

HPLC-UVD를 이용한 농산물 중 Imazapyr의 공정분석법 확립

장 진¹ · 김희정¹ · 고아영¹ · 이은향¹ · 주윤지¹ · 김진홍² · 장문익^{1*} · 이규식¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, ²대전지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Development of an Official Analytical Method for Determination of Imazapyr in Agricultural Commodities using HPLC-UVD

Jin Jang¹, Heejung Kim¹, Ah-Young Ko¹, Eun-Hyang Lee¹, Yoon Ji Joo¹,
Jinhong Kim², Moon-Ik Chang^{1*} and Gyu-Seek Rhee¹

¹Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Department of Food Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Chungbuk 363-700, Korea

²Hazardous Substances Analysis Division, Center for Food and Drug Analysis, Daejeon regional Korea Food and Drug Administration, Daejeon 302-828, Korea

(Received on January 19, 2015. Revised on March 6, 2015. Accepted on March 18, 2015)

Abstract A chromatographic method for the determination of imazapyr, a non-selective herbicide, in agricultural commodities was developed to use safety control of pesticide residue on crops, and was fully validated as an official method for residue analysis. Agricultural commodities, mandarin (fruit), hulled rice (cereal grains), pepper (vegetables), potato (potatoes) and soybean (beans) were extracted with methanol and partitioned with dichloromethane to remove the interference obtained from sample extracts, adjusting pH to 2.5 by 4N hydrochloric acid. Finally, they were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to UV detector (HPLC-UVD). The developed method had the linearity in the range of test concentrations with coefficients of determination (r^2) more than 0.99. Recovery studies were carried out at three concentration levels (LOQ, 10LOQ, and 50LOQ) performing five replicates at each level. Recoveries were ranged between 72.1 to 108.0%, with relative standard deviations less than 10%. A consistent recovery was determined according to the CODEX guidelines (CAC/GL40, 2003). Finally, LC/MS with selected ion monitoring was also applied to confirm the suspected residues of imazapyr in agricultural samples. This developed method for determination of imazapyr residues in agricultural commodities. can be used as an official method.

Key words residue analysis, imazapyr, HPLC-UVD, LC/MS, agricultural commodities

서 론

Imazapyr[2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinic acid]는 imidazolinone계열 화합물로 2002년에 American Cyanamid에서 개발한 제초제이며(Wang 등, 2006; Santoro 등, 1999; Beardmore 등, 1991) 잡초 내 필수 아미노산의 생성을 억제하여 생장에 필요한 단백질 합성을 억제하는 기작을 통해 방제효과를 나타낸다(Wang 등, 2006;

Miller 등, 1997). 일년생 또는 다년생 잡초, 낙엽수, 덩굴식물, 가시나무 등에 광범위하게 사용(Charles 등, 1995)되며 잡초 발생의 사전 예방제 또는 사후 처리제로도 사용할 수 있다(Navakova, 1994). 특히, 토양 내 잔류성이 길고 이동성도 활발하여 다년생 잡초 방제에 매우 효과적이다(Wang 등, 2006).

국제식품규격위원회(CODEX)는 2012년부터 렌틸콩, 옥수수, 유채씨, 해바라기씨, 밀에 imazapyr에 대한 잔류허용기준(MRLs)을 설정하였다(CAC REP12/PR, 2012; REP13/PR, 2013; REP14/PR, 2014). 현재 imazapyr의 잔류허용기준은 미국(EPA, 2003, 2013, 2014)에서는 대두, 대두씨, 렌

*Corresponding author

Tel: +82-43-719-4204, Fax: +82-43-719-4200
E-mail: 1004@korea.kr

털콩, 옥수수, 유채씨류, 해바라기씨류에, 일본(MHLW, 2014)에서는 밀, 옥수수, 유채씨에 설정되어 있다. 우리나라에서도 수입식품에 사용되는 imazapyr의 안전관리를 위하여 대두에 잔류허용기준을 설정할 예정이다.

잔류허용기준이 설정되면 잔류허용기준의 준수여부에 대한 검증을 위해 농산물 중의 imazapyr에 대한 잔류량 분석이 필요하다. 그간 개발된 imazapyr의 분석방법은 토양, 수질 등 환경시료 중의 imazapyr를 HPLC-UV로 분석한 것이었으며, 각 시료의 특성에 따라 분석의 효율성을 높이기 위해 산, 염기를 이용한 추출 및 정제 방법을 사용하였다. 하지만 이들을 농산물에 곧바로 적용하기에는 어려움이 있으므로 농산물 중 imazapyr의 안전관리를 위한 공정분석법의 개발이 필요한 실정이다(Weiping 등, 1992; Novakova, 1994; Charles 등, 1995; Wang 등, 1995).

본 연구에서는 imazapyr의 물리 화학적 성질을 고려하고 그간 개발된 분석법을 참고하여 농산물에 적용할 수 있는 액체크로마토그래피 자외선흡광검출기(HPLC-UV)를 이용한 공정분석법을 개발하고자 하였다. CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)에 따라 분석법의 직선성, 선택성, 정밀성, 정확성, 재현성을 검증하였으며, 분석결과의 재확인을 위해 액체크로마토그래피 질량분석기(LC/MS)를 이용함으로써 분석법의 신뢰성을 확보하였다. 확립된 분석법은 국내 농산물의 잔류농약 검사에 활용할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Imazapyr (Table 1) 표준품(99.4%)은 BASF (Reg. No. 172267, BAS 693 H)에서 제공받아 사용하였고, acetonitrile (ACN), dichloromethane, methanol, *n*-hexane 등은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. Hydrochloric acid (HCl)와 sodium chloride (NaCl)는 Wako (Osaka, Japan)에서, acetic acid와 formic acid는 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)에서 공급받아 사용하였다. 여과보조제인 celite 545와 anhydrous sodium sulfate는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

농산물 시료

분석에 사용된 농산물 시료는 국내 사용기준 설정을 위한 대두(콩류)와 각 식품군의 대표 작물인 고추(과채류), 감귤(과일류), 현미(곡류), 감자(서류)를 이용하였다. 농산물 시료는 대형마트나 인터넷을 통해 무농약 농산물로 구입하고 균질화한 후 밀봉된 용기에 담아 -50°C 에 보관하였으며, 식품공전의 검체 처리방법에 따라 전처리하여 실험에 사용하였다.

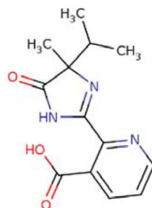
표준용액 제조

Imazapyr 표준품 10.06 mg을 methanol 10 mL에 용해하여 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 표준원액을 조제하고, 이를 methanol/

Table 1. Physicochemical property of imazapyr

Property	Contents
IUPAC name	2-[(<i>RS</i>)4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl]nicotinic acid
CAS No.	81334-34-1
Classification	Herbicide
Molecular formula	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$
Molecular weight	261.3
Melting point	$169\text{-}173^{\circ}\text{C}$ (171°C)
Density	1.34 g/mL
Log P_{ow}	0.11
Vapor pressure	0.013 mPa (25°C)
pK_{a}	$\text{pK}_{\text{a}1}$ 1.6 $\text{pK}_{\text{a}2}$ 3.6 $\text{pK}_{\text{a}3}$ 12.7
Solubility	In water 9.74 g/L (15°C), 11.3 g/L (25°C). In acetone 3.39, DMSO 47.1, hexane 0.00095, methanol 10.5, dichloromethane 8.72, toluene 0.180 (all in g/100 mL).

Chemical structure



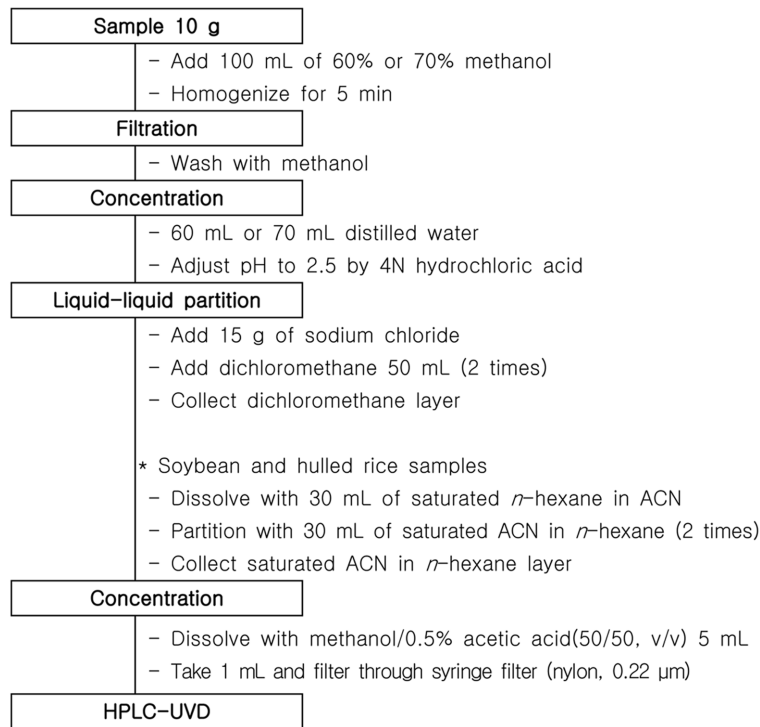


Fig. 1. Flow chart for imazapyr analysis.

0.5% acetic acid (50/50, v/v)로 희석하여 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0 및 10.0 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

추출 및 액-액분배

검체를 분쇄하여 균질화한 후 10 g(콩류 및 곡류 시료는 약 1 kg을 혼합하여 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 10 g, 과일류, 채소류 및 서류 시료는 약 1 kg을 잘게 갈아 혼합한 10 g)을 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고 과일류, 채소류 및 콩류 시료에는 60% methanol 100 mL를 가하고 곡류 및 서류 시료에는 70% methanol 100 mL를 가하여 진탕기에서 5분간 진탕하였다. 진탕한 추출물을 여과지가 깔려 있는 부호너깔때기로 celite 545 10 g을 이용해 흡인여과한 뒤 methanol 30 mL로 잔사 및 용기를 씻어내려 앞의 여액과 합하였다. 합친 여액을 40°C 이하 수욕 상에서 감압하여 methanol을 모두 날려버린 후, 증류수 60 mL(곡류 및 서류 시료의 경우 70 mL)를 더하여 pH 미터기를 이용해 4N HCl를 가하여 pH 2.5가 되도록 하였다. 이를 500 mL 분액깔때기에 옮기고 NaCl 15 g 및 dichloromethane 50 mL를 차례로 가한 후 심하게 흔들여 층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 dichloromethane층을 sodium sulfate에 통과시켜 감압농축플라스크에 받는 과정을 2회 반복하고, 이를 40°C 이하의 수욕 상에서 감압농축 하였다. 지방성 검체(곡류 및 콩류)의 경우 유지성분의 제거를 위해 미리 acetonitrile로 포

화시킨 *n*-hexane 30 mL를 건고물에 가하여 재용해 후 250 mL 용량의 분액 여두에 옮기고 미리 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile 30 mL씩으로 2회 분배 추출하고 감압 농축하였다. 건고된 잔류물은 methanol/0.5% acetic acid(50/50, v/v)를 가하여 최종부피 5 mL가 되게 한 뒤 1 mL를 취해 syringe filter(nylon, 0.22 μm)로 여과한 후 시험용액으로 하였다. 추출 및 분배 방법을 Fig. 1에 흐름도로 간략하게 나타내었다.

기기분석

Imazapyr 분석을 위해 HPLC-UVD를 사용하여 흡광파장 260 nm로 검출하였고, 기기분석 조건은 Table 2에 나타내었다. 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC/MS를 이용하여 재확인하였으며 그 조건은 아래와 같다(Table 3).

분석법 검증

확립된 분석법의 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification) 및 회수율 실험을 통한 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 재현성(repeatability)을 검증하였다. 직선성 확인을 위해 imazapyr 표준용액 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 μg/mL에 대한 각각의 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고 검량선의 상관계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 검출한계 및 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)가 각각 3, 10 이상으로 하였다. 콩류, 채소류, 과일류, 곡류,

Table 2. HPLC-UVD operating conditions for the determination of imazapyr residue

Instrument	HPLC-UVD (Waters Alliance 2695, Waters)
Column	Cadenza CD-C ₁₈ (4.6 mm i.d. × 150 mm, 3.0 μm, Imtakt)
Mobile phase	Acetonitrile / 0.5% acetic acid (12/88, v/v)
Flow	1.0 mL/min
Oven temperature	40°C
Detection	Absorption (260 nm)
Injection volume	20 mL

Table 3. LC/MS confirmative conditions for the determination of imazapyr residue

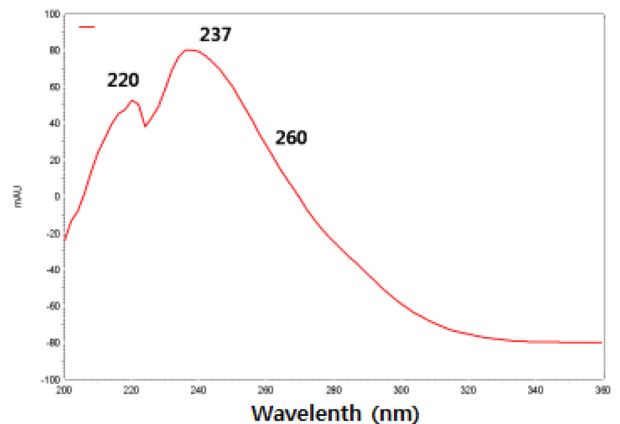
Instrument	LC/MS (Quattro Premier XE, Waters)
Column	MGII C ₁₈ (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm, Shiseido)
Mobile phase	0.1% formic acid in acetonitrile / 0.1% formic acid (20/80, v/v)
Flow	0.25 mL/min
Oven temperature	40°C
Ionization mode	ESI positive-ion mode
Cone voltage	40 V
Injection volume	5 μL

서류의 각 대표농산물인 대두, 고추, 감귤, 현미, 감자의 무처리 시료에 imazapyr 표준용액을 첨가한 후 분석하여 회수율 실험을 진행하였다. 회수율 실험의 처리농도는 정량한계(LOQ), 정량한계의 10배(10LOQ), 정량한계의 50배(50LOQ) 해당하는 농도로 수행하였으며, 각각의 농도 및 시료에 대하여 5반복으로 수행하여 평균 및 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)를 계산하여 분석법의 정확성과 정밀성 및 재현성을 평가하였다. 또한, 대전지방식품의약품안전청과 실험실간 검증을 실시하여 분석법의 유효성을 확인하였다.

결과 및 고찰

기기선정과 기기분석 조건 확립

Imazapyr는 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 0.11인 극성 화합물로 분자내 산(H⁺)해리될 수 있는 carboxylic acid와 pyridine 및 4-oxoimidazole의 질소원자가 포함된 약산성 화합물이다. 증기압이 0.013 mPa (25°C)인 비휘발성 물질이기 때문에 GC(Gas Chromatograph) 분석에는 어려움이 있을 것이므로 예상되어 HPLC(High Pressure Liquid Chromatograph)를 분석기기로 선정하였다. Imazapyr의 측정파장을 선택하기 위해 PDA (Photodiode array) 검출기로 210 nm에서 360 nm까지 스캔한 결과 최대흡수파장(λ_{max})이 237 nm임을 확인하였다(Fig. 2). 하지만 시료추출물을 이용해 최대흡수파장 237 nm에서 분석을 수행한 결과, 시료 중에서 함께 추출된 성분들에 의한 간섭현상이 발생하였기 때문에 peak 감도가 검출한계 수준을 만족하며 간섭물질의 영향이 적은 260 nm를 측정파장으로 최종 선택하였다.

**Fig. 2.** UV absorption spectrum of imazapyr.

Imazapyr는 pH에 따라 존재하는 형태가 다른데, 유기용매와 물을 혼합한 이동상에서는 imazapyr 중 카르복실기의 수소이온이 해리되어 이온상태로 존재하게 된다(Fig. 3(F)). 이온 상태의 imazapyr는 비이온 상태의 imazapyr에 비해 칼럼과 불규칙한 흡착을 일으켜 peak tailing이 발생할 수 있으므로, 이동상용매와 액-액 분배 및 감압 후 재용해 용매에 acetic acid를 첨가하여 이온으로 해리되는 것을 방지하였다(Fig. 3(E)). 칼럼으로는 비극성 화합물의 분리에 적합한 Cadenza CD-C₁₈ (4.6 mm i.d. × 150 mm, 3.0 μm, Imtakt)을 사용하였으며 imazapyr peak의 선택성을 확보하기 위해 acetonitrile과 0.5% acetic acid의 비율을 12/88 (v/v)로 결정하였다. 이때 imazapyr의 머무름 시간은 9분대로 확인하였다.

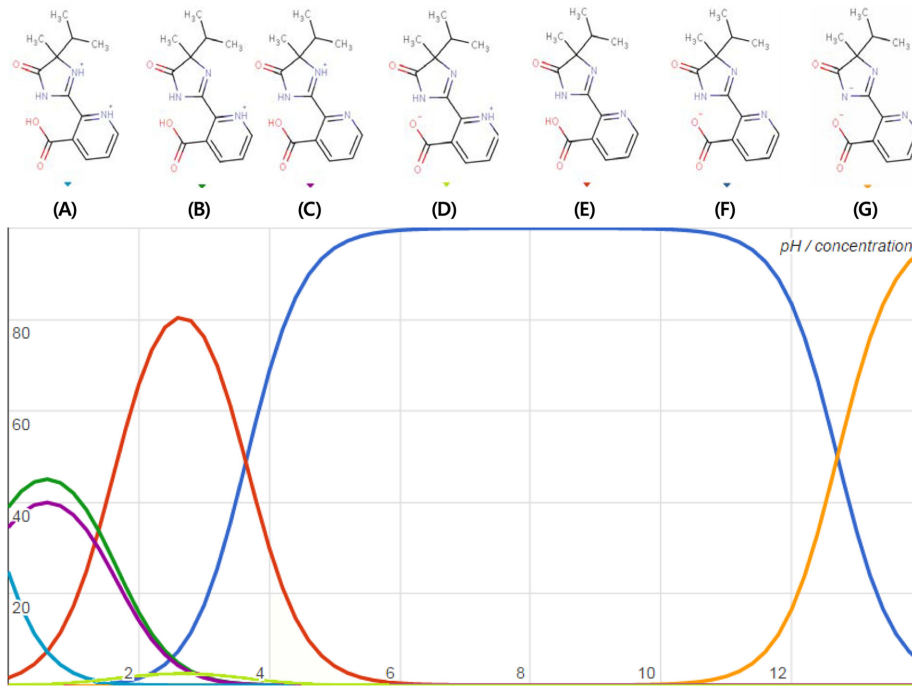


Fig. 3. Species concentrations varies as the difference between the pH and the pK_a varies: (A) AH_4^{2+} , (B) AH_3^+ , (C) AH_3^+ , (D) AH_2 (zwitter ion), (E) AH_2 , (F) AH^- and (G) A^{2-} (pK_{a1} 1.65, pK_{a2} 3.66, pK_{a3} 12.70).

Table 4. Effects of solvent pH on imazapyr liquid-liquid extraction efficiency

pH	Recovery (%)				
	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Soybean	74	83	92	74	82

추출 및 액-액분배 조건 확립

Imazapyr의 최적 추출 용매 선정에 위해 잔류농약 분석에 일반적으로 사용되는 수용성 유기용매인 acetone, acetonitrile, methanol로 imazapyr 및 간섭물질에 대한 추출 효율을 비교하였다. Acetone과 acetonitrile은 각각 40%, 10%의 회수율을 보였으며 methanol은 65%의 회수율을 보였다. 극성인 imazapyr의 성질 때문에 비극성을 띠는 acetone과 acetonitrile보다 methanol에서 추출 효율이 높은 것으로 판단하였고 methanol에서의 추출효율을 개선하기 위해 imazapyr의 물에 대한 높은 용해도를 감안하여 증류수와 methanol을 혼합하여 추출용액으로 사용하였다. 대두, 고추, 감귤 시료는 60% methanol로 현미, 감자 시료는 70% methanol로 imazapyr를 추출하였다. 고추, 감귤시료의 경우 60%와 70% methanol에서 추출효율이 비슷했으나 60% methanol에서 크로마토그램의 imazapyr peak 주변 간섭물질의 영향이 적었기에 이를 추출용매로 선택하였다.

추출액 중의 간섭물질을 제거하기 위해 수용액 상의 극성 추출액을 비극성 용매로 분배하는 액-액 분배를 수행하였다. 비극성 용매에 대한 imazapyr의 분배효율을 높이기 위하여

pH를 조절하여 이온이 해리되는 것을 방지하였다. Imazapyr는 세가지(pK_{a1} 1.65, pK_{a2} 3.66, pK_{a3} 12.70)의 산해리상수(pK_a)를 보이며, 이 중 imazapyr가 이온억압이 되는 pH 1.65-3.66 중 pH 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5에 대해 회수율 결과를 비교하였다(Table 4). 대두를 이용해 각각의 pH에서의 imazapyr의 회수율을 확인하였으며 이때 가장 회수율이 높은 pH 2.5를 액-액 분배 시 pH로 선정하였다(Fig. 3(E)).

Imazapyr의 최적 분배용매 선택을 위해 *n*-hexane, ethyl acetate, dichloromethane를 통한 분배효율을 비교하였다. Imazapyr가 90% 이상 분배추출된 용매는 ethyl acetate와 dichloromethane이었으나 ethyl acetate는 농산물 시료 중의 간섭물질이 많이 추출되어 분석의 어려움이 있었기에 분배용매는 dichloromethane으로 결정하였다. 확립된 추출 및 분배 방법은 간섭물질을 충분히 제거할 수 있어 크로마토그래피를 통한 정제는 생략하였다. 다만, 추출액 중 유지성분을 함유하고 있는 지방성 물질인 대두 및 현미의 경우 추출 시 다량의 유지성분이 동시에 추출되어 농축 후 잔여물이 남게 되기 때문에 유지 및 비극성 성분의 정제를 위해 추가로 *n*-hexane과 acetonitrile을 이용한 분배법을 적용하였다.

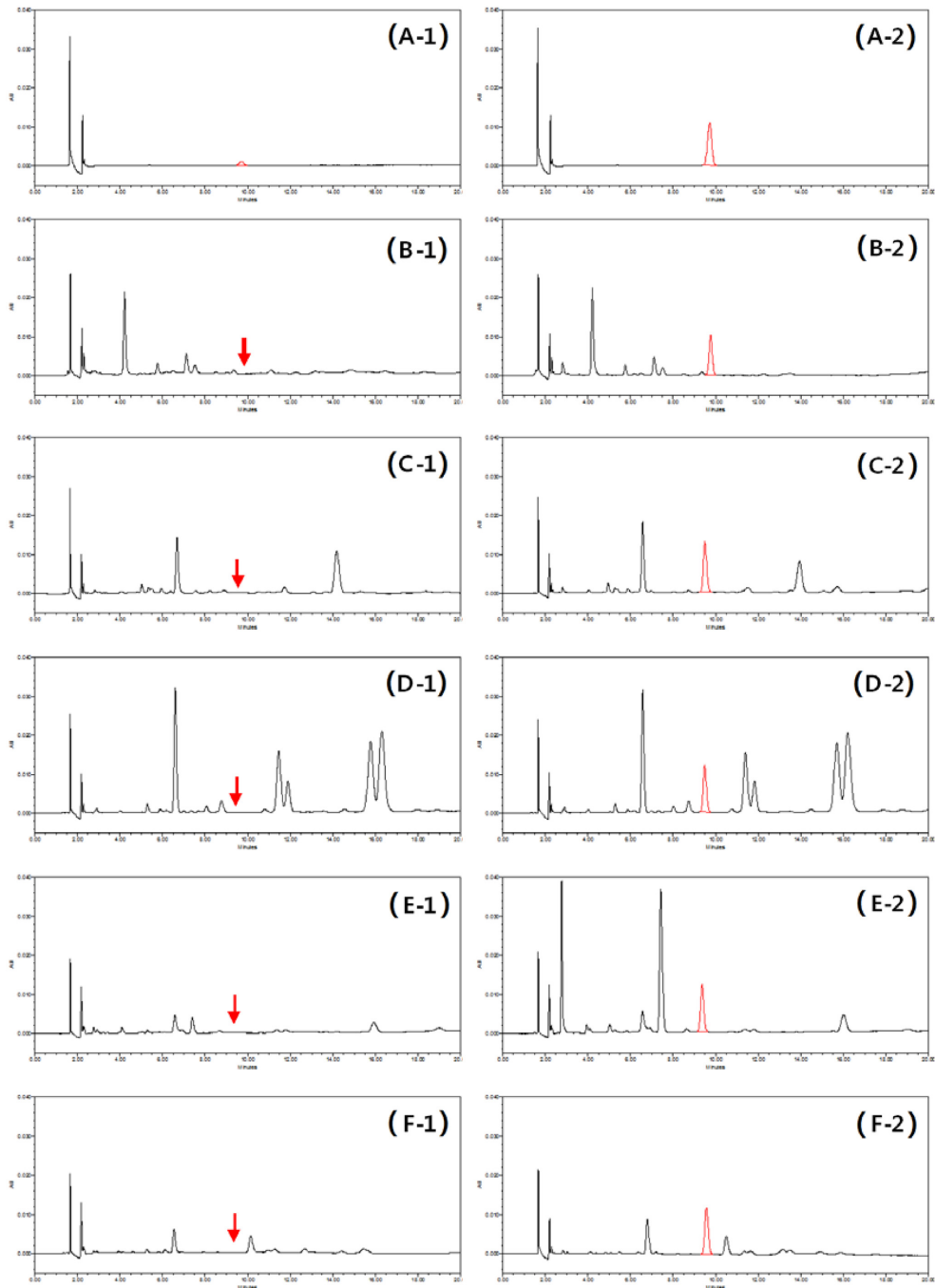


Fig. 4. HPLC-UV-D chromatograms of imazapyr (A) standard of imazapyr 0.5, 5 mg/kg; (B) blank and recovery of soybean; (C) blank and recovery of pepper; (D) blank and recovery of mandarin; (E) blank and recovery of hulled rice and (F) blank and recovery of potato.

분석법 검증

본 연구에서 확립한 시료추출, 분배 및 기기분석 과정을 무농약 농산물 시료에 적용한 결과 imazapyr와 동일한 머무름 시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였고, 이를 통해 분석법의 선택성(selectivity)을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

Imazapyr의 직선성(linearity)을 구하기 위하여 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0 및 10.0 µg/mL의 표준용액을 조제 후 HPLC-

UV-D에 주입하여 분석한 결과 상관계수(r^2)가 0.99 이상으로 나타났다(Fig. 5). 확립된 기기분석법을 통한 imazapyr의 최소검출량은 1 ng이었고, 이때의 검출한계(LOD)는 0.025 mg/kg이었다. 정량한계(LOQ)는 2 ng으로 0.05 mg/kg이었다. 산출된 정량한계는 분석기기의 정량한계와 시료량, 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 산출한 것으로 잔류농약 공정분석법으로 적합한 수준이었다.

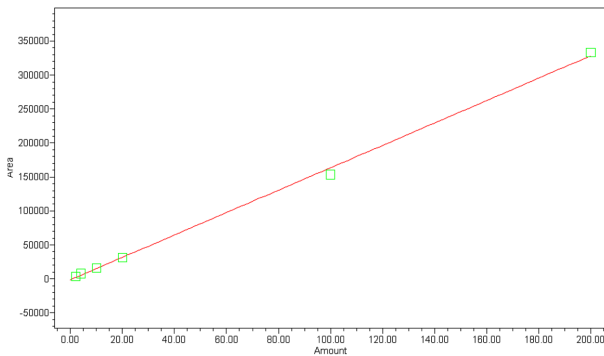


Fig. 5. Calibration curve of imazapyr standard solution.

분석법의 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 재현성(repeatability) 등을 평가하기 위해 각각의 농산물 무처리 시료에 imazapyr의 정량한계, 정량한계 10배, 정량한계 50배 수준인 0.05, 0.5, 2.5 mg/kg의 처리농도로 5반복 회수를 실험을 수행하였다. 평균 회수율은 콩류인 대두에서 72.1-100.0%, 곡류인 현미에서 85.6-108.0%, 과채류인 고추에서 87.8-90.7%, 과일류인 감귤에서 76.5-79.8%, 서류인 감자에서 85.6-92.0%이었고, 분석오차는 모두 10% 미만으로 잔류농약 공정분석법으로 적합할 것으로 예상되었다(Table 5). HPLC-UVD를 이용하여 분석한 각 시료의 무처리 및 회수율 크로마토그램을 Fig. 4에 제시하였다.

분석법의 재현성 확인을 위해 대전지방식품의약품안전청 유해물질과와 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 분석법을 대전지방식품의약품안전청에 제공하고 동일한 방법으로 분석을 수행한 후 회수율 및 표준편차를 비교하였다. 대전 지방식품의약품안전청의 각 농도별 평균 회수율은 71.2-112.3%이고 표준편차는 10%로 미만으로 조사되었다. 두 실험실간 회수율 결과에 따른 평균값은 77.0-110.1%, 변이계

Table 5. Recovery results and limit of quantification (LOQ) of imazapyr from samples spiked with solution of imazapyr (n = 5)

Sample	Fortification (mg/kg)	Average ± RSD (%)	LOQ (mg/kg)
Soybean	0.05	83.1 ± 7.3	
	0.5	100.0 ± 3.9	
	2.5	72.1 ± 1.7	
Rice	0.05	108.0 ± 5.0	
	0.5	85.6 ± 8.0	
	2.5	87.1 ± 2.2	
Pepper	0.05	87.8 ± 5.9	
	0.5	90.7 ± 3.5	0.05
	2.5	88.0 ± 1.4	
Mandarin	0.05	77.9 ± 8.8	
	0.5	76.5 ± 4.5	
	2.5	79.8 ± 2.6	
Potato	0.05	92.0 ± 7.7	
	0.5	86.2 ± 5.8	
	2.5	85.6 ± 5.7	

수(CV, %) 또한 모든 처리구에서 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)에서 > 0.01 mg/kg, ≤ 0.1 mg/kg의 32%, > 0.1 mg/kg, ≤ 1 mg/kg의 23%보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Table 6).

LC/MS를 이용한 재확인

본 연구에서 확립된 분석법의 정성적 신뢰성을 확보하기 위해 재확인 실험(confirmation)을 수행하였다. Imazapyr는 분자 내에 산 해리(H⁺)될 수 있는 부분이 있어 이온화가 용이하므로 electro-spray ionization positive-ion mode (ESI⁺)

Table 6. Inter-laboratory validation results of analytical method for imazapyr in samples

Sample	Fortification (mg/kg)	Recovery ± RSD (%)		Average ³ (%)	CV ⁴ (%)
		MFDS ¹ (n = 5)	Daejeon ² (n = 3)		
Soybean	0.05	83.1 ± 7.3	107.2 ± 8.0	95.2	17.9
	0.5	100.0 ± 3.9	71.2 ± 1.7	85.6	23.8
Hulled rice	0.05	108.0 ± 5.0	112.3 ± 3.5	110.1	2.8
	0.5	85.6 ± 8.0	88.4 ± 2.0	87.0	2.3
Pepper	0.05	87.8 ± 5.9	86.7 ± 2.4	87.3	0.9
	0.5	90.7 ± 3.5	81.8 ± 2.1	86.3	7.3
Mandarin	0.05	77.9 ± 8.8	104.7 ± 2.4	91.3	20.8
	0.5	76.5 ± 4.5	77.6 ± 0.5	77.0	1.1
Potato	0.05	92.0 ± 7.7	106.7 ± 3.9	99.4	10.5
	0.5	86.2 ± 5.8	86.7 ± 0.5	86.5	0.4

¹Ministry of Food and Drug Safety
²Daejeon Regional Food and Drug Administration
³Recovery average of inter-laboratory
⁴Coefficient of variation of inter-laboratory

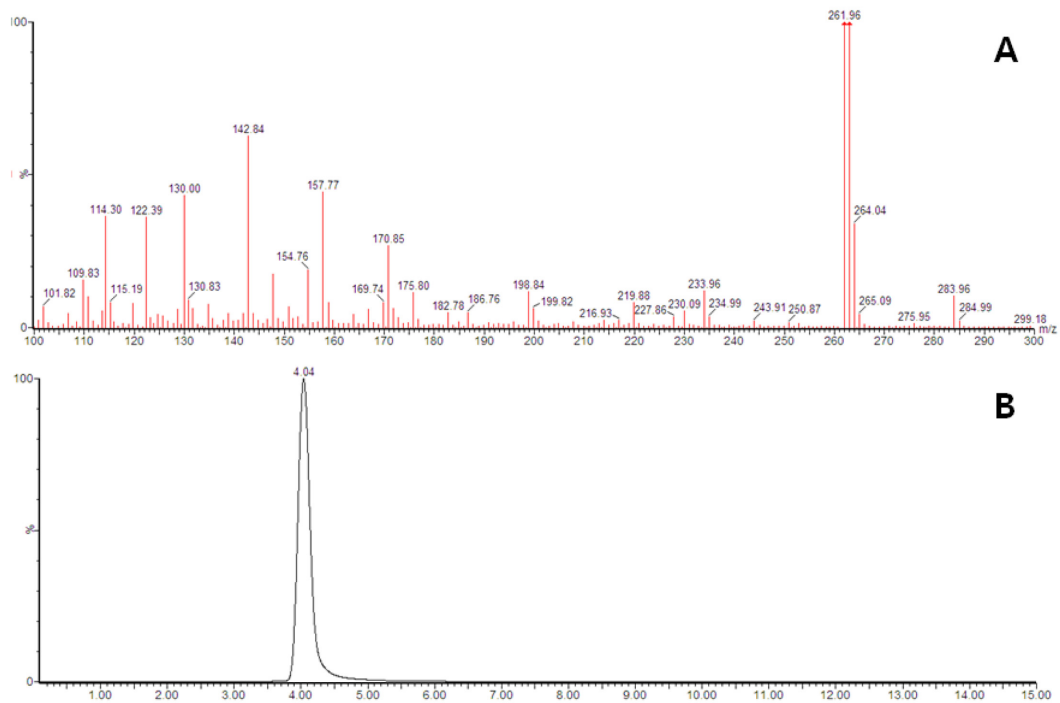


Fig. 6. Full scan mass spectrum (A) and chromatogram (B) of imazapyr at 10 µg/mL.

를 사용하였고 이동상에 proton source로 formic acid를 첨가하여 분석에 이용하였다. 아래의 분석조건을 바탕으로 total ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum으로 selected-ion monitoring (SIM) 분석을 위한 최적 특성이온을 선정하였다. 질량이 261.3인 imazapyr 표준용액(10 µg/mL)을 일정한 속도(10 µL/min)로 질량검출기에 직접 주입한 결과 질량이 (M+H)⁺ 형태인 262 mass 값을 확인하였다. 이 때 cone voltage의 변화(10~70 V)에 따른 최적화 과정을 통해 40 V에서 imazapyr의 최대의 peak 강도가 나타남을 확인하였다. Table 3의 최적화된 분석조건으로 분석했을 때 scan mode의 결과와 single ion recording (SIR) mode 결과가 일치함을 확인하였다(Fig. 6). 최적 이온은 감도가 높으며 분자량을 직접 반영하는 262 m/z를 최적 특성이온으로 선정하였고, 이때 imazapyr의 머무름 시간은 4.0분이었다.

결 론

본 연구에서는 국내 유통되는 농산물 중 imazapyr의 검사를 위한 공정분석법을 개발하였다. 대표 농산물 시료(대두, 고추, 감귤, 현미, 감자) 중의 imazapyr를 methanol로 추출하고 dichloromethane으로 정제하였으며 흡착 크로마토그래피를 이용한 정제는 생략하여 시험의 효율성을 높였다. 검출한계(LOD)는 0.025 mg/kg이었고 정량한계(LOQ)는 0.025 mg/kg이었다. 회수율은 72.1-108.0%로 모든 농산물에서 양호한 결과를 나타내었으며, 실험실 간 검증 결과에서도

77.0-110.1%로 나타나 재현성도 우수함을 확인할 수 있었다. 개발된 분석법은 국제적 잔류농약 분석 가이드라인과 조화되었으며 농산물 중 imazapyr의 검사를 위한 공정분석법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의글

This study was carried out with the support of “Safety Evaluation and Analysis Method on Pesticide Residues in Foods-2014 (14161MFDS009)” from Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea in 2014.

Literature Cited

- Beardmore, R. A., R. Hart, R. Iverson, M. A. Risely and M. Timmer (1991) Imazapyr herbicide. In: The imadazolinone Herbicides, CRC Press Inc. 211-227.
- Charles S. H. and A. D. Michael (1995) Improved Method for the analysis of imazapyr in soil. *Pestic. Sci* 4:21-26.
- Chemicalize by chemoxn ltd. (2014) (<http://chemicalize.org>).
- CAC (CODEX Alimentarius Commission) (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.
- CODEX (2012) http://www.codexalimentarius.org/download/report/777/REP12_PRe.pdf
- CODEX (2013) <http://www.codexalimentarius.org/input/download/>

- report/799/REP13_PRe.pdf
- CODEX (2014) http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/917/REP14_PRe.pdf
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014) <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/3737.pdf>
- MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare) (2014) <http://www.sfs.fi/files/6914/GSPSNJPN380.pdf>
- EPA (United states Environmental Protection Agency) (2003) <https://www.federalregister.gov/articles/2003/09/26/03-24123/imazapyr-pesticide-tolerance>
- EPA (United states Environmental Protection Agency) (2013) <https://www.federalregister.gov/articles/2013/11/06/2013-26364/imazapyr-pesticide-tolerances>
- EPA (United states Environmental Protection Agency) (2014) <https://www.federalregister.gov/articles/2014/04/09/2014-07694/imazapyr-pesticide-tolerances>
- Miller, J. H., R. J. Mitchell, and W. Deyou (1997) The manual of the forestry herbicide Science and technology press, Peking 98-107
- Navakova, O. (1997) Determination of imazethapyr and imazapyr residues in soil by coupled-column liquid chromatography. *Chromatographia*. 39(1/2):62-66
- Santoro, A., M. Mansour, M. Tropea, A. Scopa and S. A. Bufo (1999) Residual analysis of imazapyr and chlozolinate in water using sunlight, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63:33-38.
- Wang, X., H. Wang and D. Fan (2006) Degradation and metabolism of imazapyr in soils under aerobic and anaerobic conditions, *international journal of environmental analytical chemistry*. Intern. J. Environ, Anal. Chem. 86(8): 541-551.
- Weiping, L., P. Alba and G. Carlo (1992) High-performance liquid chromatographic determination of the herbicide imazapyr residues in water and soil. *Sci. Total. Environ.*, 123/124:39-43.
- 식품의약품안전처 (2014) 식품공전.
- 이영득 (2013) 식품공전 잔류농약분석법 실무해설서, 식품의약품안전처.

HPLC-UVD를 이용한 농산물 중 Imazapyr의 공정분석법 확립

장 진¹ · 김희정¹ · 고아영¹ · 이은향¹ · 주윤지¹ · 김진홍² · 장문익^{1*} · 이규식¹

¹식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, ²대전지방식품의약품안전청 유해물질분석과

요 약 농산물 중 잔류농약의 안전관리를 위해 2014년 신규 기준설정 농약인 imazapyr의 분석법을 개발하였고 분석법의 정확성, 재현성, 정밀성, 선택성, 직선성에 대한 검증을 통하여 잔류농약 분석을 위한 공정분석법으로서의 유효성을 검증하였다. Imazapyr는 imidazolinone계 화합물로 아미노산의 생성을 억제하여 잡초의 성장을 방제하는 제초제이다. Imazapyr는 CODEX를 포함한 미국, 일본 등에서 잔류허용기준(MRL)이 설정되어 있으며, 우리나라에서도 대두에 대해 잔류허용기준을 설정할 예정이다. 비록 기준은 대두에 우선 설정되지만 농산물 전반에 대한 안전관리를 위해 곡류, 콩류, 채소류, 과일류, 서류에 대한 분석법을 개발하였고, 각 농산물군의 대표작물인 대두, 고추, 감귤, 현미, 감자 시료에 대해 분석법을 개발하였다. 시료 중 imazapyr를 methanol을 이용해 추출하고 dichloromethane으로 액-액 분배하여 극성 간섭물질을 제거하였으며, 현미 및 대두 등 유지시료의 경우 n-hexane/acetonitrile 분배법을 적용하여 유지성분을 추가로 제거하였다. 분석기기로는 Imazapyr의 낮은 증기압과 UV 파장의 빛에 대한 흡광성을 감안하여 HPLC-UVD를 사용하였다. 확립된 분석법에서 검량선의 상관계수(r^2)는 0.99% 이상으로 우수한 직선성을 보였으며, 5개 대표 농산물에 imazapyr를 3개 농도에서 5회 반복하여 수행한 결과 회수율은 72.1-108.0%이었고 분석오차는 10% 미만으로 잔류농약 분석을 위한 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40, 2003)에 적합하였다. 본 연구에서 확립된 분석법은 식품 중 imazapyr의 안전관리를 위한 공정분석법으로 사용될 것이다.

색인어 잔류분석법, imazapyr, HPLC-UVD, LC/MS, 농산물