Vol. 18, No. 4, pp. 321-329 (2014)

Open Access http://dx.doi.org/10.7585/kjps.2014.18.4.321

ORIGINAL ARTICLES / RESIDUE

Online ISSN 2287-2051 Print ISSN 1226-6183

# HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 Amisulbrom의 잔류분석

안경근·김경하·김기쁨·김민지·황영선·홍승범·이영득··정명근\* 강원대학교 생약자원개발학과, '대구대학교 생명환경학부

# Determination of Amisulbrom Residues in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS

Kyung-Geun Ahn, Gyeong-Ha Kim, Gi-Ppeum Kim, Min-Ji Kim, Young-Sun Hwang, Seung-Beom Hong, Young Deuk Lee<sup>1</sup> and Myoung-Gun Choung\*

Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea <sup>1</sup>Division of Life and Environmental Science, Deagu University, Gyeongsan 712-714, Korea

(Received on December 2, 2014. Revised on December 5, 2014. Accepted on December 20, 2014)

Abstract This experiment was conducted to establish an analytical method for residues of amisulbrom, as recently developed an oomycete-specific fungicide showing inhibition of fungal respiration, in crops using HPLC-UVD/MS. Amisulbrom residue was extracted with acetonitrile from representative samples of five raw products which comprised apple, green pepper, kimchi cabbage, potato and hulled rice. The extract was diluted with 50 mL of saline water and directly partitioned into dichloromethane to remove polar co-extractives in the aqueous phase. For the hulled rice sample, n-hexane/acetonitrile partition was additionally employed to remove non-polar lipids. The extract was finally purified by optimized Florisil column chromatography. On an octadecylsilyl column in HPLC, amisulbrom was successfully separated from sample co-extractives and sensitively quantitated by ultraviolet absorption at 255 nm with no interference. Accuracy and precision of the proposed method was validated by the recovery test on every crop samples fortified with amisulbrom at 3 concentration levels per crop in each triplication. Mean recoveries ranged from 85.3% to 105.6% in five representative agricultural commodities. The coefficients of variation were all less than 10%, irrespective of sample types and fortification levels. Limit of quantitation (LOQ) of amisulbrom was 0.04 mg/kg as verified by the recovery experiment. A confirmatory method using LC/MS with selected-ion monitoring technique was also provided to clearly identify the suspected residue. The proposed method was sensitive, reproducible and easy-to-operate enough to routinely determine the residue of amisulbrom in agricultural commodities.

Key words Amisulbrom, HPLC-UVD/MS, Residue

# 서 론

농약은 병해충 및 잡초를 방제하는데 필수적인 요소로 수 량과 품질을 향상시키고 노동력을 절감시키는 등 현대 농업 에 큰 공헌을 하고 있으나, 살포 후 일정기간 이상 잔류되는 특성이 있어 수확 농산물에 살포농약이 잔류할 가능성이 상 존한다. 따라서 소비되는 농산물 중 살포한 농약들의 잔류 분에 대한 안전성 확보는 반드시 이루어져야 할 과제이다 (Kwon 등, 2008).

Amisulbrom[3-(3-bromo-6-fluoro-2-methylindol-1-ylsulfonyl)-N,N-dimethyl-1H-1,2,4-trazole-1-sulfonamide] 은 2007년 등록된 sulfonamide계 살균제로 병원균 체내 미토콘 드리아의 호흡을 억제함으로써 난균강에 선택적으로 작용하는 약제로 알려져 있다. 외국에서는 포도 및 감자의 재배 (US/EPA, 2011), 국내에서는 고추, 배추, 감자, 양파, 파, 수박, 토마토, 참깨 등 다양한 작물의 재배 시 노균병, 뿌리흑병, 역병 및 뿌리썩음병을 방제하는 데 사용되고 있으며(한 국작물보호협회, 2014), 국내에서의 잔류허용기준(MRL)은

\*Corresponding author

Tel: +82-33-540-3321, Fax: +82-33-540-3329

E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr

0.05-3.0 mg/kg 범위로 설정되어 있다(식품의약품안전처, 2014).

Amisulbrom은 평균분자량이 466.31 ( $C_{13}H_{13}BrFN_5O_4S_2$ )이고 녹는점이  $128.6-130.0^{\circ}$ C인 백색 고체이다. 분자 내에 2개의 sulfonyl기를 함유하고 있어 극성이 높을 것으로 예상되지만 각 sulfonyl기와 결합하고 있는 질소원자에 수소원자가 없으므로 전자 끌게 효과에 의한 해리성이 없다. 따라서 n-octanol/water 분배계수( $\log\ P_{ow}$ )가 4.4로 보고되어 있는 중성 화합물이며, 대부분의 유기용매에는 잘 용해되는 특성을 나타내지만 물에 대한 용해도는 낮아  $0.11\ mg/L$ 를 나타낸다 (US/EPA, 2011).

Amisulbrom은 국내 식품공전 잔류농약분석법 4.1.4.127 (식품의약품안전청, 2012)에 SPE 정제 후 HPLC (highperformance liquid chromatography)로 분석하는 방법이 제시되어 있으나, 다양한 식품군에 MRL이 설정되어 있음에도 불구하고 채소류에 대해서만 잔류분석법이 적용되어 있으며, SPE 정제의 제한성으로 인하여 재현성 및 정제도가불량할 우려가 있다. 또한 황 등(2012)도 HPLC를 이용하여분석한 바 있으나, 전처리 및 정제과정의 부재로 인해 분석법의 최적화가 수행되지 않았으며, 실제 대표적 농산물을 대상으로 한 분석조건 확립 및 회수율 등의 검증 결과가 이루어지지 않았다.

따라서, 본 연구는 현행 식품공전 상에 수록된 amisulbrom의 분석법을 개선하여 정확성 및 정밀성이 확보된 효율적인 잔류분석법을 개발하고자 하였다.

# 재료 및 방법

#### 시약 및 기구

본 연구에 사용한 amisulbrom (Fig. 1)은 순도 99% 이상의 분석용 표준품을 Dr. Ehrenstorfer GmbH (독일)로부터구입하여 사용하였다. 표준품의 stock solution은 acetonitrile에 1000 mg/L의 농도로 조제하여 ~20°C의 냉동고에서 보관하면서 필요 시마다 희석하여 사용하였다. Florisil {60-100 mesh, J. T. Baker (미국)}은 130°C에서 하룻밤 이상 가열하여 활성화한 후 사용하였다. n-Hexane, dichloromethane, acetonitrile 및 ethyl acetate는 잔류분석용을, deionized water는 HPLC용을 J. T. Baker (미국)에서 구입하여 사용하였다. 기타 유기용매 및 무기시약은 시약특급 또는 잔류분석용을 사용하였다. 농축기는 Eyela NE-1000SW (일본)를 사용하였고, 농산물 시료는 호모게나이저(IKA, Ultra-Turrax T-25, 미국)를 이용하여 마쇄 및 균질화 하였다.

## 농산물 시료

시험 대상 농산물은 식품의 농약 잔류허용기준(식품의약 품안전처, 2014) 중 amisulbrom의 사용이 등록되어있는 농

Fig. 1. Chemical structure of amisulbrom.

Table 1. HPLC operating parameters for the analysis of amisulbrom

HPLC system	Agilent 1200 HPLC system
Column	YMC-Pack Pro $C_{18}$ RS (4.6 × 250 mm, 5 $\mu$ m)
Column Temp.	40°C
Mobile phase	Water:acetonitrile (20/80, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Wavelength	UV 255 nm
Injection vol.	20 μL

산물을 분석대상으로 하였으며, Codex의 잔류분석법 대상 대표 농산물군(Codex, 2003)과 국내 소비량을 감안하여 곡류는 현미, 서류는 감자, 채소류는 고추 및 배추, 과일류에 서는 사과를 대표시료로 선정하였다. 현미, 감자, 고추, 배추 및 사과의 무농약 시료는 지역 대형마트에서 유기농 인증시료를 구입한 후 식품공전 상 검체 처리방법(식품의약품안전청, 2012)에 따라 전처리하여 사용하였다. 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인하였다.

## HPLC-UVD/MS 기기분석 조건

Amisulbrom의 잔류 분석에는 Agilent (미국) 1200 series HPLC를 이용하였고, 분리용 컬럼은 YMC-Pack Pro  $C_{18}$  RS  $(4.6\times250~\text{mm},~5~\mu\text{m})$ 를 사용하였다. 잔류분의 재확인을 위한 LC/MS 분석에는 Agilent (미국) 6110 Quardrupole LC/MS를 사용하였다. 각각의 자세한 분석조건은 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

#### 표준검량 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

Amisulbrom의 stock solution을 희석하여 0.05-10 mg/L의 농도가 되도록 농도별 표준용액을 조제하고, 각  $20 \mu \text{L}$ 를 HPLC에 주입하여 분석한 peak의 면적을 기준으로 표준 검량선을 작성하였다. 또한 분석기기의 재현성(reproducibility)을 검정하기 위하여 0.5 mg/L의 amisulbrom 표준용액을 HPLC에 15번 연속 주입, 크로마토그램 상의 retention time (Rt) 및 peak 면적의 변이를 비교 평가하였다.

분석법의 정량한계는 무농약 농산물 시료에서 간섭물질이

**Table 2.** LC/MS operating parameters for the confirmation of amisulbrom

annsarorom	
LC/MS system	Agilent 6110 Quardrupole LC/MS
Column	YMC-Pack Pro $C_{18}$ RS (4.6 × 250 mm, 5 $\mu$ m)
Column Temp.	40°C
Mobile phase	10 mM ammonium acetate:acetonitrile (20/80, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection vol.	$10~\mu L$
Ionization	ESI, positive-ion mode
Drying gas	N <sub>2</sub> , 12.0 L/min
Gas Temp.	350°C
Capillary voltage	$3.0\mathrm{kV}$
Mass range (m/z)	100-500

존재하지 않음을 확인한 후, 분석기기의 정량한계와 시료량 및 분석과정 중의 농축배율을 계산하여 아래의 계산식에 의 해 산출하였으며, 동일 수준으로 amisulbrom을 처리한 회수 율 시험으로 재확인하였다.

## 시료 추출 및 분배

농산물 시료 25 g에 acetonitrile 100 mL를 가하고(현미시 료의 경우는 추출 전 20 mL의 증류수를 가한 후 30분간 방 치하여 미리 습윤화함.) 호모게나이저 상에서 2분간 고속 마 쇄(12,000 rpm), 추출하였다. 추출물을 여과지(Toyo No. 6, 일본)가 장착된 Büchner funnel 상에서 여과하고 시료 및 호모게나이저 컵을 여분의 acetonitrile 50 mL로 씻어 앞서 의 여과액과 합하였다. 합친 추출액을 1L 용량의 분액여두 에 옮기고 포화식염수 50 mL와 증류수 450 mL를 첨가한 뒤 dichloromethane으로 50 mL씩 2회 분배 추출하였다. 합 친 dichloromethane 추출액을 무수 sodium sulfate에 통과시 켜 탈수한 후 40℃에서 감압 농축, 건고하였다. 현미를 제외 한 시료의 잔류물은 n-hexane 10 mL에 재용해하여 Florisil 흡착 크로마토그래피에 직접 공시하였다. 현미 시료의 경우 잔류물을 미리 acetonitrile을 포화시킨 n-hexane 40 mL에 재용해하여 250 mL 용량의 분액여두에 옮기고 미리 nhexane을 포화시킨 acetonitrile 40 mL씩으로 2회 분배 추출 하였다. 합친 acetonitrile 추출액을 40°C에서 감압 농축, 건 고하고 잔류물을 n-hexane 10 mL에 재용해하여 Florisil 흡 착 크로마토그래피에 공시하였다.

# Florisil 흡착 크로마토그래피

내경 1.5 cm, 길이 40 cm의 유리컬럼에 활성화시킨 Florisil 10 g을 건식 충전한 후, 3 g의 무수 sodium sulfate를 그 위

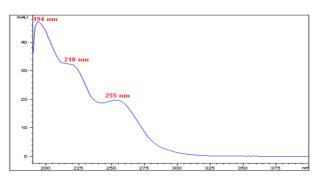


Fig. 2. UV absorption spectrum of amisulbrom.

에 첨가하였다. 컬럼에 *n*-hexane 50 mL를 가하여 상단에 소량의 *n*-hexane이 남을 정도로 유출시켜 버린 후 *n*-hexane 10 mL에 녹인 시료 용액을 가하여 약 3 mL/min의 유속으로 유출시켰다. 충전제 표면이 노출되기 직전 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액(95/5, v/v) 100 mL를 용출시켜 버린 후 재차 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액(85/15, v/v) 150 mL를 용출시켜 받았다. Amisulbrom이 용출된 분획은 40°C에서 감압 농축, 건고하고 잔류물을 water/acetonitrile (20/80, v/v) 10 mL에 재용해하여 HPLC로 분석하였다.

## 대표 농산물에 대한 amisulbrom의 회수율 검정

본 연구에서 확립한 amisulbrom 잔류분석법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위하여 실제 농산물 시료에 대한 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 마쇄한 각 대표 무농약 농산물 시료 25 g에 LOQ, LOQ의 10배 및 50배에 해당하는 amisulbrom 표준용액을 각각 3반복으로 처리한 다음 상기 분석과정을 수행하여 회수율과 분석오차를 측정하였다.

# 결과 및 고찰

#### HPLC 분석조건의 확립

Amisulbrom의 최적 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 acetonitrile에 용해한 5 mg/L의 표준품을 on-line HPLC/DAD를 이용하여 190-400 nm 범위에서 최대흡수파장(λ max)을 조사하였다. 흡수파장은 194 nm, 218 nm 및 255 nm에서 관찰되었으며, 흡광계수는 194 nm, 218 nm 및 255 nm 순으로 낮아졌다(Fig. 2). Amisulbrom의 흡수파장 중 194 및 218 nm 에서는 흡광계수가 높아 분석감도는 높게 관찰되나시료 중 함께 추출되는 성분들도 이러한 짧은 파장을 대부분 흡수할 것으로 예상되었다. 따라서 시료 추출물에 의한 간섭 정도가 상대적으로 낮아 분석의 선택성이 우수할 것으로 판단되는 장파장의 255 nm를 검출파장으로 설정하였다. HPLC에서 분리용 컬럼은 C<sub>18</sub>계열의 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> RS (4.6 × 250 mm, 5 μm)를 이용하였고, 이동상으로는 amisulbrom이 해리하지 않는 비극성 화합물임을 감안하여

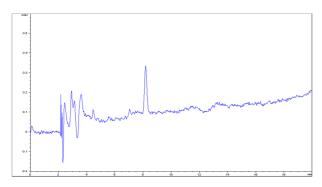


Fig. 3. Chromatogram of amisulbrom standard solution (20  $\mu$ L of 0.1 mg/L in acetonitrile).

acetonitrile 수용액을 사용하였다. 이동상 중 acetonitrile의 농도를 달리하여 머무름시간 및 peak의 이론단수 등을 검토한 결과, 등용매 용리(isocratic elution) 조건에서 water/acetonitrile (20/80, v/v) 혼합용액이 머무름 시간과 분리도 측면에서 가장 적합한 양상을 나타내었으며(Fig. 3), 이때 amisulbrom의 머무름시간은 8.2분이었다. 분리능과 감도를 증대시키기 위하여 기울기 용리(gradient elution)를 사용할수도 있으나 이러한 경우 분석시간이 매우 길어지며 재현성이 등용매 용리 조건에 비하여 열등한 단점이 있다. 본 분석법의 개발 목적은 시료 입수 후 단시간 내에 분석작업이 수행되어야 하는 일상적 잔류 분석용이므로 분석법의 안정성측면에서 보다 유리한 등용매 용리 조건을 선정하였다.

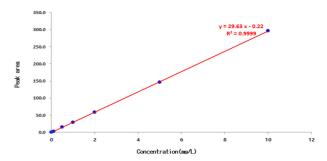
기기분석 시 검출한계는 크로마토그램에서 peak로 검출 할 수 있는 한계농도를 의미하는데 크로마토그램 상에서 S/ N (signal/noise)비가 3이상을 나타내는 성분의 농도로 정의 되나 신뢰성이 떨어지므로 검출 유무만을 판정하며 수치화 는 어렵다. 한편, 정량한계는 크로마토그램의 해석 시 신뢰 성이 확보되어 분석결과를 수치화할 수 있는 한계농도로써, 크로마토그램 상에서 검출된 peak의 S/N의 비가 10 이상(검 출한계의 3배 이상)을 나타내는 성분의 농도를 의미한다 (Fong 등, 1999; Miller, 2005). Table 1의 HPLC 조건에서 amisulbrom 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과 기 기상의 정량한계(S/N≥10)는 2 ng 수준이었다. 한편, 기기 분석의 안정성 평가를 위해 0.5 mg/kg 농도의 표준품을 15 번 반복 주입 분석하여 머무름시간 및 peak 면적의 변이계 수(CV, %)를 조사하여 재현성 평가를 실시한 결과, 두 크로 마토그래피 척도 모두에서 최대 2.7% 미만의 오차를 나타 내어 기기 분석 시 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 3).

한편, amisulbrom의 농도별 표준용액(0.05-10 mg/L) 20  $\mu$ L를 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은  $y=29.63x-0.22~(R^2=0.9999^{**})$ 로 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 4). 즉, amisulbrom은 기기정량한계인 2 ng에서부터 그 100배인 200 ng까지의 표준검량선에 대한 회귀계수

**Table 3.** Reproducibility of peak area and retention time of amisulbrom in HPLC

Parameter	Retention time (min)	Peak Area (mAU)
Minimum	8.243	13.5
Maximum	8.324	14.9
Mean	8.281	14.5
$SD^{a)}$	0.02	0.39
CV <sup>b)</sup> (%)	0.30	2.68

a)standard deviation, b)coefficient of variance.



**Fig. 4.** Calibration curve of amisulbrom in HPLC.

가  $R^2$ = 0.99 이상으로 정량의 직선성이 검정되었으므로 비교적 넓은 농도 범위의 시료 중 잔류량을 비례적으로 산출하는 것이 가능하였다.

# 시료 추출 및 분배과정의 확립

농산물 시료로부터 amisulbrom 성분을 추출하기 위한 용 매로는 acetonitrile을 사용하였다. Acetonitrile은 비극성 농 약의 추출에 보편적으로 사용되는 표준적 용매로써 이미 많 은 연구자들에 의하여 농약 추출에 그 효율과 재현성이 인 정된 바 있다. 농산물 추출액으로부터 대상 성분과 함께 추 출되는 방해물질을 1차적으로 제거하기 위한 조정제법으로 는 액-액 분배법을 사용하였다. 즉, 수용성 유기용매 추출액 을 다량의 포화식염수/증류수로 희석한 후 직접 비극성 용 매로 분배 추출하는 방법을 사용하였는데, 이는 US FDA법 이나 AOAC법에서 중간-비극성 농약 성분에 대하여 보편적 으로 사용되며(AOAC, 2000; Lee 등, 2008), 번거로운 추출 액의 농축과정을 생략할 수 있는 장점이 있다. 분배 용매로 n-hexane, dichloromethane/n-hexane 혼합액, dichloromethane 등 4종을 공시, 대상 성분의 분배효율을 조사하였다(Table 4). 대상 성분의 액-액 분배조건에 따른 분배효율을 조사한 결과 n-hexane 용액 100 mL로 분획하였을 때 amisulbrom 의 회수율은 89.4%수준이었으며, dichloromethane/n-hexane 혼합액(20/80, v/v) 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 92.6% 수준, dichloromethane/n-hexane 혼합액(80/20, v/v) 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 92.7%, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 95.2%를 나 타내어 분배용매 IV의 액-액 분배조건을 amisulbrom의 분배

Table 4. Efficiencies of liquid-liquid partition of crude extract by four different solvents for amisulbrom

Compound				
Compound	Partition I <sup>b)</sup>	Partition II	Partition III	Partition IV
Amisulbrom	$89.4 \pm 0.2$	92.6 ± 1.2	$92.7 \pm 2.3$	$95.2 \pm 0.6$

a) Mean values of triplicate samples.

**Table 5.** Efficiencies of *n*-hexane/acetonitrile partition for amisulbrom

Compound —	Recover	y (%) a)
	Partition b)	Partition
Amisulbrom	$101.7 \pm 1.0$	$102.4 \pm 1.2$

a) Mean values of triplicate samples.

용매로 선정하였다. Dichloromethane 액-액 분배과정에 의 하여 시료 중에 포함된 상당량의 비극성 및 기타 방해물질 이 제거될 것으로 기대되나, 유지 성분은 dichloromethane 층으로 대상 성분과 함께 분배되기 때문에 제거되지 않는다. 이러한 유지 성분은 기기분석 시 치명적 간섭 또는 분리용 column 및 검출기의 급격한 열화를 초래하므로 반드시 제거 해야 할 간섭물질이다. 대상 시료 중 현미는 유지가 약 1-3% 수준 함유되어 있는 시료이므로 이러한 유지 제거를 위 하여 n-hexane/acetonitrile 분배법을 추가로 공시하였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000). Table 5에 나타낸 바와 같이 미 리 n-hexane으로 포화시킨 acetonitrile로 2회 분배하였을 때. amisulbrom의 전량 회수가 가능하였고, 3회 분배를 수행하 여도 회수율이 크게 변하지 않는 양상을 나타내었으므로, 유지 및 비극성 간섭물질의 제거를 위한 n-hexane/acetonitrile 분배법은 분배조건 I로 설정하였다. 한편 유지 함량이 0.1-0.4%로써 비유지 시료로 분류되는 감자, 고추, 배추 및 사과 에서는 제거되는 비극성 유지 성분 및 불순물의 양이 매우 작고 크로마토그램 상에서 그 정제 효과 또한 미미하였으므 로 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 생략하였다.

# Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건의 최적화

농산물에 함유된 amisulbrom의 분석 시 상기 액-액 분배

과정 및 n-hexane/acetonitrile 분배과정을 통해 상당량의 불 순물 및 비극성 간섭물질들이 제거되었을 것으로 판단되나, 농산물에 따라 시료로부터 유래되는 다양한 기타 불순물이 존재하므로, 추가적인 정제과정이 필요할 것으로 판단되어 흡착 크로마토그래피에 의한 정제법을 검토하였다. 흡착 크 로마토그래피는 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 방법 으로, 흡착제로는 silica gel, Florisil 및 alumina가 많이 사 용된다. 이 중 Florisil은 색소와 지방의 제거가 뛰어나 미국 의 FDA (1999)나 AOAC (2000) 등에서 가장 많이 사용하 는 방법이다. 본 연구에서도 amisulbrom의 극성을 고려하여 Florisil을 흡착제로 선정 하였으며, 용매의 극성 조절을 위 해 n-hexane/ethyl acetate 혼합용액의 용매체계를 사용하여 최적화하고자 하였다(Table 6). Florisil 흡착크로마토그래피 용 용매의 다양한 극성 조절을 이용하여 amisulbrom의 회 수율을 조사한 결과, n-hexane/ethyl acetate 혼합액(95/5, v/ v) 100 mL로 pre-washing한 후, n-hexane/ethyl acetate 혼합 액(85/15, v/v) 150 mL로 용출할 경우 amisulbrom 성분의 회수율이 101.1%로 검토된 용매체계 중 가장 우수한 회수 율을 나타내었으므로 Florisil 흡착 크로마토그래피법을 이 용하여 간섭물질 제거를 위한 추가적인 정제법으로 확립하 였다.

#### 농산물 시료 중 amisulbrom의 분석정량한계 및 회수율

본 연구에서 확립한 시료 추출 및 정제, 그리고 기기분석 과정을 무농약 농산물 시료에 적용한 결과는 Fig. 5와 같다. 무농약 농산물의 최종 시료용액에서 대상농약과 동일한 머무름 시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였고, 분석기기의 정량한계(LOQ)와 시료량, 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 분석법의 정량한계를 산출하였다. 본 연구에서 무농약 농산물 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음

**Table 6.** Elution profiles of amisulbrom on Florisil column

Election colvent (v/v)		Rec	covery (%) a)	
Elution solvent (v/v) -	0 - 50 mL	51 - 100 mL	101 - 150 mL	Total
95 : 5 ( <i>n</i> -hexane : EtOAc)	0.0	0.0	0.9	0.9
90 : 10 <sup>b)</sup> ( <i>n</i> -hexane : EtOAc)	24.8	62.2	12.2	99.2
85 : 15 <sup>b)</sup> ( <i>n</i> -hexane : EtOAc)	83.3	17.6	0.3	101.1

a) 10 g of activated Florisil (60 - 100 mesh) was dry packed.

b) Partition mixture: 150 mL acetonitrile + 50 mL saturated NaCl + 450 mL distilled water.

I, 100 mL *n*-hexane, II, 100 mL dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v), III, 100 mL dichloromethane/*n*-hexane (80/20, v/v), IV, 50 mL dichloromethane (× 2 times).

<sup>&</sup>lt;sup>b)</sup> Partition mixture: 40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile. I, 40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (× 2 times), II, 40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (× 3 times).

b) Pre-washed with 100 mL of *n*-hexane/ethyl acetate (95/5, v/v).

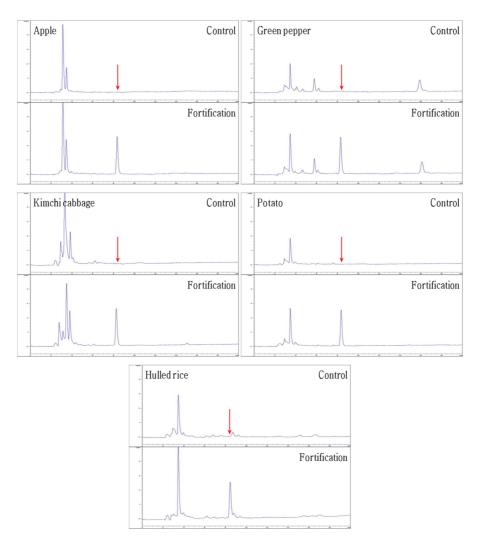


Fig. 5. Typical HPLC chromatograms of agricultural commodity extracts for the analysis of amisulbrom, fortified at ten-fold of LOQ.

을 확인한 후 산출된 amisulbrom의 정량한계는 0.04 mg/kg 이었으며, 국제기준인 Codex (Codex Alimentarius Commission, 2003) 및 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(Lee, 2012) 에서 권장하는 잔류농약분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또 는 허용기준의 1/2 이하의 정량한계 기준에 적합하였다. 각 각의 농산물 무처리 시료에 amisulbrom 표준용액을 정량한 계, 정량한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가하고, 상 기 확립된 분석방법에 의하여 대표 농산물에 3반복으로 회 수율을 조사한 결과, 정량한계 수준에서는 87.6-105.6%, 정 량한계 10배 수준에서는 85.3-98.6%, 정량한계 50배 수준에 서는 91.9-101.5%의 양호한 회수율을 보였고, 재현성도 양 호하여 분석오차는 최대 6.3%로 조사되었다. 따라서, 처리 수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수 율 70-120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하였다 (Table 7). 이상의 결과에서 볼 때, 본 연구에서 확립된 amisulbrom의 분석법은 국내외 농산물의 잔류농약 분석 및 검사에 충분히 적용 가능함을 확인하였다.

## LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

한편, 개발된 분석법의 신뢰성을 확보하기 위하여 LC/MS 에 의한 재확인 과정을 추가하였다. LC/MS 분석 시 분석대 상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다(Kwon 등, 2008). Amisulbrom의 이온화를 향상시키기 위하여 HPLC 분석에 이용된 이동상 용매 중 증류수에 10 mM ammonium acetate를 첨가하여 분석을 실시하였고, Fig. 6과 7에 나타낸 TIC (total-ion chromatogram)와 mass spectrum으로부터 amisulbrom은 ESI (electrospray ionization) positive ion 조건에서 용이하 게 protonation 되어 [M+H]<sup>+</sup>를 형성함을 알 수 있었다 (Ardrey, 2003, McLafferty, 1993). 즉 amisulbrom은 분자식 이 C<sub>13</sub>H<sub>13</sub> BrFN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>이므로 평균분자량이 466.31이며, exact mass는 464.96이다. Amisulbrom 분자를 구성하는 원 자들의 동위원소 비율, 특히 <sup>79</sup>Br와 <sup>81</sup>Br의 비 100:97.3이 반 영되므로 [M+H]<sup>+</sup>와 [M+2+H]<sup>+</sup>의 비는 100:99.5로 나타난

	Table 7.	Recoveries	of amis	sulbrom ir	n different cro	p samples
--	----------	------------	---------	------------	-----------------	-----------

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery (%) a)	CV (%)	LOQ (mg/kg)
	0.04	$101.2 \pm 3.6$	3.6	
Apple	0.4	$98.6 \pm 0.3$	0.3	0.04
	2.0	$98.2 \pm 2.0$	2.0	
	0.04	$90.1 \pm 1.9$	2.1	
Green pepper	0.4	$96.5 \pm 0.7$	0.7	0.04
	2.0	$101.5 \pm 3.2$	3.2	
	0.04	$93.1 \pm 3.4$	3.7	
Kimchi cabbage	0.4	$92.5 \pm 5.8$	6.3	0.04
	2.0	$96.6 \pm 0.9$	0.9	
	0.04	$87.6 \pm 3.4$	3.8	
Potato	0.4	$94.4 \pm 2.9$	3.1	0.04
	2.0	$95.8 \pm 0.3$	0.3	
	0.04	$105.6 \pm 3.8$	3.6	
Hulled rice	0.4	$85.3 \pm 1.0$	1.1	0.04
	2.0	$91.9 \pm 5.5$	6.0	

<sup>&</sup>lt;sup>a)</sup> Mean values of triplicate samples with standard deviations.

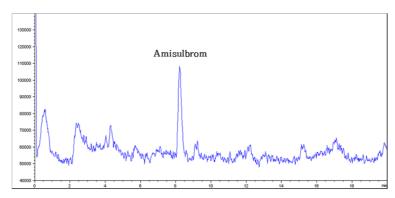
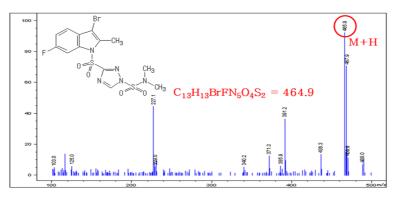


Fig. 6. Total-ion chromatogram (TIC) of amisulbrom in LC/MS.



**Fig. 7.** ESI(+) mass spectrum of amisulbrom.

다. Fig. 7의 ESI(+) mass spectrum은 이러한 동위원소 분포비율을 잘 반영하고 있으므로 [M+H]<sup>+</sup> 이온을 정확히 확인할 수 있었다. 본 연구에서 [M+H]<sup>+</sup> 피크가 base 피크로 나타나므로 selected-ion monitoring (SIM)용 ion으로는 [M+H]<sup>+</sup>인 m/z = 465.9 이온만을 이용하여도 충분한 정성적 확인이

가능하였다.

Fig. 8은 본 실험에 사용된 대표적 농산물 시료 중 현미를 대상으로 amisulbrom의 잔류분을 재확인한 selected-ion monitoring (SIM) chromatogram이며, 본 실험에서 사용된 모든 농산물의 무처리 시료에서는 대상 농약성분의 peak가

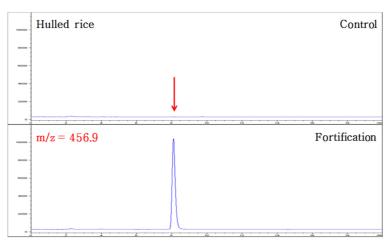


Fig. 8. SIM chromatograms of hulled rice extract for the confirmation of amisulbrom, fortified at LOQ.

전혀 관찰되지 않았고, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 정확하게 amisulbrom의 잔류분만을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC-UVD를 이용한 정량법과 더불어 amisulbrom 잔류분의 추가적 정성분석법으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

# 결 론

HPLC-UVD/MS 분석법을 이용하여 농산물 시료에서 sulfonamide계 살균제인 amisulbrom의 잔류 분석법을 확립 하였다. 농산물 시료에 acetonitrile을 가하여 추출된 amisulbrom의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 Florisil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다.  $C_{18}$  컬럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으 며, 사과, 고추, 배추, 감자 및 현미를 포함한 5종의 대표 농 산물 중 amisulbrom의 정량한계(LOQ)는 0.04 mg/kg이었다. 5종의 대표 농산물에 대한 회수율은 85.3-105.6%였으며, 농 산물 시료 및 처리수준에 관계없이 10% 미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석기준 이내를 만족하였다. 따라서 본 연구 에서 확립한 sulfonamide계 살균제인 amisulbrom의 잔류분 석법은 재현성, 정밀성, 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에 서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인 과정의 결과를 종합해 볼 때 분석 과정의 편리성 및 신뢰성이 확보된 잔류농약 분석법으로 판 단된다.

# 감사의 글

본 연구 결과 중 일부는 2014년 강원대학교 학술연구조성 비로 수행되었음(관리번호- 220140126).

# **Literature Cited**

AOAC (2000) 'Pesticide and industrial chemical residues, In *Official method of analysis*', 17th ed., pp. 1-88, AOAC International, Arlington, VA, USA.

Ardrey, R, E. (2003) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, pp. 98-122, Wiley, West Sussex, UK.

Codex Alimentarius Commission (2003) Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.

Fong, W. G., H. A. Moye, J. N. Seiber and J. P. Toth (1999) Pesticide Residues in Food: Methods, Technologies, and Regulations, Wiley Interscience. pp. 3-4, 40-44, Canada.

Hwang, K. W., T. W. Kim, J. H. Yoo, B. S. Park and J. K. Moon (2012) Dissipation pattern of amisulbrom in cucumber under greenhouse condition for establishing pre-harvest residue limit, *Korean J. Pestic. Sci.* 16(4):288-293.

Korea Crop Protection Association (2014) *Using guideline of crop protection agents*, pp. 154-156.

Korea food and drug administration (2012) Korea Food Code, pp. 10-4-340-10-4-342.

Kwon, C. H., M. I. Chang, M. H. Im, H. Choi, D. I. Jung, S. C. Lee, J. Y. Yu, Y. D. Lee, J. O. Lee and M. K. Hong (2008) Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *Analytical Sci. & Technoligy*, 21(6):518-525.

Lee, J. H., Y. Keum . Park, C. Kwon, Y. Lee and J. Kim (2008) Dissipation pattern of boscalid in cucumber under green house condition. *Korean Journal of Pesticide Science*, 12:67-73.

Lee, Y. D. (2012) Pesticide Analytical Residues Manual in Food Code, pp. 3, 78-80, NiFDS, Korea.

McLafferty, F. W. and Turecek, F. (1993) *Interpretation of Mass Spectra*, 4th ed., pp. 19-50, University Science Books, Sausalito, CA, USA.

Miller, J. M. (2005) Chromatography: Concepts and Contrasts

(2nd), Wiley Intersciense, p. 286-287, USA, Standardization Administration of the People's Republic.

Ministry of Food and Drug Safety (2014) MRLs for Pesticides in Foods, pp. 150-151.

US EPA (2011) Pesticide Fact Sheet for Amisulbrom.

Washington D.C., 20460.

US FDA (1999) *Pesticide Analytical Manual*, Vol 1: *Multi-residue Methods* (3rd ed.), US Food and Drug Administration, USA.

# HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 Amisulbrom의 잔류분석

안경근 · 김경하 · 김기쁨 · 김민지 · 황영선 · 홍승범 · 이영득 · 정명근\* 강원대학교 생약자원개발학과, '대구대학교 생명환경학부

요 약 HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 중 sulfonamide계 살균제 amisulbrom의 잔류 분석법을 확립하였다. 대표 농산물은 사과, 배추, 고추, 감자 및 현미로 선정하였고, acetonitrile을 가하여 추출된 amisulbrom 성분을 dichloromethane 액-액 분배법과 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 HPLC-UVD/MS 분석대상 시료로 하였다. Amisulbrom의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건을 확립하였으며, 정량한계(LOQ)는 0.04 mg/kg이었다. 각 대표 농산물에 대해 정량한계, 정량한계의 10 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과 모든 처리농도에서 85.3-105.6% 수준을 나타내었으며, 반복 간 변이계수(CV)는 최대 6.3%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 만족한 결과를 도출하였으며, LC/MS SIM을 이용하여 실제 농산물 시료에 적용하여 재확인 하였다. 이상의 결과로 신규 amisulbrom의 HPLC-UVD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용 가능할 것이다.

**색인어** Amisulbrom, HPLC-UVD/MS, 잔류분