column에서 용리하여 농축한 건조물을 *n*-hexane 5 mL로 재용해시키고 미리 *n*-hexane 10 mL로 활성화한 SPE-NH₂ cartridge (2 g, 12 mL)에 가하여 흘려서 버렸다. 여기에 다시 *n*-hexane/ethylacetate (90:10, v/v) 혼합액 12 mL를 가하여 씻어주고 *n*-hexane/ethylacetate (80:20, v/v) 혼합액 12 mL를 가해서 받은 용리액을 40°C 이하에서 농축하여 *n*-hexane 2 mL로 재용해하여 기기분석에 이용했다.

기기분석

GC는 Agilent 7890 series (USA)를 사용하였으며 검출기는 ECD를 사용하였다. 분석칼럼은 DB-5 (30 m × 0.53

mm ID, 0.5 μ m, Agilent)를 사용하였고 캐리어가스는 질소를 분당 7 mL의 유속으로 사용하였다. 주입부는 splitless mode를 사용하였으며 주입부와 검출기의 온도는 각각 250°C, 310°C로 하였으며 오븐온도는 50°C에서 검체를 주입하고 1분간 유지하고 분당 20°C의 비율로 190°C까지 상승시킨 후 분당 10°C의 비율로 250°C까지 온도를 상승시키고 이후 분당 30°C의 비율로 290°C까지 온도를 상승시켜 5분 이상 유지하였다. 잔류분의 재확인을 위해 사용된 GC/MS는 Agilent 5973 inert series (USA)이었으며 분석칼럼 DB-5MS (30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m, Agilent)를 사용하였고 캐리어가스는 헬륨을 분당 1 mL로 사용하였다. 주입부는 splitless mode를 사용하였고 주입부와 인터페이스의 온도는 각각 250°C와 280°C였다. 오븐온도는 50°C에서 시료를 주입하고 1분간 유지한 후 분당 20°C의 비율로 250°C로 상승시키고 5분간 유지하고, 분당 40°C의 비율로 280°C로 상승시킨 후 13분 이상 유지했다.

분석법 검증

본 연구에서 확립된 전처리법과 기기분석법을 검증하기 위해서 농약이 처리되지 않은 분쇄시료에 3수준(0.025, 0.25, 1.25 mg/kg)으로 농약을 첨가하고 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 구하였고 이를 근거로 분석법의 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 구하였다.

결과 및 고찰

시료 추출 및 분배과정 확립

농산물 중 picoxystrobin의 추출을 위해 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용하는 극성용매이면서 Kwon 등 (2011)이 strobilurin계열의 추출을 위해 사용한 acetone을 추출용매로 선정했다. Acetone 추출액으로부터 식물체에서 유래한 방해물질들을 제거하기 위해 우선적으로 액-액 분배법을 이용하였다. 효율적인 분석법을 위해 acetone 추출액을 농축하지 않고 포화염화나트륨 용액 50 mL와 물 450 mL를 가한 후 액-액 분배 용매 선정을 위해 *n*-hexane, *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v), dichloromethane에 대하여 분배효율을 시험한 결과를 Table 1에 나타냈다. 분배용매의 효율은 모든 용매조건에서 1회 분배의 회수율이 95% 이상으로 매우 우수하였다. 따라서 식물체 유래 극성의 방해성분들과의 친화도가 낮아 그들이 적게 추출되고 층분리가 잘 되는 *n*-hexane을 분배용매로 선정하였다. 현미의 경우 약 2%, 대두의 경우 약 18%의 지질을 함유하고 있고(농촌진흥청 농촌자원개발연구소 식품성분표 제 7개정판, 2006) 이는 액-액분배 과정 이후에도 남아 있으므로 acetonitrile과 *n*-hexane 분배를 추가하였다. Acetonitrile과 *n*-hexane 분배의 회수율은 99%로 양호하여 지방성분을 효율적으로 제거할 수 있었다(Table 2).

Table 1. Efficiency of water/solvent partition^a

Solvent	Recovery (%)		
	Partition-1	Partition-2	Total
<i>n</i> -hexane 100mL	97	2	99
<i>n</i> -hexane 50 mL	94	5	99
Dichloromethane 50 mL	95	1	96
<i>n</i> -hexane/Dichloromethane (80/20, v/v) 100 mL	97	0	97

^a Partition mixture : 150 mL acetone, 50 mL of saturated NaCl solution and 450 mL of distilled water

Table 2. Efficiency of acetonitrile/*n*-hexane partition^a for hulled rice and soybean

Solvent	Recovery (%)		
	Partition-1	Partition-2	Total (%)
Acetonitrile	91	8	99

^a Partition mixture : 50 mL of *n*-hexane saturated with acetonitrile and 50 mL of acetonitrile saturated with *n*-hexane

Florisil column 정제 최적화

농산물로부터 미량의 picoxystrobin을 검출하기 위해서는 액-액분배 과정을 거친 후에도 추가 정제과정이 필요하였다. 색소와 유지제거에 효과가 뛰어난 Florisil 10g을 흡착제로 선정하여 실험한 결과를 Table 3에 나타내었다. Ethylacetate/*n*-hexane (5/95, v/v)용액을 흘려주었을 때 150 mL 용리액까지 농약성분이 검출되지 않았으며 ethylacetate/*n*-hexane (20/80, v/v)용액을 100 mL까지 흘려주었을 때 99%의 회수율을 보여 용출용매로 선정하였다.

Table 3. Recovery of picoxystrobin from Florisil column by ethylacetate/*n*-hexane mixture

Solvent	Elution (%)			
	0~50 mL	50~100 mL	100~150mL	Total
Ethylacetate/ <i>n</i> -hexane (5/95, v/v)	0	0	0	0
Ethylacetate/ <i>n</i> -hexane (10/90, v/v)	4	51	33	88
Ethylacetate/ <i>n</i> -hexane (20/80, v/v)	80	19	0	99

Solid-phase extraction (SPE) cartridge 정제

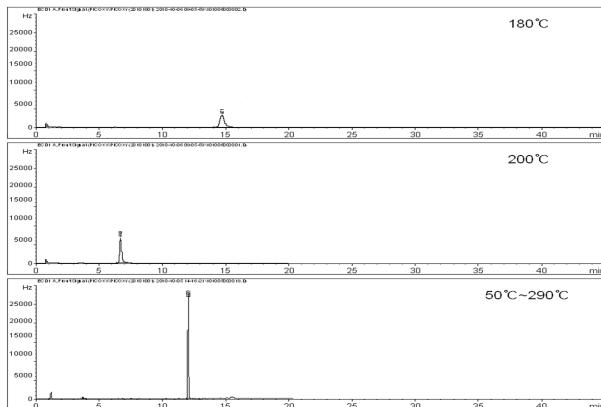
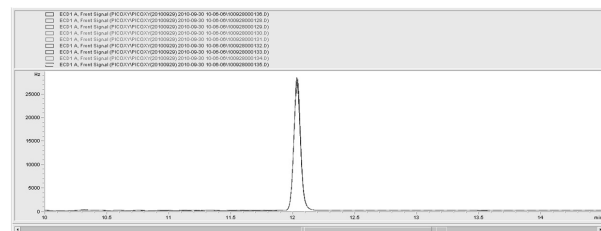
Florisil column 정제 후에도 방해성분이 남아있었던 고추의 경우 SPE-NH₂ cartridge (2 g, 12mL)를 이용하여 추가로 정제했다. SPE-NH₂ cartridge의 정제 조건을 확립하기 위해 ethyl acetate와 *n*-hexane을 이용하여 실험한 결과 ethyl acetate/*n*-hexane (1/9, v/v) 12 mL를 이용하여 세척하고 ethyl acetate/*n*-hexane (2/8, v/v) 12 mL로 용리하는 조건으로 분석할 때 99%의 양호한 회수율을 보였다(Table 4).

Table 4. Recovery of picoxystrobin from SPE-NH₂ by ethylacetate/*n*-hexane mixture

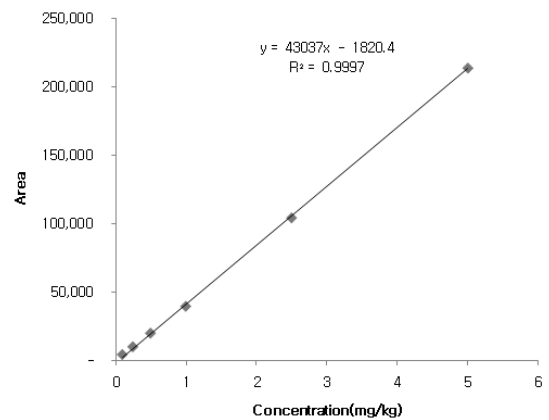
Volume (mL)	Ethyl acetate/ <i>n</i> -hexane (1/9, v/v)			Ethyl acetate/ <i>n</i> -hexane (2/8, v/v)		Total	
	0~8	8~12	12~16	16~20	0~10		10~20
Recovery (%)	0	0	1	16	77	5	99

기기분석조건 확립

Picoxystrobin의 분석을 위해 GC/ECD가 사용되었는데 최적의 기기조건을 잡기 위하여 오븐 온도 조건별로 표준용액을 주입한 결과(Fig. 2) 두 가지 등온조건(180°C, 200°C)보다 승온조건(50~290°C)에서 피크의 높이가 월등히 높고 머무름 시간이 12.02분으로 적절하여 승온조건을 분석조건으로 설정하였다. 확립된 오븐온도 조건에서 기기분석의 재현성을 검토하기 위해 2.5 mg/L의 표준용액을 9번 주입하여 재현성을 조사한 결과(Fig. 3, Table 5) 피크면적의 상대표준편차(RSD)는 2.1%로 매우 양호하였다. 표준용액(0.1~5 mg/L)의 직선성을 조사한 결과 검량선의 상관계수(R²)는 0.9997로 양호하였다.(Fig. 4)

**Fig. 2. Chromatogram of picoxystrobin at 3 temperature conditions.****Fig. 3. Overlaid of picoxystrobin at 9 replicated injections.****Table 5. Peak areas of picoxystrobin at 9 replicated injections**

Injection	Peak area
1	110,546
2	108,501
3	106,502
4	107,447
5	107,013
6	107,297
7	104,450
8	102,597
9	104,534
RSD (%)	2.1

**Fig. 4. Calibration curve of picoxystrobin.****회수율 및 정량한계**

본 연구에서 확립된 전처리법을 이용하여 농약이 처리되지 않은 사과, 감자, 고추, 현미, 대두에 대하여 3수준으로 농약을 첨가하고 확립된 분석법을 이용하여 회수율 시험을 실시하였다. 첨가농도 1.25 mg/kg 시료의 경우 검량선의 범위에 맞도록 10배로 희석하여 기기분석하였다. 첨가농도 0.025 mg/kg 수준에서의 회수율 시험에 따른 농산물별 크로마토그램을 나타냈는데(Fig. 5) 모든 시료에서 분석의 방해피크는 관찰되지 않았다. 회수율 시험의 결과는 Table 6에 나타내었다. 회수율은 86~109%였으며 RSD는 10.2% 이하로 국내기준(식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서, 2011) 및 국제식품규격위원회(Codex)의 잔류분석법 기준(Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003)을 만족하였으며 분석법상의 정량한계(LOQ)는 EU 가이드라인(SANCO/10684/2009 Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed)에 따라 잔류분석법 기준이 만족(회수율: 70~120%, RSD: ≤ 20%)되는 가장 낮은 첨가농도인 0.025 mg/kg으로 선정하였는데 이는 국제식품규격위원회(Codex) 및 국내에서 권장하는 기준인 잔류허용기준의 1/2 또는 0.05 mg/kg 이하의 정량한계에도 부합하였다.

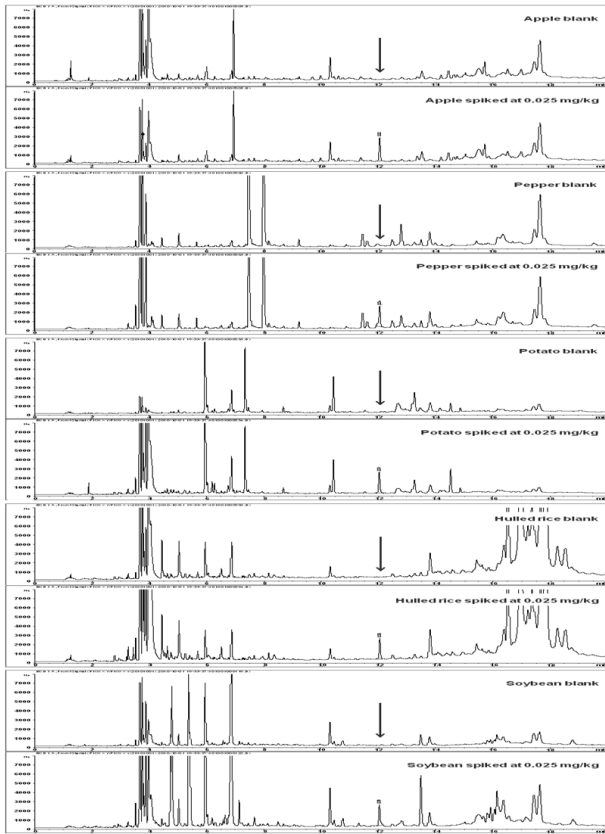


Fig. 5. Chromatograms of sample extracts obtained by sample preparation and GC/ECD analysis.

Table 6. Recovery, RSD and LOQ obtained by sample preparation and GC/ECD analysis

	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)±SD	RSD (%)	LOQ (mg/kg)
Apple	0.025	103.5 ± 3.8		
	0.25	105.4 ± 5.1	4.0	0.025
	1.25 ^a	102.3 ± 5.4		
Potato	0.025	102.1 ± 8.3		
	0.25	94.8 ± 10.4	10.2	0.025
	1.25 ^a	86.2 ± 7.2		
Pepper	0.025	103.6 ± 4.3		
	0.25	98.1 ± 4.9	6.9	0.025
	1.25 ^a	89.4 ± 2.0		
Hulled rice	0.025	103.1 ± 2.2		
	0.25	104.1 ± 0.4	5.7	0.025
	1.25 ^a	92.0 ± 2.1		
Soybean	0.025	100.5 ± 2.4		
	0.25	108.9 ± 4.2	5.9	0.025
	1.25 ^a	98.0 ± 6.6		

^a Final extracts were diluted by 10 times before GC/ECD analysis.

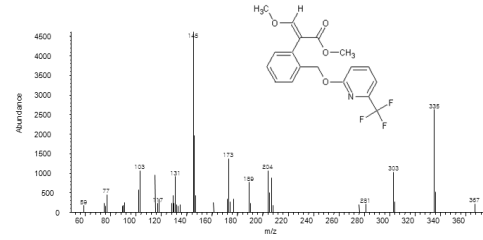


Fig. 6. Total ion chromatogram of picoxystrobin standard solution analyzed by GC/MS.

잔류분의 재확인

본 연구에서는 GC/ECD로 검출된 농약의 잔류분을 재확인하기 위하여 GC/MS EI모드로 분석한 total-ion chromatogram(TIC)을 Figure 6에 나타내었다. Vinas 등(2009)의 경우 GC/MS를 이용한 picoxystrobin의 분석을 위해 감도가 좋은 145, 335, 303 이온을 이용하였으나 본 연구에서는 145이온의 경우 방해피크가 나타났기 때문에 M⁺ 이온인 367보다 감도가 좋으면서 분석의 방해성분 피크가 나타나지 않는 이온들인 335, 303, 204 이온을 선정하였다. 가장 낮은 첨가농도인 0.025 mg/kg 수준에서의 시료를 GC-MS selected ion monitoring(SIM) 모드로 분석한 결과(Fig. 7) 모든 시료에서 분석의 방해피크는 관찰되지 않아 잔류분의 재확인 분석 방법으로 사용이 가능하리라 판단되었다.

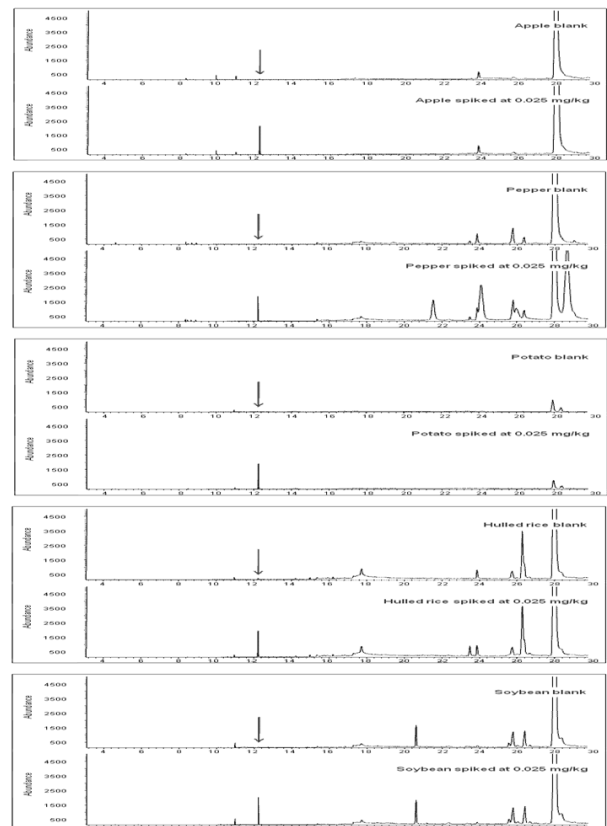


Fig. 7. Chromatograms of sample extracts obtained by sample preparation and GC/MS SIM (335, 303, 204) mode analysis.

감사의 글

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ008498)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

참고 문헌

- Balba, H., 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals, *J Environ. Sci. Heal. B* 42, 441-451.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides, *Pest Manag. Sci.* 58(7), 649-662.
- Bo, H.B., Wang, J.H., Guo, C.H., Qin, R., Lu, X.Y., 2008. Determination of Strobilurin Fungicide Residues in Food by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Chinese J. Anal. Chem.* 36(11), 1461-1466.
- Kwon, C.H., Lee, Y.D., Im, M.H., 2011. Simultaneous Determination of Orysastrobin and Its Isomers in Rice Using HPLC-UV and LC-MS/MS, *J Agr. Food. Chem.* 59(20),10826-10830.
- Souza, C.F., Cunha, A.L.M.C, Aucelio, R.Q., 2009. Determination of Picoxystrobin and Pyraclostrobin by MEKC with On-Line Analyte Concentration, *Chromatographia* 70, 1461-1466.
- Tomlin, C.D.S., 2011. The pesticide manual, 15th ed, British Crop Protection Council, UK.
- Vinas, P., Campillo, N, Martinez-Castillo, N, Hernandez-Cordoba, M., 2009. Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr. A* 1216(1), 140-146.