

HPLC/UVD를 이용한 농산물 중 cymoxanil의 개별 분석법 확립

김지윤 · 김해나 · 김자영¹ · 김종걸² · 함헌주² · 이영득³ · 허장현*

강원대학교 농업생명과학대학 바이오자원환경학과, ¹크로엔리서치
²친환경농산물안전성센터, ³대구대학교 생명환경학부

Development of Analytical Method for Cymoxanil in Agricultural Commodities using HPLC/UV

Ji-Yoon Kim, Hea-Na Kim, Ja-Young Kim¹, Jong Geol Kim², Hun-Ju Ham², Young-Deuk Lee³ and Jang-Hyun Hur*

Department of Biological Environment, College of Agriculture and Life Sciences,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Croen Research Incorporated, Suwon 443-270, Korea

²Environment Friendly Agricultural Products Safety Center, Chuncheon 200-701, Korea

³Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

(Received on March 7, 2014. Revised on March 14, 2014. Accepted on April 21, 2014)

Abstract In the present study, we developed an official individual analytical method for cymoxanil using HPLC/UV, respectively in different representative crops. Individual analytical methods for these pesticides are not included in the Korea food code. The samples were extracted with acetonitrile, concentrated and partitioned with dichloromethane and saturated sodium chloride solution. For cymoxanil, extracts were concentrated and clean-up through silica gel column chromatography with dichloromethane/acetone (60/40 v/v) and subjected to instrumental analysis. The limit of detection (LOD) for cymoxanil were 0.1 ng and 1 ng respectively and limit of quantitation (LOQ) were 0.02 mg/kg. Recoveries for cymoxanil ranged from 79.6~107.6% respectively, at fortification level of 0.02 mg/kg (LOQ), 0.2 mg/kg (10 LOQ) and 1.0 mg/kg (50 LOQ) and the coefficient of variation (CV) was less than 10%, regardless of sample types. These results were further confirmed with LC/MS. The proposed simultaneous analysis method is reproducible and sensitive enough to determine the residues of cymoxanil in the agricultural commodities. According to the validation data and performance characteristics and high sample throughput, the proposed method is suitable for routine application.

Key words analytical method, Cymoxanil, HPLC/UV, LC/MS

서 론

최근 산업화를 통한 경제 성장으로 소비자의 소득이 증대됨에 따라 식품의 양보다 질을 중요시하게 되었으며, 식품의 안전성이 부각되면서 식품 중 농약의 관리가 필수 사항으로 고려되고 있다(한국작물보호협회, 2010). 농약은 작물을 재배하는 과정에서 병해충 방제를 위한 필수적인

농자재로 농산물의 생산성 증대 및 품질향상에 크게 기여하고 있으나, 생물의 생리작용을 저해하는 근본적으로 독성을 가진 화합물로 인체와 환경생물에 독성학적 위해요인으로 작용할 가능성을 갖고 있다(Lee 등, 2008). 뿐만 아니라 살포된 농약은 환경 조건에 따라 농산물 및 환경 중에 잔류될 가능성이 있어 이에 따른 농약의 잔류 실태 조사 및 관리가 철저하게 이루어져야 하며, 농식품에 대한 안전성을 검증하기 위해 잔류농약분석법이 필수적으로 요구된다.

Cymoxanil [1-(2-cyano-2-methoxyiminoacetyl)-3-ethylurea]은 cyanoacetamide oxime계 살균제로서 미국 E. I. du Pont de

*Corresponding author

Tel: +82-33-257-6441, Fax: +82-33-241-6640

E-mail: jhhur@kangwon.ac.kr

Nemours & Co.에 의해 소개되었으며(Tomlin, 2009), 현재 국내에서는 위, 오이, 양파, 고추(단고추류포함), 감자, 포도, 수박, 토마토(방울토마토 포함), 머루, 배추, 스타티스, 참깨, 멜론, 딸기, 인삼 등의 노균병, 역병, 흰비단병 등을 방제하기 위해 사용하고 있다(한국작물보호협회, 2012).

Cymoxanil의 분석법은 현재 식품공전에 다중농약 다성분 분석법(83번 방법)으로 포함되어있으며, HPLC/UVD 검출기를 사용하고 있다. 2004년 Labfrontier Corporation에서 83번 방법을 개선하여 사과, 배추, 깻잎을 대상작물로 한 회수 실험을 수행하였으며, Xu 등(2006)은 HPLC를 이용하여 cymoxanil을 분석하였으나, 이 둘 분석법은 특정 작물에 대해서만 특화된 분석방법으로 다양한 작물체에 일반적으로 잔류분석을 수행할 수 없다는 단점이 있다. 또한 cymoxanil의 대상성분에 대한 선행연구는 대부분 분석효율에 중점을 둔 다성분 분석을 통한 일부 작물의 모니터링 결과들이거나 특정 작물에 대하여 특화된 분석방법으로, 다양한 작물에 적용하였을 때 유효 회수율 범위를 만족하지 못하거나 일반적인 잔류분석 수행이 용이하지 않는 단점이 있으며, 각 단계에 대한 자세한 연구 내용이 생략되어 있다는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 cymoxanil을 대상으로 다양한 작물에 적용 가능한 표준화된 개별 분석법을 확립하기 위해 대표농산물을 선정하여 정확성 및 정밀성이 확보된 효율적인 전처리 방법과 기기분석법을 확립하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

Cymoxanil 표준품(99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany)은 원제사로부터 구입하여 사용하였고, acetonitrile은 HPLC용, *n*-hexane과 ethyl acetate는 PRA급, acetone, dichloromethane 및 hydrochloric acid는 GR급을 사용하였다. 또한 NaCl과 무수Na₂SO₄은 EP급을 사용하였다. Silica gel (0.063~0.200 mm mesh)을 Merck(Germany)에서 칼럼 크로마토그래피용을 구입하여 130°C에서 5시간 이상 활성화시킨 후 사용하였다. 시료균질기(AM-10, Nissei, Nihonseiki Kaisha Ltd., Japan)와 진탕기(Lab. Companion IS-971R, Jeio Tech, Korea)를 사용하여 전처리하였으며, 진공회전증발농축기(Eyela NE-1001, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)는 추출액의 감압유거 시 사용하였다. 본 연구에 사용한 cymoxanil의 화학구조 및 이화학적 특성은 Table 1과 같다.

대표 농산물 선정

본 연구에서 사용한 대표 농산물은 농약 잔류허용기준(식품의약품안전청, 2012)에 기준이 설정되어 있고(Table 2), 농산물 부류별(곡류: 현미 및 밀, 과일류: 사과 및 감귤, 채소류: 고추 및 배추, 두류/유지작물: 콩, 서류: 감자)(식품의약품안전청, 2007)로 등록상황을 고려하여 대표 농산물을 선정하였다. 따라서 cymoxanil의 분석법확립을 위한 대표 농산물로 현미, 대두, 고추, 감귤, 감자를 선정하였고, 시료는 대형마트에서 유기농 인증시료를 구입하여 사용하였다.

Table 1. Physicochemical properties of cymoxanil

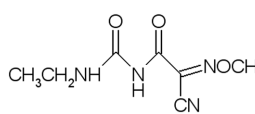
Pesticide	Chemical structure	K _{ow} logP	M.w.	V.p.(mPa)	Solubility
Cymoxanil		3.56 (20°C)	198.2	0.15 (20°C)	In water 890 mg L ⁻¹ (pH5, 20°C), in hexane 0.037, ethyl acetate 28, dichloromethane 133.0 (all in g L ⁻¹ , 20°C)

Table 2. Pesticide maximum residue limits (MRLs) of cymoxanil

Crop	MRL (mg kg ⁻¹)	Crop	MRL (mg kg ⁻¹)
Potato	0.1	Chard	2.0
Green & red pepper (Fresh)	0.5	Melon	0.5
Fresh pepper leaves	3.0	Watermelon	0.1
Strawberry	0.5	Spinach	2.0
Crimson glory vine	0.5	Onion	0.1
Korean cabbage	0.2	Cucumber	0.3
Korean cabbage (Dried)	3.0	Korean melon	0.1
Brassica leafy vegetables	0.5	Tomato	0.5
Sesame seed (Black sesame)	0.2	Grape	0.5
Grape, Crimson glory vine	0.5	Sweet pepper	0.1

표준검량곡선 작성

Cymoxanil의 표준용액은 cymoxanil 표준품을 acetonitrile에 용해시켜 1000 mg L⁻¹가 되도록 하여 stock solution을 조제하였다. 이를 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5 mg L⁻¹의 농도가 되도록 희석한 후 10 µL씩 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준검량곡선을 작성하였다.

기기분석

농산물 중 cymoxanil의 기기분석은 Agilent 1200 series (Agilent, USA)를 사용하였고, 검출기는 자외부흡광광도검출기(Ultraviolet Detector, UVD)를 사용하였다. HPLC 분석 칼럼은 일반적으로 중성의 화합물 분리에 많이 사용되는 역상(reversed phase) column (C18)을 사용하여 분석하였으며, 칼럼 오븐 온도는 40°C로 하여 분석하였다(Table 3). 잔류물의 재확인을 위한 LC/MS의 기기분석조건은 Table 4와 같다.

시료의 추출

대표 농산물 시료를 25 g 씩 정밀히 칭량하여 고추, 감귤, 감자 시료의 경우 acetonitrile 100 mL를 넣은 후 시료균질기를 사용하여 약 3분간 10,000 rpm으로 균질화 하였다. 현미와 대두의 경우 증류수를 각각 20 mL, 40 mL씩 첨가한 후 30분간 방치하여 습윤 시킨 후 acetonitrile 100 mL를 넣어 진탕기로 1시간 동안 shaking하였다. 대두의 경우 시료의 습윤 과정에서 회수율을 보완하기 위한 pH 보정을 위하여 5 N HCl 4 mL를 첨가하였다. 모든 시료를 균질화한 후

여과지가 깔려있는 büchner funnel로 흡인여과 하였으며, 50 mL의 acetonitrile로 용기 및 잔사를 씻어 여과액과 합하였다. 여과액 중 acetonitrile을 진공회전증발농축기를 사용하여 감압유거 하여 분배과정에 사용하였다. 분배과정 후 silica gel 칼럼 정제과정을 수행하여 기기분석 하였다.

분배용매별 분배효율

1) 액-액 분배용매별 분배효율 측정

증류수 40 mL에 10 mg L⁻¹의 cymoxanil의 표준용액 1 mL를 가하고, 포화식염수 50 mL과 증류수 400 mL를 첨가한 후 이를 분액여두에 옮겨 세 가지 분배용매인 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate로 각각 50 mL 씩 두 번, 세 번 분배하였다. 또한 dichloromethane으로 80 mL, 70 mL 두 번 분배 과정을 추가로 수행하였다. 각각의 분배 추출액을 무수Na₂SO₄에 통과시켜 탈수하여, 40°C 이하에서 진공회전증발농축기를 사용하여 감압유거 하였다. 농축잔류물을 acetonitrile로 재용해한 후 HPLC로 기기분석 하여 액-액 분배용매에 따른 분배효율을 비교하였다.

2) *n*-Hexane/acetonitrile 분배 효율성 측정

현미, 대두와 같이 비극인 지용성 물질이 다량 함유되어 있는 농산물의 경우 비극성 유지성분을 제거하기위해 추가적인 분배과정인 *n*-hexane/acetonitrile 분배 효율을 검토하였다. Cymoxanil의 표준용액 10 mg L⁻¹ 1 mL를 acetonitrile로 포화시킨 *n*-hexane 40 mL가 담겨진 분액여두에 첨가하

Table 3. HPLC/UVD operating conditions for cymoxanil

Instrument	Agilent 1200 series (Agilent, USA)
Detector	Ultraviolet Detector (UVD), 254 nm
Column	Phenomenex C18 (250 m × 4.0 mm I.D. × 5 µm, Phenomenex, USA)
Column temperature	40°C
Mobile phase	Acetonitrile : Water = 30 : 70 (v/v),
Flow rate	0.8 mL min. ⁻¹
Injection volume	10 µL

Table 4. LC/MS operating conditions for cymoxanil

Instrument	Shiseido Nanospace SI- LC (Shiseido, USA), TSQ Quantum ultra (Thermo scientific, USA)
Column	Unison UK-C18 (100 m × 2.0 mm I.D. × 3 µm, Imtakt, USA)
Column temperature	40°C
Mobile phase	0.1 Formic acid water : Acetonitrile = 70 : 30
Injection volume	1.0 µL
Ionization	Electro Spray Ionization (ESI) positive mode
Tube lense voltage	55
Mass range (m/z)	100~400

고, *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL씩 2회 분배와 3회 분배 추출한 후 40°C 이하에서 진공회전증발농축기를 사용하여 감압유거 하였다. 농축잔류물을 acetonitrile로 재용해한 후 HPLC로 기기분석 하여 *n*-hexane/acetonitrile 분배에 따른 효율을 비교하였다.

Silical gel 칼럼 정제조건

칼럼 정제과정 중 세척용매를 선정하기 위하여 130°C에서 5시간 이상 활성화시킨 silica gel 10 g 을 내경 15 mm, 길이 30 cm의 유리 칼럼에 건식 충전한 후, 약 3 g의 무수 NaSO₄를 위에 첨가하였다(이하 silica gel 칼럼). 충전된 silica gel 칼럼에 *n*-hexane 50 mL를 통과시켜 활성화시킨 후 *n*-hexane 5 mL에 녹인 검체용액을 가하였다. 그 후 dichloromethane/ethyl acetate = 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 (v/v)의 혼합용액을 50 mL씩 차례로 세 번 용출시켰다. 용출액을 농축시킨 후 acetonitrile로 재용해하여 HPLC로 기기분석 하여 혼합용액의 조성별 용출액에 의한 cymoxanil의 용출경향을 검토하였다.

또한 칼럼 정제과정 중 용출용매를 선정하기 위하여 silica gel 칼럼을 *n*-hexane 50 mL로 활성화시킨 후 *n*-hexane 5 mL에 녹인 검체용액을 가하였다. 그 후 dichloromethane과 ethyl acetate의 혼합용액 중 세척용매로 결정된 혼합용액 100 mL로 칼럼을 세척하고, 칼럼 표면이 노출되기 직전 dichloromethane/acetone = 70/30, 65/35, 60/40 (v/v)의 혼합용액을 50 mL씩 차례로 세 번 용출시켰다. 용출액을 농축시킨 후 acetonitrile로 재용해하여 HPLC로 기기분석 하여 혼합용액의 조성별 용출액에 의한 cymoxanil의 용출경향을 검토하였다.

정량한계(LOQ; Limit of Quantitation)

Cymoxanil의 분석법의 정량한계(LOQ)는 대표 농산물 무처리 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 후 분석기기의 검출한계와 시료량 및 분석 조작 과정 중의 회색배율을 감안하여 아래의 식 (1)에 의하여 산출하였다(식품의약품안전청, 2012).

$$LOQ (mg kg^{-1}) = \frac{[\text{검출한계}(ng) \times \text{기기주입 전 최종시료용액량}(mL)]}{[\text{기기주입량}(\mu L) \times \text{시료량}(g)]} \quad (1)$$

대표 농산물에 대한 분석법 검정

본 연구에서 확립된 cymoxanil의 추출방법 및 정제방법에 대한 잔류분석법과 기기분석법의 적합성과 신뢰성을 검정하기 위해 회수율 시험을 수행하였다. 무처리 시료(현미, 대두, 고추, 감귤, 감자) 25 g에 cymoxanil의 표준용액을 0.02, 0.2 및 1.0 mg kg⁻¹ 수준이 되도록 3수준 3반복으로 처

리하여, 회수율 및 분석오차를 산출하였다

결과 및 고찰

최적의 기기분석 조건

Cymoxanil의 최적의 HPLC 분석과정을 선정하기 위하여 acetonitrile에 조제한 표준품을 이용하여 190~320 nm 범위에서 자외부흡광 과장을 조사하여 최대흡수과장(λ_{max})을 검토하였다(Fig. 1). 그 결과 cymoxanil의 최대흡수과장은 240 nm이었으나, 그 보다 높은 254 nm에서도 높은 감도를 보여 이를 cymoxanil의 분석 검출과장으로 선정하였다. 분석용 HPLC 칼럼은 일반적으로 중성의 화합물 분리에 많이 사용되는 역상(reversed phase) column (C18)을 사용하였으며, 이동상으로는 물과 acetonitrile의 혼합용매를 사용한 결과 acetonitrile의 비율이 높을수록 대상성분의 머무름 시간이 빨라 간섭물질의 영향이 커져 30%의 acetonitrile의 조건에서 0.8 mL min⁻¹의 일정한 유속의 분석하였을 때 가장 양호함 분리 양상을 나타내어 이를 cymoxanil의 분석 조건으로 선정하였다.

검량선의 작성

Cymoxanil의 표준용액(0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5 mg L⁻¹)을 10 μL씩 기기에 주입하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 y = 2.4392x - 0.2751 (R² = 1)로 R² 값은 1로 직선성이 우수하였다(Fig. 2).

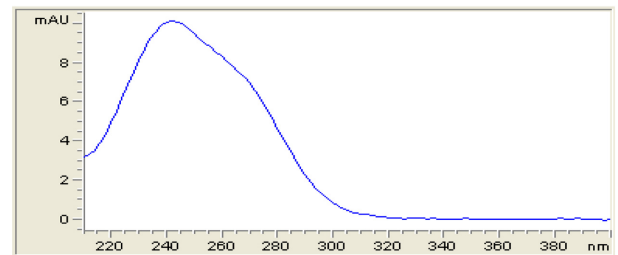


Fig. 1. UV absorption spectrum of cymoxanil.

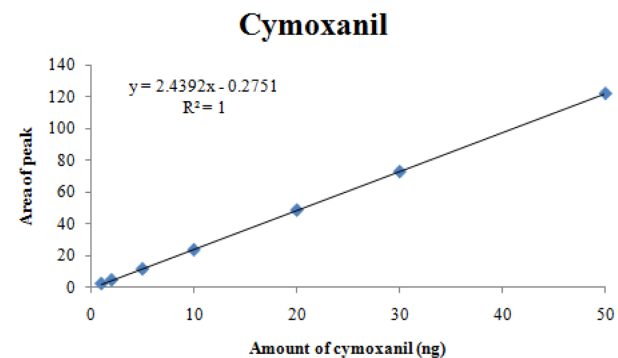


Fig. 2. Calibration curve of cymoxanil.

시료 추출 및 분배

농산물 시료 중 cymoxanil을 추출하기 위한 추출용매로는 농약 잔류분석법에서 널리 사용되고 있는 수용성 유기용매인 acetone, acetonitrile, methanol 중 간섭물질의 방해가 적은 acetonitrile로 선정하였다. 건조시료의 경우 수용성 유기용매에 의한 추출효율이 낮고, 비극성 농약에 대한 흡착성이 강하므로 추출 전 일정량의 수분을 첨가하여 추출효율을 높였다(Kim, 1996). 따라서 농산물 시료 중 수분함량이 낮은 시료인 현미와 대두는 습윤 과정을 수행하였으며, 이때 첨가한 물의 양은 각 20 mL, 40 mL이었다. Cymoxanil의 경우 대두의 추출과정에서 회수율을 보완하기 위한 pH 보정을 위하여 5 N HCl 4 mL를 습윤 과정에 첨가하여 추출하였다.

Acetonitrile 추출액 중 간섭물질을 제거하기 위한 1차적 정제방법인 액-액 분배방법을 사용하였다. 본 연구에서는 acetonitrile 추출액을 농축한 후 포화식염수 50 mL과 증류

수 400 mL를 첨가한 후 액-액 분배용매로 보편적으로 많이 사용되는 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate에 대하여 분배효율을 실험한 결과는 Table 5에 나타내었다. 분배용매 중 dichloromethane 80 mL, 70 mL로 두 번 분배하였을 때 106.9%의 회수율을 보여 이를 분배용매로 선정하였으며, *n*-hexane 50 mL로 두 번 분배하였을 때 대상 성분이 추출되지 않아 *n*-hexane 100 mL로 세척과정을 추가하였다.

Cymoxanil은 액-액 분배과정에 의하여 시료 중에 포함된 상당량의 극성 및 기타 간섭물질이 제거될 것으로 기대되나, 액-액 분배과정 중 *n*-hexane 세척으로도 다량의 비극성 유지성분이 제거되지 않고 dichloromethane 층으로 대상성분과 함께 분배되어 비극성 유지성분을 제거하기 위하여 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 추가하였다. 대상 성분별 *n*-hexane/acetonitrile 분배 효율을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 그 결과 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL씩 2회 분배에서 cymoxanil의 회수율은 100.3%로 충분한 회수율을 보여 이를 *n*-hexane/acetonitrile 분배방법으로 선정하였다. 이 방법은 유지함량이 약 3%인 현미와 약 20%인 대두 시료에 수행하였고, 유지함량이 0.1~0.2%의 비유지 시료인 고추, 감귤, 감자에서는 생략 할 수 있었다(이영득, 2012).

Table 5. Efficiency of liquid-liquid partition for cymoxanil

Solvent	Recovery ¹⁾ (%)		
	Partition ²⁾ I	Partition II	Partition III
<i>n</i> -Hexane	0	0	-
Dichloromethane	95.5	96.4	106.9
Ethyl acetate	84.0	94.5	-

¹⁾Mean values of triplicate samples.

²⁾Partition mixture: 50 mL saturated NaCl solution + 400 mL distilled water

I. Partition solvents (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate) - 50 mL, 50 mL

II. Partition solvents (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate) - 50 mL, 50 mL, 50 mL

III. Partition solvent (dichloromethane) - 80 mL, 70 mL

Table 6. Efficiency of *n*-hexane/acetonitrile partition for cymoxanil

Solvent	Recovery ¹⁾ (%)	
	Partition ²⁾ I	Partition II
Cymoxanil	100.3	103.4

¹⁾Mean values of triplicate samples.

²⁾Partition mixture: 40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile

I. 30 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (× 2 times)

II. 30 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (× 3 times)

Silica gel 칼럼 정제

정제과정은 액-액 분배에서 제거하지 못한 색소 등 상당한 간섭물질을 제거하는 최종 정제과정으로 기기분석 전에서의 필수적으로 이용된다. 정제과정에서 주로 사용하는 흡착제로는 silica gel, florisil, aluminum 및 활성탄 등이 사용된다. 흡착제 중 florisil은 유지 및 색소의 제거가 뛰어나나 본 연구대상 물질인 cymoxanil과 같은 극성농약의 용출 회수율이 낮은 단점이 있어, 다소 흡착력은 낮으나 극성의 화합물을 용출시키기 쉬운 silica gel을 이용하여 칼럼 정제과정을 수행하였다(Kim, 1996; 이영득, 2012).

Silica gel을 사용하여 dichloromethane/ethyl acetate 혼합용매로 용출시켜 회수율을 비교해본 결과 dichloromethane/ethyl acetate = 90/10 (v/v) 혼합용매 150 mL에서 대상성분이 용출되지 않아 이를 세척용매로 선정하였다(Table 7).

용출용매를 선정하기 위하여 세척용매보다 극성이 강한 dichloromethane/acetone 혼합용매를 50 mL씩 차례로 세 번 용출시켜 회수율을 비교해본 결과 dichloromethane/acetone

Table 7. Condition of washing solution for column chromatography

Dichloromethane /ethyl acetate (v/v)	Recovery (%)			
	0 - 50 mL	50 - 100 mL	100 - 150 mL	Total
95 : 5	-	-	-	-
90 : 10	-	-	-	-
85 : 15	-	8.1	19.4	27.5
80 : 20	2.5	7.6	14.7	24.8

Table 8. Condition of elution solution for column chromatography

Dichloromethane /acetone (v/v)	Recovery (%)			
	0 - 50 mL	50 - 100 mL	100 - 150 mL	Total
70 : 30	40.2	33.3	5.0	78.5
65 : 35	55.8	26.7	2.2	80.3
60 : 40	65.3	23.8	-	89.1

= 60/40 (v/v) 혼합용매 100 mL에서 89.1%의 회수율을 보여 이를 용출용매로 사용하여 분석에 적용하였다(Table 8).

분석기기의 검출한계 및 정량한계

분석기기의 검출한계(Limit of Detection, LOD)는 기기분석 시 peak로 검출할 수 있는 한계농도를 의미하는 것으로 분석 대상물질의 검량선 작성 가능한 최소농도 수준에서 최소검출량을 조사한다. 또한 크로마토그램 상에서 S/N (signal/noise)비가 3 이상을 나타내는 성분의 농도를 의미한다. 다양한 농도의 표준 용액을 분석하여 S/N비를 구한 결과, cymoxanil의 검출한계는 1 ng이었다.

정량한계(LOQ)는 검출한계와 시료량 및 분석 조작 과정 중의 희석 배율을 감안하여 산출한 수치로(식 (1)), 연구에 사용한 전체적 분석방법으로 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계를 의미한다. 식품의약품안전청에서는 0.05 mg kg⁻¹ 이하 또는 MRL의 1/2 이하까지 정량한계를 설정하도록 추천하고 있다(이영득, 2012). 식 (1)에 의하여 산출한 cymoxanil의 정량한계는 0.02 mg kg⁻¹수준으로(식 (2)) 잔류분석법기준에 적합하였다.

Cymoxanil의 LOQ (mg kg⁻¹) =

$$\frac{1(\text{ng}) \times 5(\text{mL})}{10(\mu\text{L}) \times 25(\text{g})} = 0.02(\text{mg kg}^{-1}) \quad (2)$$

분석법의 회수율

분석법 검증을 위한 회수율 시험은 대상농약과 동일한 시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 무처리 시료에 일 정량이 농약을 처리하고, 확립된 추출 및 정제의 전체 과정을 거친 후 시료 중에서 농약이 얼마나 회수되는가를 알아 보는 것으로 분석법의 검증을 통해 정확성(평균 회수율%) 과 정밀성(CV%)을 평가할 수 있다.

본 연구에서는 마쇄한 무처리 시료 25 g에 cymoxanil의 표준용액을 0.02, 0.2 및 1.0 mg kg⁻¹ 수준이 되도록 3수준으로 처리한 후, 확립된 분석법으로 3회 반복하여 분석하였다(Table 9). 분석결과 cymoxanil의 회수율은 79.9~107.7%였으며, 분석오차(CV)는 7% 이하로 농산물 시료 종류 및 처리수준에 관계없이 잔류분석 기준인 회수율 70~120% 범위와 공정분석법 기준인 분석오차(CV) 20% 이내를 만족시켰다. 이상 위 결과에서 확립된 cymoxanil의 분석법은 국내·외 농산물의 잔류 농약분석 및 검사에 충분히 적용 가능함을 알 수 있었다(Fig. 3~7).

Table 9. Recovery and LOQ of cymoxanil in crops

Crop	Fortification (mg kg ⁻¹)	Recovery (%) ± SD	CV (%)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Brown rice	0.02	89.2 ± 4.1	4.6	0.02
	0.2	90.8 ± 0.5	0.5	
	1.0	80.1 ± 0.7	0.9	
Soybean	0.02	89.5 ± 2.4	2.6	
	0.2	91.7 ± 3.5	3.8	
	1.0	80.4 ± 0.1	0.2	
Green pepper	0.02	93.9 ± 4.7	5.0	
	0.2	81.5 ± 0.4	0.5	
	1.0	107.7 ± 0.9	0.8	
Mandarin	0.02	92.0 ± 2.4	2.6	
	0.2	85.2 ± 0.8	1.0	
	1.0	103.1 ± 1.4	1.4	
Potato	0.02	93.9 ± 6.3	6.7	
	0.2	80.1 ± 2.3	2.8	
	1.0	79.9 ± 0.4	0.5	

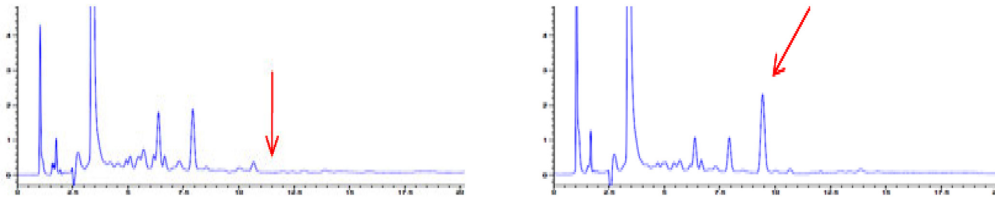


Fig. 3. Chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in brown rice extracts.

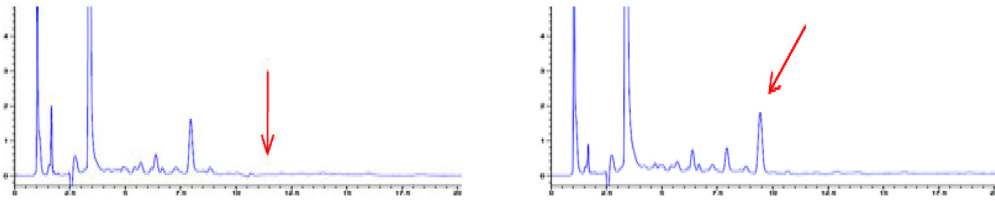


Fig. 4. Chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in soybean extracts.

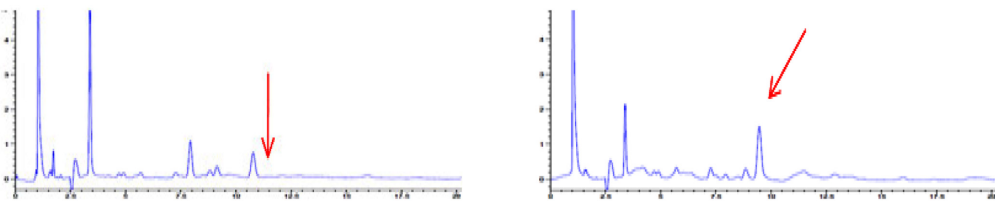


Fig. 5. Chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in green pepper extracts.

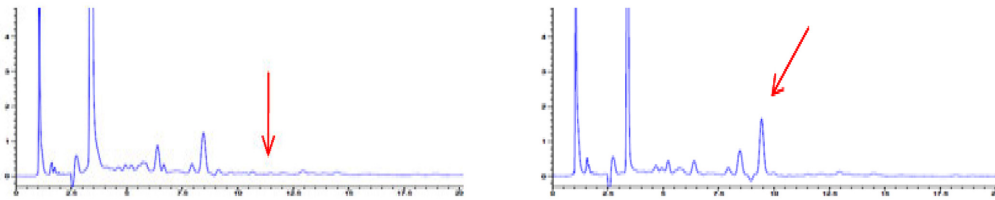


Fig. 6. Chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in mandarin extracts.

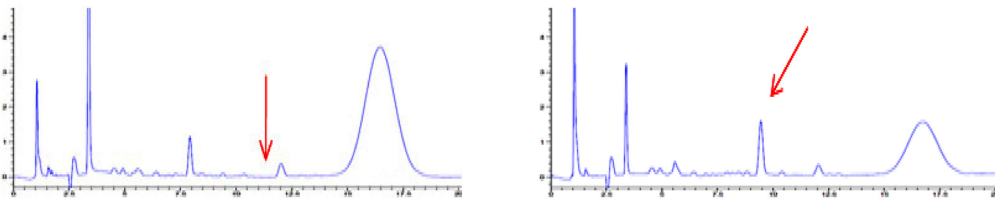


Fig. 7. Chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in potato extracts.

질량분석법을 이용한 잔류분의 재확인

본 연구에서 HPLC/UVD를 통해 개발된 cymoxanil 분석법의 정성적 신뢰성을 확보하기 위하여 LC/MS에 의한 재확인 과정을 추가로 확립하였다. LC/MS ESI positive-ion mode로 분석하여 Fig. 8에 나타낸 바와 같은 total-ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 얻었다. LC/MS를 이용한 cymoxanil의 분석을 위해 199 m/z 를 분석 fragment

ion으로 선정하였으며, SIM을 통해 대표 농산물 시료 중 cymoxanil을 분석한 chromatogram은 Fig. 9~13와 같았다. 본 실험에서 사용된 모든 농산물의 무처리 시료에서는 두 대상 농약성분의 peak가 전혀 관찰되지 않았으며, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 정확하게 cymoxanil 잔류분만을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구에서 사용한 cymoxanil의 경우 LC/MS의

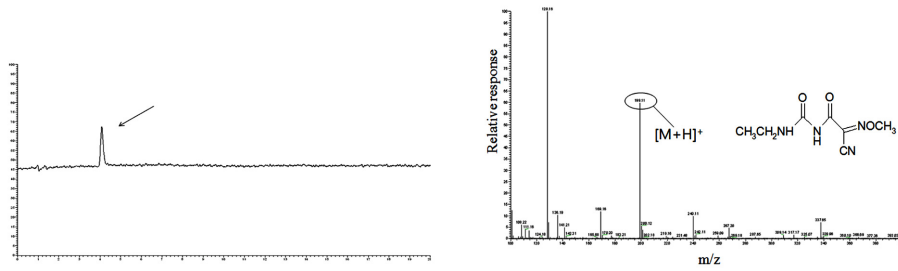


Fig. 8. Total-ion chromatogram (TIC) and mass spectrum of cymoxanil.

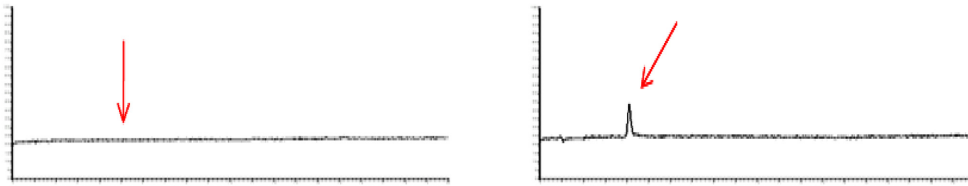


Fig. 9. SIM chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in brown rice extracts.

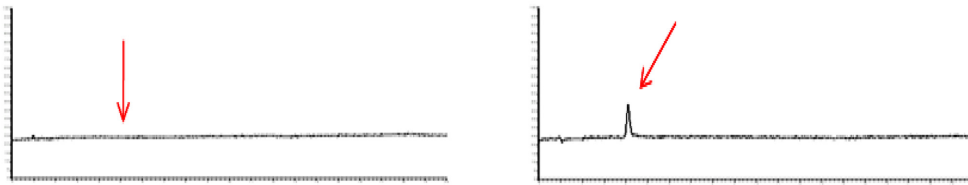


Fig. 10. SIM chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in soybean extracts.

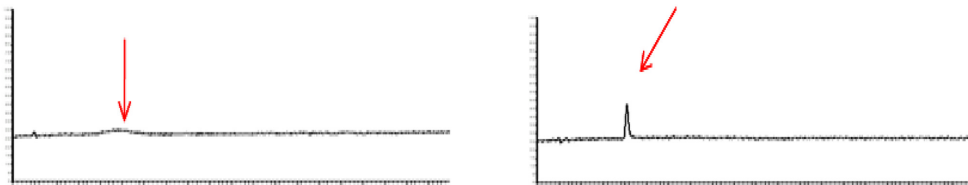


Fig. 11. SIM chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in green pepper extracts.

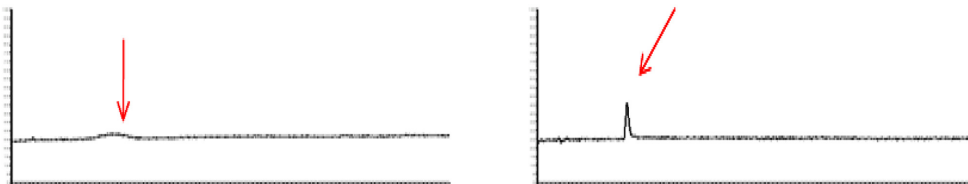


Fig. 12. SIM chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in mandarin extracts.

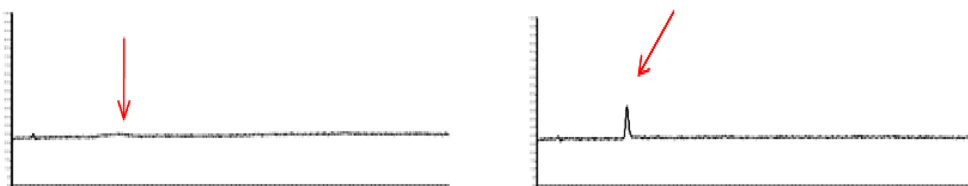


Fig. 13. SIM chromatograms of control and recovery (0.2 mg kg^{-1}) of cymoxanil in potato extracts.

SIM조건을 이용하였을 때 HPLC/UND를 이용한 정량법과 더불어 cymoxanil 잔류분의 추가적 정석분석법으로도 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

결 론

본 연구에서는 우리나라 식품공전에 등재될 cymoxanil의 표준 잔류분석법을 HPLC/UVD를 이용하여 확립하였다. Cymoxanil은 대표 농산물 시료(현미, 대두, 고추, 감귤, 고추)를 acetonitrile을 가하여 추출하고, *n*-hexane으로 세척 후 dichloromethane으로 분배하여 silica gel 흡착 크로마토그래피법으로 정제하였다. Silica gel을 이용한 칼럼 정제방법은 dichloromethane/ethyl acetate (90/10, v/v) 100 mL로 세척한 후, dichloromethane/acetone (60/40, v/v) 100 mL로 용출하는 방법을 이용하였으며, HPLC/UVD로 분석하였다. 기기분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 대표 농산물 중 cymoxanil의 검출한계(LOD)는 1 ng이었고, 정량한계(LOQ)는 0.02 mg kg⁻¹이었다. 대표 농산물 시료에 대한 회수율은 79.6~107.6%였으며, 반복 간 분석오차는 7%미만으로 잔류 분석 기준을 충족하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 cymoxanil의 잔류분석법은 국제적 분석기준을 만족하는 검출한계, 회수율 및 분석오차를 보일 뿐만 아니라, LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인과정을 통해 유통 식품 및 농산물 중 잔류농약의 일상적 검사법인 다성분 분석결과 검출된 잔류성분에 대한 재확인 및 정밀 분석법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전청의 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(09072 잔류약 997)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Literature Cited

- Kim, T. J. (1997) Analysis of multi-residue pesticides. *Analytical Science & Technology*. 9(2):33-60.
- Korea Crop Protection Association (2012) 2012 Guideline of Pesticides Use. Korea Crop Protection Association.
- Korea Crop Protection Association (2010) Life and Pesticides. Korea Crop Protection Association. 31(5):22-25.
- Korea Food and Drug Administration (2009) Korea Food Code. Korea Food and Drug Administration.
- Korea Food and Drug Administration (2012) Pesticide maximum residue limits (MRLs) of Food. Korea Food and Drug Administration
- Labfrontier Corporation (2004) Improvement of multi-residue analysis method for pesticide in foods. Korea Food & Drug Administration. pp. 3-18.
- Lee, J. H., H. W. Park, Y. S. Keum, C. H. Kwon, Y. D. Lee and J. H. Kim (2008) Dissipation pattern of boscalid in cucumber under greenhouse condition. *The Korean Journal of Pesticide Science*. 12(1):67-73.
- Lee, Y. D. (2012) Pesticide Analytical Manual. Korea Food and Drug Administration. pp. 3-104, pp. 771-791.
- Park, J. H., T. K. Kim, C. H. Oh, J. H. Kim, Y. D. Lee and J. E. Kim (2004) Analysis of multiple pesticide residues in apples and pears using Gas-Liquid Chromatography. *Korean Journal of Environmental Agriculture*. 23(3): 148-157.
- Tomlin, C. D. S (2006) *The Pesticide Manual* (15th). British Crop Production Council, UK. pp. 970-971, pp. 275-276.
- Xu, X. M., Wang, W. Q., Zhang, X. F., and W. L. Pan (2006) HPLC analysis of cymoxanil in cymoxanil-mancozeb 72% WP. *PESTICIE- SHENYANG*. 45(10):681-682.

HPLC/UVD를 이용한 농산물 중 cymoxanil의 개별 분석법 확립

김지윤 · 김해나 · 김자영¹ · 함현주² · 이영득³ · 허장현*

강원대학교 농업생명과학대학 바이오자원환경학과, ¹크로엔리서치
²친환경농산물안전성센터, ³대구대학교 생명환경학부

요약 본 연구는 현행 식품공전상 개별 분석법이 설정되어 있지 않은 cymoxanil의 식품 및 농산물의 안전한 관리를 위하여 현미, 대두, 고추, 감귤, 감자를 대표 농산물로 선정하여, cymoxanil에 대한 공정 개별 분석법을 확립하고자 수행되었다. 대표 농산물 시료 중 함유된 cymoxanil은 acetonitrile을 가하여 추출한 후, dichloromethane으로 액-액 분배하였으며, dichloromethane/acetone (60/40, v/v) 혼합액을 이용하여 silica gel 흡착크로마토그래피법으로 정제한 후 HPLC로 분석하였다. Cymoxanil의 검출한계(LOD)는 1 ng이었고, 정량한계(LOQ)는 0.02 mg kg⁻¹이었다. 무처리 시료에 cymoxanil 표준용액을 3 수준(LOQ: 0.02 mg kg⁻¹, 10 × LOQ: 0.2 mg kg⁻¹, 50 × LOQ: 1.0 mg kg⁻¹)으로 처리하여, 3 반복으로 실험한 결과 회수율은 79.6~107.6%이었으며, 반복 간 분석오차(CV)는 10% 미만이었다. LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인 결과와 회수율 결과를 통해 분석과정의 편이성 및 신뢰성이 확보된 공정 분석법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

색인어 Cymoxanil, HPLC/UVD, LC/MS, 분석법