농약과학회지 제17권 제2호 (2013)
Vol. 17, No. 2, pp. 84-93 (2013)
Open Access http://dx.doi.org/10.7585/kjps.2013.17.2.84
ORIGINAL ARTICLES / RESIDUE

Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183

농산물 중 살균제 Isopyrazam의 개별 잔류분석법 확립

김지윤 · 김자영 · 함헌주[1] · 도정아[2] · 오재호[2] · 이영득[3] · 허장현*
강원대학교 농업생명과학대학 바이오자원환경학과,
[1]친환경농산물안전성센터, [2]식품의약품안전청, [3]대구대학교 생명환경학부

Method Development and Validation for Analysis of Isopyrazam Residues in Agricultural Products

Kim Ji-Yoon, Ja-Young Kim, Hun-Ju Ham[1], Jung-Ah Do[2], Jae-HO Oh[2], Young-Deuk Lee[3], and Jang-Hyun Hur*

Department of Biological Environment, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[1]Environment Friendly Agricultural Products Safety Center, Chuncheon 200-701, Korea
[2]Food Standards Division, Korea Food and Drug Administration, Cheongwon 363-951, Korea
[3]Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

(Received on April 8, 2013. Revised on May 18, 2013. Accepted on May 30, 2013)

Abstract Validated analytical methods for isopyrazam are meager or lacking. In the present study, a single residual analytical method was developed for isopyrazam in selected commodities. Isopyrazam was analyzed in brown rice, soybean, green pepper, mandarin, cucumber, and Korean melon. We tried different solvents and methods through extraction, partition and purification steps to obtain best analytical results. For isopyrazam samples were extracted with acetonitrile, concentrated and partitioned with *n*-hexane, clean-up using florisil with *n*-hexane/ethylacetate (70/30) and analyzed with HPLC/UVD. The limit of quantitation (LOQ) for isopyrazam was 1.0 ng (S/N > 10) and method LOQ (MLOQ) was 0.04 mg kg^{-1}. Recovery ranged through 81.0~105.3% (*syn*-isomer) and 80.8~105.6% (*anti*-isomer) at fortification level of 0.04 (MLOQ), 0.4 (10 × MLOQ), and 2.0 (50 × MLOQ). The coefficient of variation (CV) for isopyrazam was less than 10% regardless of sample types. These results were further confirmed with LC/MS, respectively. The proposed method is highly reproducible and sensitive and is suitable for routine analysis.

Key words Agricultural products, Isopyrazam, Limit of quantitation, Pesticide, Single residual analytical method

서 론

농약은 농산물 재배과정 중 발생하는 병해충과 잡초를 효율적으로 방제하여, 생산성 증대 및 품질 향상에 기여하는 중요한 농업 자재이지만, 사용되는 농약에 따라 살포직후 또는 일정기간이 경과 하여도 농산물 중 일부 잔류하게 된다(장 등, 2012; 정 등, 2004). 이에 잔류농약에 대한 관리 및 규제가 지속적으로 강화됨은 물론 식품 및 농산물 중 잔류농약수준을 검사 · 평가하여 안전성 확보를 위한 체계적인 잔류농약 분석법 확립이 필수적이다.

우리나라에 잔류허용기준이 설정된 농약은 432종(2012년 12월)으로 다성분 동시분석법 및 140여종의 개별 분석법을 고시하여, 두 분석법 체계를 목적에 따라 상호 보완적으로 적용하고 있다. 그러나 농약의 수와 종류는 점점 늘어나는 실정으로 분석방법 또한 지속적으로 추가 및 개정될 필요가 있다.

본 연구의 분석 대상 농약 isopyrazam은 신젠타에서 개발한 pyrazolecarboxamide계 살균제로 *anti*와 *syn* 이성질체가 존재한다(Tomlin, 2009). Isopyrazam은 국내 신규농약으로

*Corresponding author
Tel: +82-33-257-6441, Fax: +82-33-241-6640
E-mail: jhhur@kangwon.ac.kr

오이와 참외의 흰가루병에 대하여 등록되어 있으며, 잔류허용기준은 2012년 9월에 오이 2.0 mg kg^{-1}, 참외 0.5 mg kg^{-1}으로 설정되어 있다(한국작물보호협회, 2012). 현재 국내에는 고시된 공정분석법이 없어 개발회사에서 제공하는 HPLC를 이용한 개별 분석법을 일부 활용하고 있으나 분석과정이 복잡하여 범용으로 활용하기에는 어려움이 많다. 따라서 본 연구에서는 isopyrazam의 국내 농산물에 최적화 된 새로운 개별 분석법 개발을 목표로 추출 및 정제효과가 높고 수행이 간편한 과정들을 조합하여 실용적인 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

본 연구에 사용된 isopyrazam (*syn*-isomer, 순도 97.3%; *anti*-isomer, 순도 96.3%)의 분석용 표준품은 Syngenta Korea에서 분양받아 사용하였다. Isopyrazam 표준품의 일정량을 acetonitrile에 녹여 500 mg kg^{-1}의 농도로 조제하여 2°C에서 냉장 보관하면서 필요시 마다 보관 중인 stock solution을 희석하여 사용하였다. 흡착 크로마토그래피법에 의한 정제에 사용된 florisil (60~100 mesh, 잔류분석용)은 Fluka (USA)로부터 구입하여 130°C에서 5시간 이상 활성화시킨 후 사용하였다. *n*-Hexane, acetonitrile 및 ethyl acetate는 J. T. Baker (USA)에서 구입하여 사용하였으며, dichloromethane은 Junsei Chemical, Co., Ltd. (GR급, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 무기 및 기타 시약은 잔류분석용 또는 GR급을 사용하였다. 전처리 시 농산물 시료를 마쇄 및 균질 화 하기위한 시료균질기(AM-10, Nissei, Nihonseiki Kaisha Ltd., Japan)와 진탕기(Lab. Companion IS-971R, Jeio Tech, Korea)를 사용하였으며, 추출액을 감압유거 하기 위하여 농축기(Eyela NE-1001, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)를 사용하였다.

농산물 시료

Isopyrazam의 분석법 확립을 위한 분석 대상 농산물은 Codex Alimentarius Commission의 잔류분석법 검증을 위한 대표시료 분류기준에 따라 곡류는 현미, 두류는 대두, 채소류는 고추, 오이 및 참외, 과일류는 감귤로 총 6종의 대표 농산물 시료를 선정하였다. 대표 농산물로 선정된 현미, 대두, 고추, 감귤, 오이 및 참외의 무농약 재배 시료는 지역 대형마트에서 판매하는 유기농산물을 구매하여 "농약잔류성 시험 기준과 방법"에 따라 분석하였다. 각각의 분석 시료는 polyethylene bag에 넣어 −20°C로 냉동 보존하여 분석 시 일정량을 취하여 사용하였다.

시료 추출 및 정제

대상 농산물 시료로부터 isopyrazam을 추출하기 위하여 현미와 대두를 제외한 시료 25 g에 acetonitrile 100 mL를 가하여 homogenizer로 10,000 rpm에서 3분간 마쇄 추출하였다. 현미와 대두는 시료 25 g에 각각 증류수 20 mL와 40 mL을 가하여 30분간 방치, 습윤화 한 후 100 mL의 acetonitrile을 가하여 1시간 동안 진탕 추출하였다. 추출액 중 acetonitrile을 감압유거하고 acetonitrile 30 mL로 잔사 및 용기를 씻어 내려 앞의 여액과 합하였다. 합친 여과액을 40°C 이하 수욕 상에서 감압・농축하여, 농축잔사를 1,000 mL 용량의 분액여두에 옮기고 포화식염수 50 mL, 증류수 400 mL를 가하여 *n*-hexane으로 50 mL, 50 mL로 2회 분배하였으며, 분배액을 15 g의 anhydrous sodium sulfate층을 통과시켜 탈수시킨 후 감압・농축, 건고하였다. 현미와 대두 시료를 제외한 고추, 감귤, 오이 및 참외의 경우 건고한 잔류물에 10 mL의 *n*-hexane으로 재용해 하여, 흡착 크로마토그래피를 수행하였으며, 현미와 대두시료의 경우 비극성 불순물을 제거하기 위하여 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 추가하였다. 건고한 현미와 대두 시료 잔류물에 acetonitrile로 포화시킨 *n*-hexane 40 mL을 가하여 500 mL 용량의 분액여두에 옮기고, *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL를 가하여 2회 반복 분배 하였다. 분배액을 15 g의 anhydrous sodium sulfate층을 통과시켜 탈수시킨 후 감압・농축, 건고시킨 후 10 mL의 *n*-hexane으로 재용해하여, 흡착 크로마토그래피를 수행하였다. Glass chromatographic column (내경 15 mm, 길이 300 mm)에 florisil 10 g (activated at 130°C over 5 hours)과 anhydrous sodium sulfate를 약 2 cm 높이로 차례로 충진 한 후 *n*-hexane 50 mL로 pre-conditioning하였다. 고정상 상단이 노출되기 전에 추출과정에서 얻은 *n*-hexane 10 mL 중 5 mL를 가하여 유출시켜 버리고, *n*-hexane/ethyl acetate (90/10, v/v) 혼합용매 100 mL를 가하여 유출시켜 버렸다. 고정상 상단이 노출되기 전에 *n*-hexane/ethyl acetate (70/30, v/v) 혼합용매 100 mL로 isopyrazam을 용출시켜 용출액을 분취하였다. 용출액을 40°C 이하 수욕 상에서 감압・농축하여, 건고한 잔류물을 acetonitrile 5 mL로 재용해 한 후 HPLC/UVD로 분석하였다.

기기분석

Isopyrazam의 잔류분석 시 사용한 HPLC/UVD의 분석 조건은 Table 1과 같으며, 확립된 기기분석 조건에서 isopyrazam의 retention time은 *syn*-isomer 14.7 min., *anti*-isomer 14.0 min.이었다. HPLC/UVD 분석을 통하여 시료 중 검출된 isopyrazam 잔류분의 정성적 신뢰성 확인을 위하여 LC/MS를 이용하였으며, 분석 조건은 Table 2와 같다.

회수율 시험

각 농산물 시료별 잔류분석법의 적용성을 검정하기 위하

Table 1. HPLC/UVD operating conditions for isopyrazam (*syn*-isomer, *anti*-isomer)

Instrument	Agilent HPLC 1200, USA
Detector	Diod Array Detector (DAD, wave length: 254 nm)
Column	Phenomenex-C18 (4.0 mm I.D × 250 mm, 5 μm), USA
Temperature	40°C
Flow rate	Acetonitrile : water = 60 : 40 (v/v), 1.0 mL $min.^{-1}$
Injection volumn	10.0 μL

Table 2. LC/MS operating conditions for the confirmation of isopyrazam (*syn*-isomer, *anti*-isomer) residue in crops

Instrument	Shiseido nanospace-II, Thermo TSQ Quantum ultra
Column	Unison UK-C18 (2.0 mm I.D × 100 mm, 3 μm), USA
Column temperature	40°C
Flow rate	0.18 mL $min.^{-1}$
Mobile phase	A: Acetonitrile, B: 0.1% Formic acid in water

Time (min.)	A (%)	B (%)	Flow (mL $min.^{-1}$)
0	20	80	0.18
2	20	80	0.18
10	60	40	0.18
15	60	40	0.18
16	20	80	0.18
30	20	80	0.18

Sample size	1.0 μL
Ionization	ESI positive-ion mode
Capillary temperature	300°C
Tube lense (360 m/z)	55
Mass range (m/z)	100-400

여 무처리 시료에 대한 회수율 시험을 수행하였다. 각각의 대상 농산물 무처리 시료에 isopyrazam의 표준용액을 0.04, 0.4 및 2.0 mg kg^{-1}수준이 되도록 3수준 3반복으로 처리하여 앞서 기술한 분석과정을 수행하여 회수율 및 분석오차를 산출하였다.

결과 및 고찰

분석대상 성분에 대한 기기분석법의 최적화

본 연구의 분석 대상 성분인 isopyrazam의 물리화학적 특성은 Table 3과 같다. Isopyrazam은 이성질체로 *n*-octanol/water 분배계수는 4.25 (*syn*-isomer, *anti*-isomer)로 중간 극성의 중성 화합물이다. 증기압은 25°C에서 1.3×10^{-4} mPa으로 휘발성이 낮은 편이며, 분자 구조 내에 -NH기를 함유하고 있어 GLC 분석이 어려울 것으로 판단되어 HPLC-UVD를 이용한 기기분석법을 시도하였다. Isopyrazam의 자외흡광 특성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 그 결과 210 nm에서 가장 높은 흡광력을 보였으나, 유기화합물이 대부분인 시료 중 방해물질과의 간섭을 최소화하기 위하여 다음으로 높은 흡광력을 보인 254 nm를 측정파장으로 선정하였다. 일반적으로 중성의 화합물 분리에 많이 사용되는 역상(reversed phase) column (C_{18})을 사용하여 분석하였으며, 재현성과 분

Table 3. Physicochemical characteristics of isopyrazam (*syn*-isomer, *anti*-isomer)

Compound	Molecular weight	Vapor pressure (mPa)	Log P_{ow} [a)]	Water solubility (mg L^{-1})
Isopyrazam (*syn*) Isopyrazam (*anti*)	359.4	1.3×10^{-4} (25°C)	4.25	0.55 (20°C)

[a)] *n*-Octanol/water partition coefficient

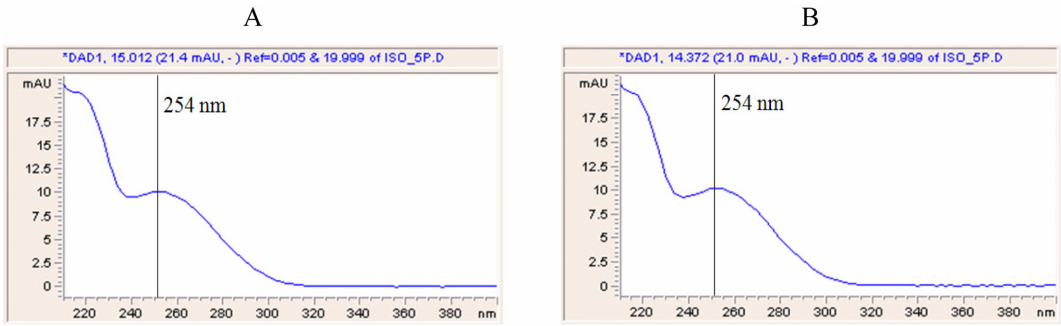

Fig. 1. UV absorption spectra of isopyrazam (254 nm). A: *Syn*-isomer (SYN 534969), B: *Anti*-isomer (SYN 534968).

석 시간 측면에서 유리 할 것으로 판단되는 isocratic 조건을 우선적으로 시도하였다. *Syn*과 *anti*-isomer 간 분리가 충분히 이루어지고 분석 시료 중 불순물의 간섭이 적었던 acetonitrile/water (60/40, v/v) 조건을 isopyrazam의 분석 조건으로 선정하였다.

시료추출 및 정제

1) 시료 추출법

수분을 함유하고 있는 농산물 시료의 경우 중성의 잔류분은 시료입자 표면 또는 내부에 존재하며, 그 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 사용할 경우 시료 내부로의 침투성이 낮아 충분한 추출 효율을 얻을 수 없다. 따라서 시료 내부로의 침투성이 높아 충분한 추출 효율을 얻을 수 있는 수용성 유기용매인 acetone, acetonitrile 및 methanol을 주로 사용한다(이영득, 2012). 본 연구에서는 대상 농산물 시료로부터 isopyrazam을 추출하기 위한 용매로 비극성 농약의 잔류분석법에서 표준적으로 널리 사용되고 있는 acetonitrile을 사용하였다(AOAC, 2005; US FDA, 2002).

2) 액-액 분배법

추출물로부터 isopyrazam성분 외에 추출 혼입된 농산물 시료의 유래 불순물을 제거하기 위하여 dichloromethane 또는 *n*-hexane과 같은 비극성 유기용매로 최적의 분배법을 확립하고자 하였다. 분석 대상 농약의 추출액을 포화식염수/증류수로 희석한 후 *n*-hexane, dichloromethane 및 ethyl acetate의 적용성을 검정하였다. 액-액 분배조건에 따른 isopyrazam의 분배효율과 양상을 조사한 결과 Table 4, 5와 같다.

Isopyrazam의 표준용액을 1,000 mL 용량의 분액여두에 정확히 가한 후 포화식염수 50 mL, 증류수 400 mL를 가하여 *n*-hexane, dichloromethane 및 ethyl acetate 액-액 분배조건에 따른 분배효율과 양상을 조사한 결과 50 mL 용매로 2회 및 3회 실시하였을 때 세 분배용매 모두 95% 이상의 회수율을 보였다. 추출할 경우 간섭물질의 방해가 적을 것으로 판단되는 *n*-hexane을 분배용매로 하여 2회 분배법을 선정하였다(이영득, 2012). 한편 *n*-hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 지방이나 왁스물질의 제거에 주로 이용되는 정제법으로 액-액 분배과정 중 hexane층으로 분배되는 비극성 간섭물질의 제거효과가 기대되었다. 대상 성분의

Table 4. Liquid-liquid partitioning efficiency of isopyrazam (*syn*-isomer)

Solvents	*n*-Hexane	Dichloromethane	Ethyl acetate
[a]I. 2nd partition recovery (%)	98.6	99.3	101.6
[b]II. 3rd partition recovery (%)	99.2	101.1	102.8

[a]50 mL of saturated. NaCl + 400 mL of distilled water + solvent (50 mL, 50 mL)
[b]50 mL of saturated. NaCl + 400 mL of distilled water + solvent (50 mL, 50 mL, 50 mL)

Table 5. Liquid-liquid partitioning efficiency of isopyrazam (*anti*-isomer)

Solvents	*n*-Hexane	Dichloromethane	Ethyl acetate
[a]I. 2nd partition recovery (%)	102.8	103.9	102.8
[b]II. 3rd partition recovery (%)	104.2	105.4	104.7

[a]50 mL of saturated. NaCl + 400 mL of distilled water + solvent (50 mL, 50 mL)
[b]50 mL of saturated. NaCl + 400 mL of distilled water + solvent (50 mL, 50 mL, 50 mL)

Table 6. Recovery of isopyrazam (*syn*-isomer, *anti*-isomer) in *n*-hexane/acetonitrile partition

Compound	Recovery (%)	
	Partition I[a)]	Partition II[b)]
Isopyrazam (*syn*)	104.4	106.9
Isopyrazam (*anti*)	102.8	103.9

[a)]40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile + 30 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (2 times)
[b)]40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile + 30 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (3 times)

Table 7. Effect of *n*-hexane/acetonitrile partition (HAP) on the removal of nonpolar co-extractives

Crop	Amount of dried extract (mg)[a)]		Removal (%)
	Before HAP[b)]	After HAP	
Brown rice	796	380	52.2
Soybean	920	393	57.2
Green pepper	76	42	44.7
Mandarin	7	4	42.8
Cucumber	4	3	25
Korean melon	4	3	25

[a)]25 g of crop sample
[b)]After liquid-liquid partition of acetonitrile extract

n-hexane/acetonitrile 분배법의 분배효율을 조사한 결과 Table 6과 같다. 500 mL 용량의 분액여두에 isopyrazam의 표준용액을 정확히 가한 후 acetonitrile로 포화시킨 *n*-hexane 40 mL을 가하여 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL로 2회 및 3회 실시하였을 때 모두 100% 이상의 회수율을 보여 2회 분배를 선정하였다. *n*-Hexane/acetonitrile 분배법을 대상 농산물 시료에 적용하여 각 시료에 대한 유지성 불순물 제거 효율을 조사한 결과 Table 7과 같다. 현미와 대두 시료의 경우 각각 796 mg, 920 mg의 추출 건조물에 대해 50% 이상의 제거효율을 보여 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 추가하였다. 고추, 감귤, 오이 및 참외 시료에서는 제거효율이 낮아 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 배제하였다.

2) Florisil 흡착 크로마토그래피 정제법

잔류농약분석에서 대상성분의 기기 분석을 위한 최종 정제과정에서 필수적으로 이용되는 흡착크로마토그래피법은 간섭물질 제거법으로 가장 많이 사용하는 방법이다. 흡착제로는 alumina, florisil, silica gel 및 활성탄 등이 있으며, isopyrazam의 이화학 특성을 고려하여 중간 극성의 잔류분석법에서 표준적으로 사용하는 florisil을 흡착제로 선정하였다. Florisil은 silica (SiO_2)와 magnesia (MgO)를 혼합 · 용융하여 제조한 합성 흡착제로서 유지 및 색소의 비용출성이 우수한 장점이 있다(이영득, 2012). *n*-Hexane/ethyl acetate의 혼합용매를 사용하여 최적의 방법을 확립하고자 isopyrazam의 용출 양상을 조사한 결과 Table 8~11과 같다. Isopyrazam보다 빠르게 용출되는 간섭물질을 제거하기 위한 세척용 용출용매는 100 mL의 용매로 용출시켰을 때 isopyrazam의 용출이 없는 *n*-hexane/ethyl acetate (90/10, v/v) 혼합용매를 선정하였으며, isopyrazam의 성분을 회수하기 위한 용출용매는 100 mL 구간을 용출시켰을 때 *syn*-isomer와 *anti*-isomer 모두 98% 이상 용출 된 *n*-hexane/ethyl acetate (70/30, v/v) 혼합용매를 선정하였다.

분석법 검증

본 연구에서 확립한 분석과정을 적용하여 isopyrazam의 잔류분석을 수행한 결과 Fig. 2와 같았으며, isopyrazam의 분석 대상 무처리 시료의 크로마토그램에서 간섭물질은 관찰되지 않았다. 또한 isopyrazam의 분석 대상 시료 중 현미와 대두 시료는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 적용하여 보다 깨끗한 크로마토그램 결과를 확보할 수 있었다. Isopyrazam의 대표 농산물 현미, 대두, 고추, 감귤, 오이 및 참외 무처리 시료에 isopyrazam을 정량한계 수준을 포함하여 3수준 3반복으로 처리한 후 확립한 분석과정을 수행하였다. 회수율 및 정량한계를 산출한 결과 Table 12, 13과 같다. *Syn*-isomer의 회수율은 81.0~105.4%이었으며, *anti*-isomer의 회수율은 80.8~105.6%로 농산물 시료 종류 및 처리수준에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70~120%의 범위와 분석오차 또한 10% 미만으로 공정분석법 기준인 20%를 만족시켰다(이영득, 2012). Isopyrazam의 정량한계는 0.04 mg kg^{-1} 이었다.

Table 8. Elution profile of isopyrazam (*syn*-isomer) on florisil column[a)]

n-Hexane/ethyl acetate (v/v)	*Syn*-isomer recovery (%)		
	0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL
95/5	-	-	-
90/10	-	-	-
85/15	-	17.6	62.2
80/20	4.2	82.4	11.0

[a)]Activated florisil (60-100 mesh), 10 g, was pre-washed with 50 mL of *n*-hexane

Table 9. Elution profile of isopyrazam (*anti*-isomer) on florisil column[a)]

n-Hexane/ethyl acetate (v/v)	*Anti*-isomer recovery (%)		
	0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL
95/5	-	-	-
90/10	-	-	-
85/15	-	6.0	52.7
80/20	-	75.6	25.6

[a)]Activated florisil (60-100 mesh), 10 g, was pre-washed with 50 mL of *n*-hexane

Table 10. Optimized elution system of isopyrazam (*syn*-isomer) on florisil column[a)]

n-Hexane/ethyl acetate (v/v)	*Syn*-isomer recovery (%)			
	0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	Total
Washing (90/10)	-	-		
Elution (70/30)	82.5	15.9	-	98.4

[a)]Activated florisil (60-100 mesh), 10 g, was pre-washed with 50 mL of *n*-hexane

Table 11. Optimized elution system of isopyrazam (*anti*-isomer) on florisil column[a)]

n-Hexane/ethyl acetate (v/v)	*Anti*-isomer recovery (%)			
	0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	Total
Washing (90/10)	-	-		
Elution (70/30)	65.1	38.6	-	103.7

[a)]Activated florisil (60-100 mesh), 10 g, was pre-washed with 50 mL of *n*-hexane

분석법의 재확인

본 연구에서 확립된 잔류분석법을 이용하여 분석된 isopyrazam 잔류분의 신뢰성 높은 정성적 재확인을 위하여 LC/MS를 이용한 재확인용 기기분석법을 확립하였다.

LC/MS를 이용하여 isopyrazam의 표준품으로 대상 화합물의 mass spectrum상 분자구조를 잘 반영하면서 intensity가 높은 최적 ion 및 fragment ion 값을 얻고자 total-ion chromatogram (TIC)을 확보하였다. TIC로부터 얻은 isopyrazam의 mass spectrum으로부터 selected-ion monitoring (SIM)용 최적 fragment를 선정하였다(Fig. 3). Isopyrazam의 머무름 시간 및 LC/MS SIM을 위한 fragment의 m/z 값은 Table 14에 나타내었으며, 이러한 LC/MS 조건을 대상 농산물 시료에 적용한 잔류분의 재확인의 예는 Fig. 4와 같다. 분석 대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하도록 하였다. 분석 대상 성분을 LC/MS로 재확인할 때 monitoring하는 SIM channel의 수를 과다하게 설정하면 신호/잡음(S/N) 비가 낮아짐으로 분석 시료별 SIM channel의 설정은 3개 이내로 제한하는 것이 적정 감도를 위하여 필요하였다(이영득, 2012).

본 연구에 사용된 isopyrazam의 대상 농산물 무처리 시료에서 대상 성분들의 peak가 관찰되지 않았으며, 인위적으로

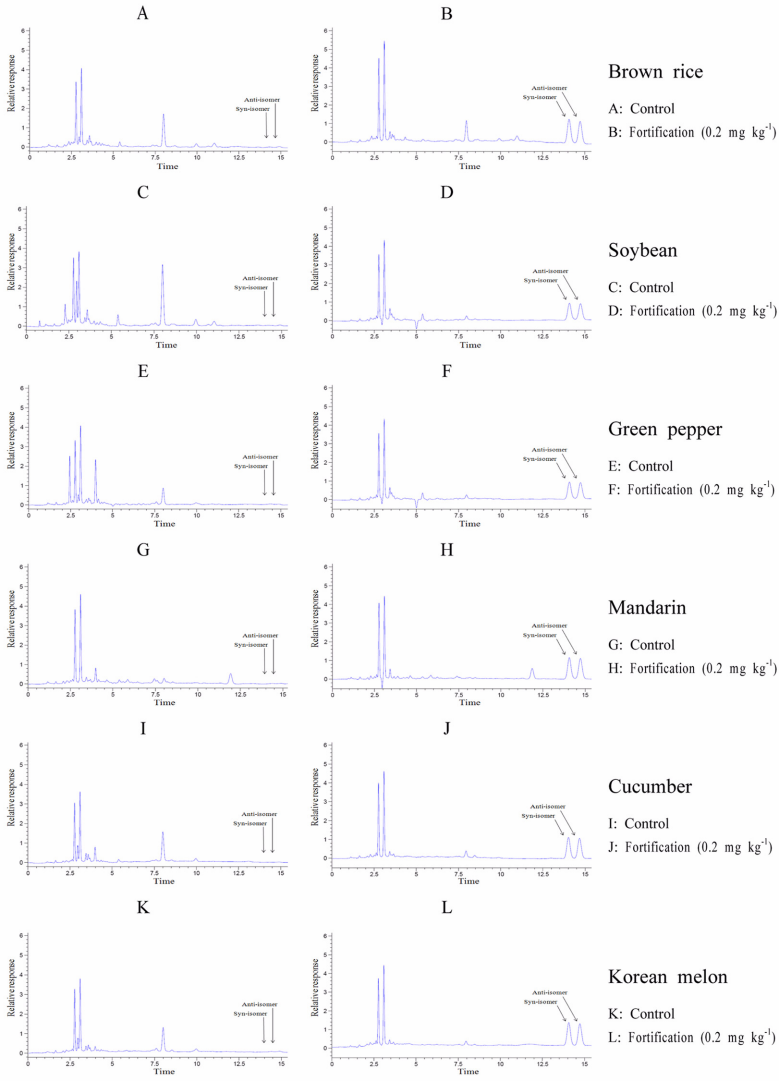

Fig. 2. HPLC/UVD chromatograms of extracts for the analysis of isopyrazam (*syn*-isomer, *anti*-isomer) residues.

Table 12. Recovery and LOQ of isopyrazam (*syn*-isomer) in representative crop samples

Fotification (mg kg^{-1})	Recovery ± SD (%)[a]						LOQ (mg kg^{-1})
	Brown rice	Soybean	Green pepper	Mandarin	Cucumber	Korean melon	
0.04	99.3 ± 9.3	103.4 ± 9.5	81.0 ± 3.5	83.0 ± 7.0	89.1 ± 3.5	105.4 ± 9.3	0.04
0.4	104.0 ± 4.7	88.3 ± 1.5	101.1 ± 1.5	104.0 ± 0.9	99.3 ± 3.4	102.3 ± 2.7	
2.0	88.4 ± 2.1	87.7 ± 2.1	88.7 ± 2.0	90.3 ± 4.3	91.7 ± 2.9	88.2 ± 3.1	

[a]Mean values of triplicate samples with standard deviations

Table 13. Recovery and LOQ of isopyrazam (*anti*-isomer) in representative crop samples

Fotification (mg kg^{-1})	Recovery ± SD (%)[a]						LOQ (mg kg^{-1})
	Brown rice	Soybean	Green pepper	Mandarin	Cucumber	Korean melon	
0.04	105.6 ± 8.8	88.3 ± 6.6	86.4 ± 5.7	86.4 ± 0.1	103.7 ± 5.7	99.8 ± 8.8	0.04
0.4	100.0 ± 5.5	80.8 ± 1.3	100.2 ± 2.8	97.3 ± 1.2	95.6 ± 4.0	96.9 ± 2.4	
2.0	88.7 ± 2.1	90.0 ± 2.6	87.2 ± 1.7	87.7 ± 4.0	89.8 ± 3.1	85.2 ± 2.9	

[a]Mean values of triplicate samples with standard deviations

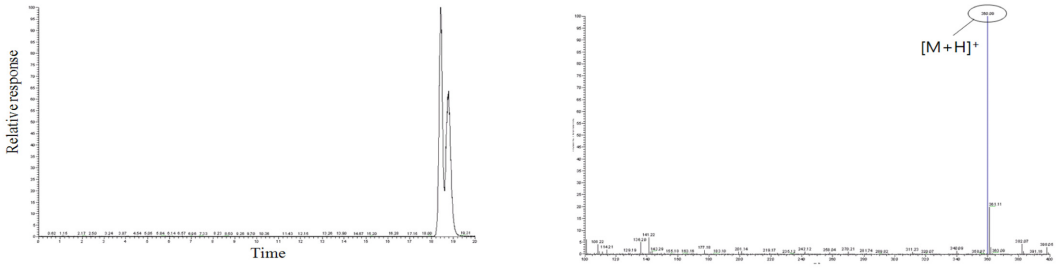

Fig. 3. Total-ion chromatogram (TIC) of isopyrazam in LC/MS under ESI(+) mode and ESI(+) mass spectrum of isopyrazam.

Table 14. Molecular ions for selected ion monitoring LC/MS during confirmation of suspected residue

Retention time (min.)	Molecular weight	Fragment monitored (m/z)
		SIM
Isopyrazam (*syn*) 18.78 Isopyrazam (*anti*) 18.43	359.4	360

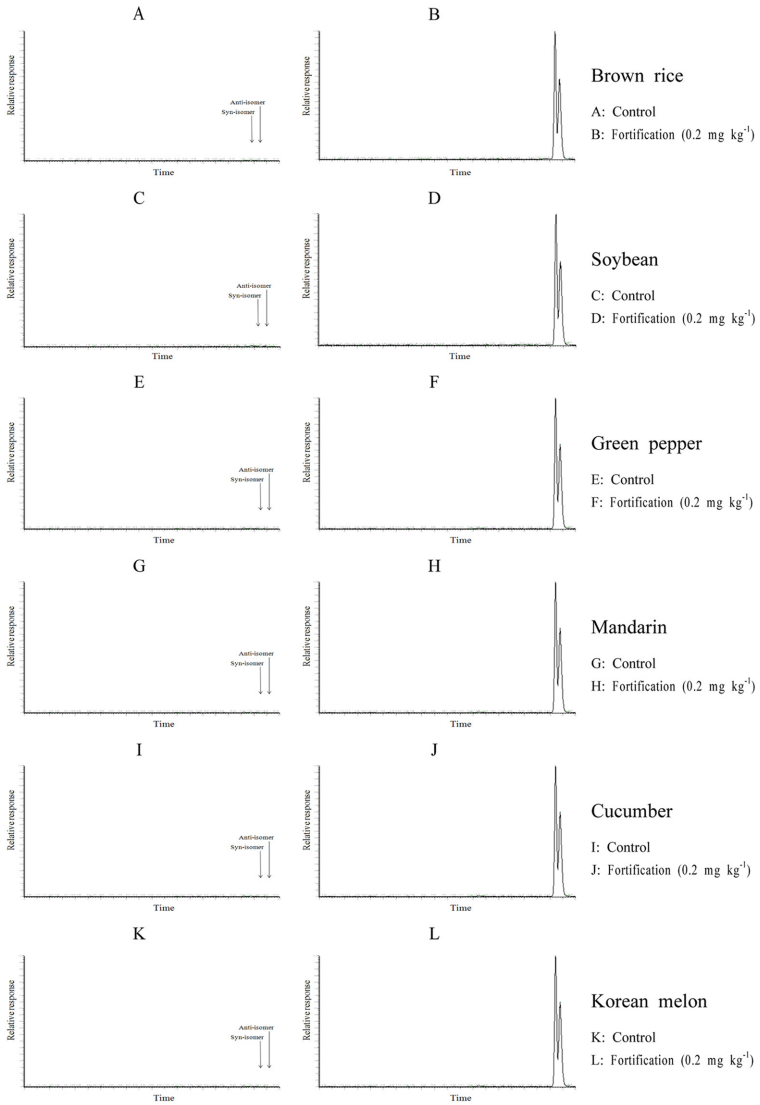

Fig. 4. LC/MS ESI (+) SIM chromatogram of extracts for confirmation of isopyrazam.

각각의 표준품을 첨가한 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 정확하게 isopyrazam의 잔류분만을 확인할 수 있었다. 따라서 LC/MS의 SIM 조건을 이용할 경우 HPLC/UVD를 이용한 정량법과 더불어 isopyrazam의 잔류분의 추가적 정성 분석법으로 활용할 수 있다.

결 론

Isopyrazam에 대하여 HPLC/UVD를 이용한 새로운 정밀 잔류농약 분석법을 확립하였다. 분석 단계별 표준화된 검증을 수행하였으며, 시료 조제 및 기기분석과정의 명확성과 편의성을 함께 고려하였다. Isopyrazam의 대표 농산물 6종(현미, 대두, 고추, 감귤, 오이, 참외)의 시료로부터 잔류분을 acetonitrile로 추출하고 *n*-hexane으로 분배 추출하였다. 현미와 대두 시료의 경우 *n*-hexane/acetonitrile 분배 과정을 추가로 확립하여, 유지 및 비극성 간섭물질이 다량 함유되어 있는 작물 시료까지 분석대상 시료의 범위를 확장하였다. 최종적으로 florisil 흡착 크로마토그래피를 이용한 정제과정을 이용하여 추출액을 정제함으로써 간섭물질의 최소화, 분석의 정확성 및 신뢰성을 극대화하였다. Isopyrazam의 정량한계는 0.04 mg kg^{-1}이었으며, 분석법 검증을 위한 회수율 시험 결과 대상 성분과 농산물 시료에 따라 *syn*-isomer의 회수율은 81.0~105.4%, *anti*-isomer의 회수율은 80.8~105.6%이었고, 분석오차는 모두 10% 미만으로 개별 분석법 기준 범위를 만족하였다. HPLC/UVD를 이용하여 분석한 isopyrazam 잔류분의 신뢰성을 확보하기 위하여 LC/MS를 이용한 재확인용 기기분석법을 수행하여 정량한계수준에서 재확인 하였다. 본 연구에서 확립한 isopyrazam의 개별 분석법은 각 단계별 효율을 검증하였을 뿐만 아니라 재확인 과정을 포함하여 잔류분석결과의 신뢰성을 확보하였다. 즉, 확립된 분석법은 높은 감도와 우수한 재현성, 분석과정의 편의성을 고려할 때 농산물의 잔류농약에 대한 잔류 검사 및 안전성 평가를 위한 공정 분석법으로 활용될 수 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전청의 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(09072잔류약997)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Literature Cited

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2005). Official Methods of Analysis. 18th ed., pp.7.3.01-7.3.18, AOAC Inc., USA.

Chang, H. R., H. R. Kang, J. H. Kim, J. H. Kim, J. A. Do, J. H. Oh, K. S. Kwon, M. H. Im and K. Kim (2012) Development of Analytical Method for the Determination and Identification of Unregistered Pesticides in Domestic for Orange and Brown Rice (I) -Chlorthal-dimethyl, Clomeprop, Diflufenican, Hexachlorobenzene, Picolinafen, Propyzamide-. Korean J. Environ. Agric. 31(2):157~16.

Hong, Y.S., H.W. Park, H. Choi, J.K. Moon, M.J. Kim, J.E. Kim, Y.D. Lee, C.H. Oh and J.H. Kim (2004) An improved method for multiresidue analysis of pesticides in lettuce, Chinese cabbage and green pepper by gas chromatography. Korean J. Environ. Agric. 23(3): 158~169.

Jung, Y. H., J. E. Kim, J. H. Kim, Y. D. Lee, C. H. Im and J. Y. Hur (2004) New Pesticides. Sigma Press Inc., Korea. pp.1~17, pp.271~277.

Korea Crop Protection Association (2012) 2012 Guideline of Pesticides Use. Korea Crop Protection Association.

Kwon, H. Y., C. S. Kim, B. J. Park, I. H. Kim, S. M. Hong, K. A. Son, Y. D. Jin, J. B. Lee, G. J. Im and D. H. Kim (2012) Development of Analytical Method for Picoxystrobin in Agricultural Commodities Using GC/ECD and GC/MS. Korean J. Environ. Agric. 31(2):146~ 151.

Lee, S. H., J. W. Hong, M. H. Kim, W. K. Kim, J. G. Kim, C. H. Kim, Y. T. Seo, H. S. Yang, D. H. Lee, J. G. Lee, T. M. Jung and S. J. Jo (1997) Pesticides. Samjeong Press Inc., Korea. pp.11~13.

Lee, S. M., M. L. Papathakis, H. M. Feng, G. F. Hunter, and J. E. Carr (1991) Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. Fresenius J. Anal. Chem. 339:376~383.

Lee, Y. D. (2012) Pesticide Analytical Manual. Korea Food and Drug Administration.

Schenck, F.J., P.S. Callery, P.M. Gannett, J.R. Daft, and S.J. Lehotay (2002) Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. J. AOAC Int. 85:1177~1180.

Song. Y. S., Y. H. Kim, S. J. Lee, Y. S. Hwang, C. H. Kwon, J. A. Do, J. H. Oh, M. H. Im, W. S. Jang, Y. D. Lee and M. G. Jung (2012) Determination of cyromazine residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. Korean J. Pestic. Sci. 16(3):202~208.

Tomlin, C. D. S (2009) The Pesticide Manual (15th). British Crop Production Council, UK. p.676.

U.S. Food and Drug Administration (2002). Pesticide Analytical Manual, Vol I. Multi-residue Analytical Methods and Methods for Individual Pesticide Residues, USA. pp.301-1301-8.

농산물 중 살균제 Isopyrazam의 개별 잔류분석법 확립

김지윤 · 김자영 · 함헌주[1] · 도정아[2] · 오재호[2] · 이영득[3] · 허장현*
강원대학교 농업생명과학대학 바이오자원환경학과,
[1]친환경농산물안전성센터, [2]식품의약품안전청, [3]대구대학교 생명환경학부

요 약 Isopyrazam은 신규 농약으로 현재 국내에는 공정분석법이 확립되어 있지 않아 농산물 중 잔류농약 분석을 위한 개별 분석법 개발이 필요하다. 본 연구는 현미, 대두, 고추, 감귤, 참외, 오이를 대표 농산물로 선정하여 isopyrazam에 대한 공정 개별 분석법을 확립하고자 수행되었다. Isopyrazam의 *syn*과 *anti* 이성질체를 분석하기 위해 여러 가지 추출, 분배 및 정제방법을 비교하면서 최적의 조건을 충족해 가며 분석법을 확립하였다. 대표 농산물 시료 중 함유된 isopyrazam은 acetonitrile로 추출한 후 *n*-hexane으로 액-액 분배하였으며, florisil을 이용하여 정제한 후 HPLC/UVD로 최종 분석하였다. 시료 중 현미와 대두는 *n*-hexane/acetonitrile을 이용한 유지제거 과정을 추가하였다. 본 분석법의 isopyrazam에 대한 정량한계는 1.0 ng (S/N > 10)이었고, 분석정량한계는 0.04 mg kg^{-1}이었다. 회수율은 isopyrazam *syn*과 *anti*-isomer에서 각각 81.0~105.4%, 80.8~105.6%이었으며, 반복 간 분석오차는 10% 미만이었다. 분석성분에 대한 확인을 위하여 LC/MS SIM을 이용하였다. 본 연구에서 확립된 isopyrazam의 분석법은 우수한 정량성 및 재현성, 분석과정의 편의성을 고려할 때 농산물 중 잔류농약에 대한 검사 및 안전성 평가를 위한 공정 분석법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

색인어 농약, Isopyrazam, 농산물, 개별 분석법, 정량한계