



대표 농산물 중 살균제 Pencycuron의 HPLC 정밀 잔류분석법 개발

이혜리^{1,†} · 최 훈^{2,†} · 김병준 · 김은혜 · 김수희 · 이진범 · 이영득³ · 김정환*

서울대학교 농생명공학부, ¹국립환경과학원 금강물환경연구소, ²원광대학교 생물환경화학학과, ³대구대학교 생명환경학부

Establishment of Analytical Method for Pencycuron in Representative Agricultural Commodities by High-Performance Liquid Chromatography

Hyeri Lee^{1,†}, Hoon Choi^{2,†}, Byung-Joon Kim, Eunhye Kim, Su-Hee Kim, Jin-Beom Lee, Young Deuk Lee³ and Jeong-Han Kim*

Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, 08826, Korea

¹Geum River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Okcheon, 29027, Korea

²Department of Bio-Environmental Chemistry, Wonkwang University, Iksan, 54538, Korea

³Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan, 38453, Korea

(Received on March 7, 2017. Revised on March 20, 2017. Accepted on March 21, 2017)

Abstract The single residue analytical method was developed for determining fungicide pencycuron residues in various agricultural commodities with high-performance liquid chromatography (HPLC). Pencycuron residue was extracted with acetone from representative crops such as Korean cabbage, apple, brown rice and green pepper. After ethyl acetate/*n*-hexane partition and subsequent clean-up with silica gel chromatography, pencycuron residue was quantified by reversed phase HPLC with UV detection at 240 nm. The suspected residue of pencycuron was confirmed using selected-ion monitoring (SIM) LC/mass spectrometry (MS). Instrumental limit of quantitation (ILOQ) and method LOQ (MLOQ) were set at 2 ng and 0.02 mg/kg, respectively. Overall recoveries of pencycuron from different crop samples fortified at three levels (MLOQ, 10MLOQ, 100MLOQ) were 72~108%. This proposed method could be useful as official analytical method for quantification of pencycuron residues in agricultural commodities.

Key words Analytical method, HPLC, pencycuron, residue

<< ORCID

Jeong-Han Kim

<http://orcid.org/0000-0003-1914-6870>

Hoon Choi

<http://orcid.org/0000-0002-9115-9636>

서 론

Pencycuron[1-(4-chlorobenzyl)-1-cyclopentyl-3-phenylurea]은 페닐우레아계통의 살균제로써(Fig. 1), 1981년 Frohberger와 Grossman에 의해 합성된 이후 Bayer AG이 1984년에 처음 제품화하였다(Turner, 2015). 이 비침투성 보호살균제

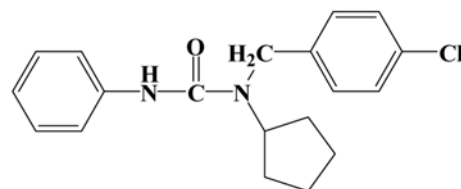


Fig. 1. Chemical structure of pencycuron.

는 원인균 *Rhizoctonia solani*와 *Pellicularia* spp.의 세포분화를 저해함으로써 살균효과를 보이며(Turner, 2015), 벼의 잎집무늬마름병(sheath blight)와 인삼의 잘록병(damping

*Corresponding author

E-mail: kjh2404@snu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work

off) 방제에 사용되고 있다(KCPA, 2016). 현재 국내에선 수화제, 액상수화제, 입제 형태로 몬세렌(팜한농, 바이엘), 갈무리(경농), 나이샷(농협케미컬), 크린문(아그로텍), 킬러문(한얼싸이언스), 문고카트(동방아그로), 농프로(인바이오), 그린문(한얼싸이언스), 몬스터(동방아그로) 제품이 판매되고 있다. 합제로는 트리아졸계 tebuconazole와의 합제인 울타리(바이엘)와 티프시바(팜한농), 스코어(인바이오), 카복사마이드계 trifluzamide와의 합제인 영그네(경농), 트리아졸계 hexaconazole와의 합제인 함초롱(한얼싸이언스)이 있다(KCPA, 2016).

페닐우레아계 화합물은 일반적으로 열에 불안정하기 때문에, 식품공전에서는 페닐우레아계 제초제 thidiazuron를 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)로 분석하도록 하고 있다(MFDS, 2016a). 만약 기체 크로마토그래피(Gas Chromatography, GC)를 이용하여 pencycuron을 분석할 경우 기기 주입 동안 모화합물의 일부가 분해되어 검출되기 때문에, Kobori et al. (1978)은 현미, 벧짚, 토양 중 pencycuron을 분석할 때 유도체화 후 flame ionization detector (FID)가 장착된 GC로 분석하였다(Rolle and Cormis, 1989). 반면, Roll와 Comis (1989)는 florisol로 정제 후 HPLC를 이용하여 여러 채소류의 pencycuron 잔류분을 분석하였고, Choi et al. (2005)은 산-염기 추출법을 이용해 쌀 중 pencycuron을 추출한 후 UV 검출기가 장착된 HPLC로 잔류분을 정량하는 분석법을 제시하였다. 하지만, 앞서 제시된 분석법은 일부 농산물에 한하여 분석법이 검증되었기 때문에 다양한 매질의 농산물 중 pencycuron의 잔류분 분석에 적용할 수 있는 공전분석법으로 적합하지 않다. 또한, 현재 식품공전 상의 pencycuron 잔류분석법은 Kobori et al.이 1978년에 제시한 방법처럼 sodium hydride, methyl iodide 및 dimethyl sulfoxide 시약을 이용하여 pencycuron 내의 불포화 N-H기를 alkylation시킨 후 GC-nitrogen phosphorus detector (NPD)를 이용하여 정량하는 방법으로 carpropamid와 동시분석할 수 있도록 되어 있어 정밀 공전분석법으로써의 개선이 필요하다(MFDS, 2016a).

따라서, 본 연구에선 다양한 매질의 모든 농산물 중 pencycuron 잔류분 분석에 사용할 수 있는 공전시험법으로써 정확, 정밀한 단성분 분석법을 개발하고자 하였으며 별도의 유도체화 과정없이 바로 분석할 수 있도록 HPLC-UV를 이용하여 정량하고 질량분석기로 그 잔류분을 재확인할 수 있도록 분석법을 확립하였다.

재료 및 방법

시약 및 초자

본 연구에 사용한 모든 유기용매는 HPLC급(Burdick & Jackson, USA)이었고 sodium chloride와 무수 sodium sulfate는 GR급(Junsei chemical Co., Japan)이었으며, formic acid ($\geq 95\%$)는 Sigma Aldrich (USA)에서 구입하였다. 증류수는 Milli-Q ultrapure water purification system (Millipore Co., USA)에 의해 18.2 M Ω 수준으로 정제된 증류수를 사용하였다. Pencycuron 표준품(99.9%)과 흡착 크로마토그래피용 florisol (60-100 mesh) 및 silica gel (70-230 mesh)을 Fluka (Switzerland)에서 구입하였으며, Florisol와 Silica gel은 실험에 사용하기 전에 130°C 오븐에서 5시간 이상 활성화시켰다. 시료 균질화를 위해 믹서기(HMF-1000A, 한일, 한국)를 이용하였고 추출을 위해 진탕추출기(SA-2s, Taitec, Japan)를 사용하였으며 시료 추출액 농축 시 감압농축기(R-114, Buchi, Switzerland)를 사용하였다. 추출액 여과 시 GF/A 여과지(Whatman International Ltd., UK)를 사용하였다.

농산물 시료

Pencycuron이 함유된 농약 제품은 벼, 딸기, 인삼, 마늘에 사용 등록되어 있으며(KCPA, 2016), 위 작물들을 포함하여 기타농산물에 농약 잔류허용기준이 설정되어 있다(MFDS, 2016b)(Table 1). 따라서, 본 연구의 대표 작물로서 채소류 중 배추와 고추, 과일류 중 사과 및 곡류 중 현미를 선정하였으며, 대상 농산물은 시중에서 유통 중인 친환경 또는 무농약 작물로 구입하였다. 시중에서 구입한 농산물은 믹서기를 이용하여 균질화 하였으며, 현미의 경우 분쇄 후 표준체 420 μ m를 통과시켜 균질화 하였다. 균질화된 시료는 분석할 때까지 비닐백에 담아 -20°C에서 보관하였다.

표준용액 조제 및 보관

표준품을 1,000 mg/L가 되도록 acetonitrile에 용해시켜 stock solution을 조제하였다. Working solution은 분석 당일에 stock solution을 acetonitrile으로 희석하여 0.05, 0.1, 1, 5, 10, 15 mg/L 농도가 되도록 조제하였다. Stock solution은 냉장고 4°C에 보관하였으며 실험기간 동안 pencycuron 분해는 발생하지 않아 표준용액의 안정성을 확인하였다.

Table 1. Maximum residue limits for pencycuron in agricultural products

| Crops | MRLs (mg/kg) | Crops | MRLs (mg/kg) |
|------------|--------------|-----------------------------|--------------|
| Garlic | 0.1 | Green garlic | 0.05 |
| Ginseng | 0.7 | Rice | 0.3 |
| Strawberry | 2.0 | Other agricultural products | 0.1 |

Table 2. HPLC condition for pencycuron residue analysis

| | |
|--------------|--|
| Instrument | Agilent 1100 series (USA) |
| Column | Korean cabbage, apple - Phenomenex Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm, USA) Brown rice, green pepper - Phenomenex Gemini-NX C18 (150 × 4.6 mm, 3 μm, USA) |
| Column Temp. | 35°C |
| Mobile phase | Korean cabbage, apple - acetonitrile:water = 70:30 (v/v) Brown rice, green pepper - acetonitrile:water = 55:45 (v/v) |
| Flow rate | Korean cabbage, apple : 1.0 mL/min Brown rice, green pepper : 1.1 mL/min |
| Detection | 240 nm |
| Sample size | 20 μL |

Table 3. LC/MS condition for confirmation of pencycuron residue

| | |
|--------------------|--|
| Instrument | Varian 500-MS IT-MASS spectrometer (USA) |
| Column | Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 mm, 2.6 μm, USA) |
| Column Temp. | 40°C |
| Mobile phase | 0.1% formic acid in acetonitrile:0.1% formic acid in water = 65:35 (v/v) |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Sample size | 5 μL |
| Ionization | ESI positive mode |
| Drying gas Temp. | 350°C |
| Capillary voltage | 60 V |
| RF loading storage | 90% |
| Mass range | m/z 100~500 |
| SIM ion | m/z 329 |

HPLC 분석조건 및 LC/MS 확인분석조건 설정

Pencycuron 잔류분 분석은 diode array detector (DAD)가 장착된 Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies Inc., USA)를 사용하였다. 컬럼은 작물 종류에 따라 역상 C18 컬럼인 Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm, Phenomenex Inc., USA)과 Gemini-NX C18 (150 × 4.6 mm, 3 μm, Phenomenex Inc., USA)을 사용하였다(Table 2). LC-DAD를 이용하여 분석된 잔류분의 신뢰성을 확보하기 위해 LC/mass spectrometry (MS)로 확인분석하였다. LC/MS분석은 Varian 500-MS IT-MASS spectrometer (Varian Inc., USA)를 사용하였다. 컬럼은 작물 종류에 관계없이 역상 C18 컬럼인 Kinetex C18 (100 × 2.1 mm, 2.6 μm, Phenomenex Inc., USA)을 사용하였다(Table 3).

HPLC 분석법 검증

본 연구에서 확립된 HPLC 기기분석법을 검증하기 위해 기기검출한계(Instrumental limit of detection, ILOD) 및 기기정량한계(Instrumental limit of quantitation, ILOQ), 재현성(Reproducibility) 및 직선성(Linearity)을 확인하였다. ILOD 및 ILOQ 결정을 위해 pencycuron 표준용액 1, 0.5, 0.1,

0.05 mg/L을 차례로 20 μL씩 HPLC에 주입하여 크로마토그램 상의 signal과 noise의 비를 구하였으며, s/n > 3 또는 > 10에 해당되는 농도를 ILOD 또는 ILOQ로 설정하였다. Pencycuron 표준검량선 작성 및 직선성 확인을 위해 working solution 0.1, 1, 5, 10, 15 mg/L을 20 μL씩 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 측정하였다.

추출 및 분배용매별 분배효율 검토

식품공전 및 앞선 문헌에서 pencycuron을 추출하는데 사용된 바 있는 acetone을 추출용매로써 선정하였다(Roll & Comis, 1989; Choi et al., 2005). 분배효율 검토를 위해 50 mL의 증류수와 포화식염수 50 mL 혼합물에 pencycuron 표준용액을 처리하여 1 mg/L 수준이 되도록 한 후, 분배용매를 각각 100 mL, 50 mL씩 첨가하여 분배하였다. 검토 대상 분배용매로는 dichloromethane, ethyl acetate, n-hexane이었다. 분배 후 유기용매 층을 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하고 40°C 이하에서 감압농축하였으며, 농축 잔사를 2 mL acetonitrile에 재용해하여 기기분석 하였다. 분배용매 및 분배용매 사용량에 따른 분배추출효율을 각각 산출하였다.

흡착 크로마토그래피의 정제조건 설정

유리컬럼(anzitum 15 mm, 길이 350 mm)에 10 g의 활성화된 흡착제(florisil와 silica gel)와 3 g의 무수 sodium sulfate 을 차례로 건식충진한 후, 100 mL의 *n*-hexane을 가하여 유출시켜 버렸다. 고정상 상단이 노출되기 전에 5 mL의 pencycuron 표준용액 1 ppm을 고정상 상단에 가하고 1 mL의 *n*-hexane으로 유리컬럼 내벽을 씻은 후 유출시켰다. 고정상 상단이 노출되기 전에 ethyl acetate 비율이 10%, 20%, 30%, 40%, 50%인 ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액 100 mL를 순차적으로 용출시킨 후 용출액을 농축하여 acetonitrile 5 mL로 재용해하여 시험용액으로 하였다. 흡착제 종류에 따라 용출액별 pencycuron 용출효율을 각각 산출하였다.

분석정량한계

Pencycuron 분석을 위한 전처리 과정이 확정된 이후, 기기분석 상의 정량한계(ILOQ)와 전처리 과정의 시료채취량, 최종 시험용액량, 분석조작에 따른 회석 또는 농축배수를 고려하여 전체 분석법의 분석정량한계(Method limit of quantitation, MLOQ)를 산출하였다(Lee et al., 2009; 식 1).

$$\frac{[\text{기기정량한계}(\text{ng}) \times \text{시험용액량}(\text{mL}) \times \text{회석배수}]}{[\text{HPLC주입량}(\mu\text{L}) \times \text{시료채취량}(\text{g})]} = \text{MLOQ} \text{ (mg/kg)} \tag{1}$$

컬럼내의 pencycuron 머무름 특징 및 효율성

농산물 추출액을 HPLC로 분석하였을 때 농산물 매질 존재하에 pencycuron의 머무름 특징을 확인하기 위해 capacity factor (*k*)를 식 2에 따라 머무름 시간과 보정머무름시간(*t*'; adjusted retention time)을 이용하여 산출하였다(식품의약품 안전처, 2013).

$$k = t_R' / t_0 \tag{2}$$

t_R = retention time of pencycuron
t₀ = retention time of a non-retained compound, dead time
t_R' = *t_R* - *t₀* = adjusted retention time

컬럼의 효율성(Column efficiency)을 확인하기 위해 이론단수(*N*; Number of plates)와 이론단높이(*H*; Height of theoretical plates)를 산출하였다(Rood, 2007).

$$N = 5.545 (t_R / W_h)^2 \tag{3}$$

W_h = peak width at half height

$$H \text{ (mm)} = \text{column length (mm)} / N \tag{4}$$

농산물별 pencycuron 회수율 실험

균질화된 무처리 시료 25 g을 정밀히 달은 후 표준용액

첨가법에 따라 MLOQ, 10MLOQ, 100MLOQ 수준이 되도록 각각 처리한 다음 100 mL의 acetone을 가하여 1시간 동안 진탕 추출하였다. 현미는 추출 전에 증류수 25 mL를 넣어 시료를 습윤화시켰다. 추출물은 여과지를 이용해 흡인여과하고, 30 mL acetone으로 잔사 및 용기를 씻어내어 앞의 여액과 합하였다. 합친 여액을 40°C 이하의 수욕조에서 감압 농축하였다. 농축잔사를 50 mL 포화 식염수가 담긴 500 mL 분액여두에 50 mL 증류수와 100 mL *n*-hexane으로 헹구어 담고 격렬히 진탕한 후 층이 분리될 때까지 정치하였다. *n*-Hexane 층을 무수 sodium sulfate에 통과 시켜 탈수한 후, 다시 *n*-hexane 50 mL을 가하여 상기의 과정을 한 번 더 분배 추출하고 추출액을 합하여 40°C 이하에서 감압농축한 후 *n*-hexane 5 mL에 재용해 하였다. silica gel 컬럼에 추출액 5 mL를 가하고 농축잔사를 약 *n*-hexane 1 mL로 헹구어 합쳐 유출시켜 버렸다. 고정상 상단이 노출되기 전에 ethyl acetate:*n*-hexane (10/90, v/v)용액 100 mL를 컬럼에 가해 흘러 버린 후 ethyl acetate:*n*-hexane (20/80, v/v)용액 100 mL를 가하여 용출시켜 받았다. 용출액을 40°C 이하에서 감압농축한 후 5 mL acetonitrile로 재용해하여 HPLC로 분석하였다. 이 과정을 3번 반복실험하여 농산물별 처리수준에 따른 회수율을 산출하였다.

결과 및 고찰

UV 흡광 파장 결정

Pencycuron는 형광을 발생하는 특성을 나타내지 않으므로 범용 HPLC 검출기 중 UV 흡광검출기를 적용하여 분석하였다. Pencycuron 표준용액 1 ppm을 DAD로 분석함으로써 UV 흡광 특성을 조사한 결과, 최대 흡광파장이 240 nm에서 관찰됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 잔류분 분석 시 흡광 파장으로 240 nm를 채택하여 분석하였다(Fig. 2).

HPLC 분석법 확립 및 검증

Pencycuron 분석용 컬럼은 일반적으로 가장 많이 사용되

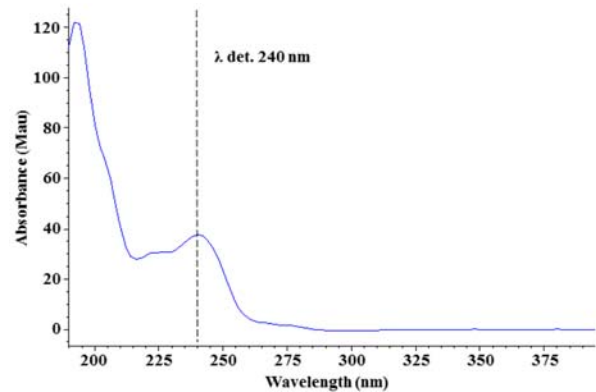


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of pencycuron.

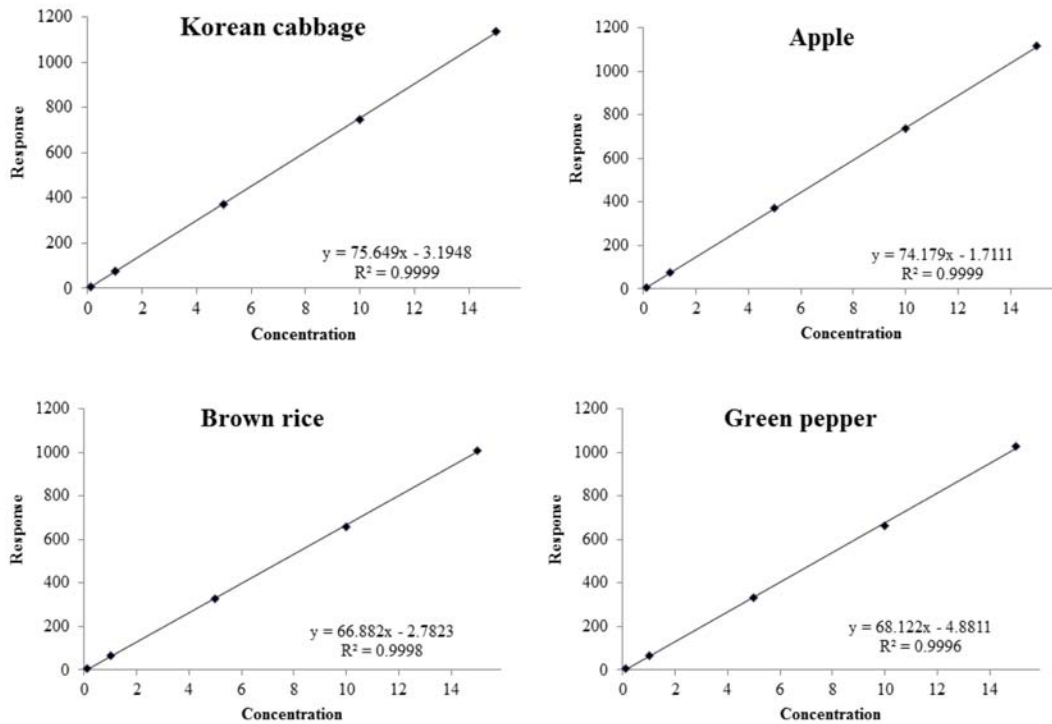


Fig. 3. Calibration curve of pencycuron.

Table 4. Efficiency of liquid-liquid partition^{a)} with three different solvents

| Solvents | Recovery ^{b)} (%) | | |
|------------------|----------------------------|---------------------|-------|
| | Partition-1 (100 mL) | Partition-2 (50 mL) | Total |
| <i>n</i> -Hexane | 80.2 | 3.2 | 83.2 |
| Ethyl acetate | 66.2 | 12.2 | 78.4 |
| Dichloromethane | 63.7 | 10.5 | 74.2 |

^{a)}Partition mixture : 1 mL of 100 mg/L pencycuron + 50 mL of saturated NaCl + 50 mL of distilled water

^{b)}mean, n=3

고 있는 C18 컬럼을 적용하였으며, 재현성이 뛰어난 isocratic 조건으로 분석조건을 설정하였다. 모든 농산물에 동일한 HPLC 기기조건을 설정함이 가장 효율적이거나, 농산물별 매질효과가 상이함으로 분석조건 설정원칙 중 분석의 신뢰성 확보를 최우선하여 기기분석 조건을 설정하였다. 따라서, 현미와 고추의 경우 사과 및 배추와는 다른 간섭물질 존재로 인하여 C18 계열의 분리능이 상이한 Phenomenex Gemini-NX C18 (150 × 4.6 mm, 3 μm)을 이용하여 분석하였고, 이동상 조성 및 유속은 농산물 매질별 최적의 pencycuron 분리가 가능한 조건으로 최적화 하였다(Table 2). 기기검출한계(ILOD) 및 기기정량한계(ILOQ)는 크로마토그램 상 signal/noise 비가 각각 3배, 10배 이상 되는 농약의 양으로 결정하였으며(Fong et al., 1999; Miller, 2005), pencycuron의 ILOQ는 2 ng이었다. 잔류분 정량을 위한 검량선은 0.1~15 mg/L 범위의 표준용액을 이용하여 작성되었으며, 표준용액 농도와 피크 면적간의 회귀방정식으로부터 산출된 결정계수

(R²)는 0.9996~0.9999로 검량선의 직선성은 양호하였다(Fig. 3).

분배효율에 따른 액-액 분배 조건 결정

액-액 분배를 통해 작물별 추출물 매질내의 극성 방해물질을 제거하고자 하였다. 검토된 분배 용매는 *n*-hexane, ethyl acetate 및 dichloromethane 세 종류 용매이었다. 용매 100 mL를 이용한 1차 분배에서 회수율이 63.7~80.2%로 분배효율이 좋지 않았으며, 추가로 진행된 용매 50 mL를 이용한 2차 분배를 포함한 회수율은 74.2~83.2%로 *n*-hexane를 이용한 분배의 경우만 80%를 상회하는 회수율을 보였다(Table 4). 따라서, 분배 용매로 *n*-hexane을 이용하여 100 mL, 50 mL 씩 두 번 분배하는 것으로 분배 조건을 결정하였다.

흡착 크로마토그래피 정제 최적화

액-액 분배 이후, 추가 정제를 위해 흡착 크로마토그래피

Table 5. Recovery rate by sequential elution of ethyl acetate/*n*-hexane mixture

| Eluate ^{a)} condition | | Recovery ^{b)} (%) | |
|--------------------------------|--------|----------------------------|------------|
| Composition | Volume | Florisil | Silica gel |
| 10 : 90 | 100 mL | 2.0 | - |
| 20 : 80 | 100 mL | 101.6 | 103.7 |
| 30 : 70 | 100 mL | - | 2.6 |
| 40 : 60 | 100 mL | - | - |
| 50 : 50 | 100 mL | - | - |
| Total | | 103.6 | 106.3 |

^{a)}Mixture of ethyl acetate/*n*-hexane

^{b)}mean, n=3

Table 6. HPLC chromatographic behavior of pencycuron

| Crops | $t_R^a)$ (min) | $t_0^b)$ (min) | $t_R^{c)}$ (min) | $k^d)$ | $N^e)$ | $H^f)$ (mm) |
|----------------|----------------|----------------|------------------|--------|--------|-------------|
| Korean cabbage | 10.37 | 2.01 | 8.36 | 4.16 | 14421 | 0.017 |
| Apple | 10.48 | 2.05 | 8.44 | 4.12 | 18814 | 0.013 |
| Brown rice | 13.21 | 1.02 | 12.19 | 11.95 | 9853 | 0.015 |
| Green pepper | 13.03 | 1.02 | 12.01 | 11.82 | 8144 | 0.018 |

^{a)}Retention time of pencycuron

^{b)}Retention time of unretained compound

^{c)}Adjusted retention time = $t_R - t_0$

^{d)}Capacity factor = t_R' / t_0

^{e)}Number of plates = $5.545 \times (t_R / W_h)^2$, W_h = peak width at half height

^{f)}Height of theoretical plates = column length(mm) / N

를 이용하였으며, 흡착제로는 널리 사용되는 florisil과 silica gel을 검토하였으며 용출 용매로는 ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액을 사용하였다. 두 가지 흡착제를 이용한 흡착 크로마토그래피에서 모두 ethyl acetate 비율이 20%일 때 101.6~103.7%가 용출되었다(Table 5). 흡착제로 florisil을 사용하였을 경우, ethyl acetate 비율이 10%일 때 2.0% 용출된 반면, silica gel을 사용하였을 때는 용출되지 않았다. 따라서, 분배액의 정제조건은 세척과정을 추가할 수 있는 silica gel을 사용하여 설정하였으며, ethyl acetate/*n*-hexane 10:90 (v/v) 혼합액 100 mL로 컬럼을 세척하고 ethyl acetate/*n*-hexane 20:80(v/v) 혼합액 100 mL로 pencycuron을 용출하는 세부 정제조건을 확립하였다.

분석정량한계(MLOQ)

분석정량한계(MLOQ)는 시료 전처리 및 분석과정을 통틀어 전체 분석법을 통해 시료 내의 분석물질을 정량할 수 있는 한계치로써, 분석장비의 정량한계, 시료주입량, 시료채취량 및 희석 또는 농축배율 등을 고려하여 산출된다(Lee et al., 2009). 본 연구에서 설정된 분석법의 경우, pencycuron의 ILOQ가 2 ng, HPLC 주입량 20 μ L, 시험용액량 5 mL, 시료채취량 25 g, 희석배수 1이므로 MLOQ는 0.02 mg/kg으로 산출되었다. 본 연구로 설정된 pencycuron의 MLOQ 수준은 농산물 중 최저 잔류허용기준인 풋마늘 0.05 mg/kg 수

준을 충분히 정량할 수 있는 수준이기에 잔류 분석법으로써 적합하다고 판단된다.

컬럼 내의 머무름 특징 및 효율성

본 연구에서 확립된 방법에 따라 조제된 농산물별 시험용액을 설정된 HPLC 기기조건에 따라 분석하였을 때 나타나는 pencycuron의 컬럼 내 머무름 특징 및 컬럼 효율성을 검토하였다. Pencycuron의 머무름 시간은 배추와 사과와 경우 10.37분, 10.48분인 반면, 현미와 고추에서는 13.21분, 13.03분이었으며(Table 6), pencycuron 머무름 시간대에 매질별 간섭물질이 확인되지 않음으로써 분석의 선택성이 양호하였다(Fig. 4). 한편, 농산물별 pencycuron 머무름 시간의 차이는 컬럼의 종류, 이동상 조성 등의 차이로 인한 것이었다. Capacity factor, k 값은 배추와 사과와 경우 각각 4.16, 4.12인 반면, 현미와 고추에서는 11.95, 11.82이었다. Capacity factor가 낮으면 짧은 시간내에 분석이 가능하지만 선택성 및 분해능을 확보하기 어렵기 때문에 일반적으로 4~8 되는 분석조건을 결정한다(Lee et al., 2009; Kwon et al., 2011; Lee et al., 2015). 현미와 고추의 경우 k 값이 10 이상으로 시료당 분석시간이 길어 많은 시료를 분석하는데 어려움이 존재하였다. 하지만, 이는 현미와 고추 추출물 매질 내 간섭물질 영향이 배추와 사과보다 큰 상황이었기에 pencycuron의 선택성을 확보하기 위해 배추와 사과와 분석조건보다 이

동상의 acetonitrile 비율을 55%로 낮추고 분해능을 향상시키기 위해 충전제 pore 크기가 3 μm인 컬럼을 사용함으로써, pencycuron 머무름 특성을 분석의 효율성보다는 분석능 향상을 우선시한 결과이었다. 이론단수(N)과 이론단 높이(H)를 통해 컬럼의 분리 효율을 검토한 결과, 배추 및 사과에서는 pencycuron의 N이 14421, 18814이었고 H는 0.017, 0.013 mm이었으며 현미와 고추에서는 N값이 9853, 8144이었고 H는 0.015, 0.018 mm이었다. 따라서, 현미와 고추 분석 시 capacity factor는 배추 및 사과 분석 시보다 높지만 분리효율은 유사한 수준이었다.

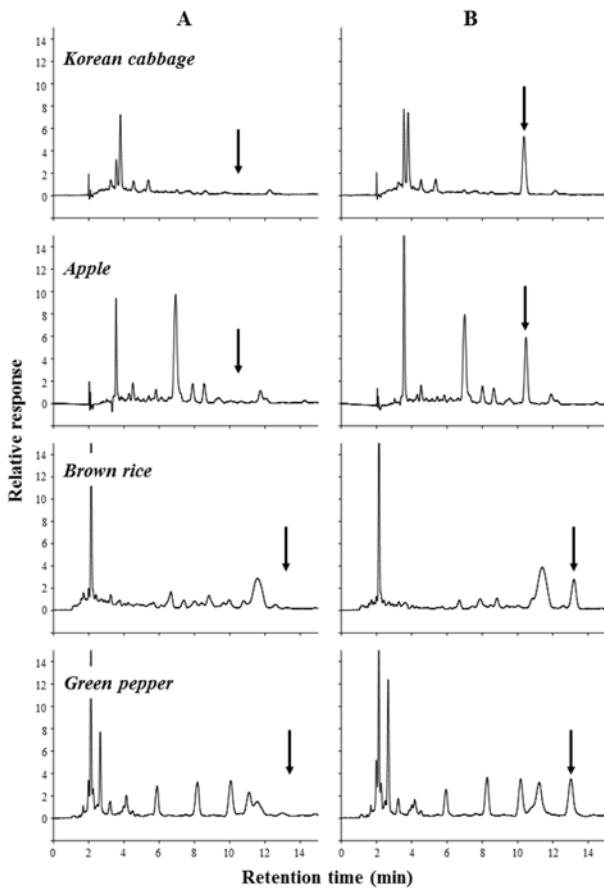


Fig. 4. HPLC chromatograms of pencycuron. A; control, B; fortified at 0.2 mg/kg.

분석법의 농산물별 회수율

본 연구에서 확립된 추출, 분배, 정제 및 기기분석법에 따라 농산물 중 pencycuron 잔류분 회수정도를 확인함으로써 분석법의 정확성과 정밀성을 확인하였다. 무처리 농산물 시료에 표준용액 첨가법에 따라 처리수준이 MLOQ (0.02 mg/kg), 10MLOQ (0.2 mg/kg, 100MLOQ (2 mg/kg)인 회수율 시료를 조제하여 회수율 실험을 수행하였다. 농산물별 처리수준별 3번 반복 실험하였다. 회수율 결과, MLOQ 수준에서는 82~108%, 10MLOQ수준에서는 72~93%, 100MLOQ 수준에서는 81~87%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성 (CV < 10%)도 우수하여 식약처의 단성분 분석법 기준인 회수율 70~120%, C.V ≤ 20%을 만족하였다(Table 7). 따라서, 본 연구를 통해 확립된 pencycuron 분석법은 신뢰성이 보장된 높은 감도의 분석법으로 다양한 작물의 잔류수준 검정에 적용될 수 있는 분석법임을 확인할 수 있었다.

잔류분의 재확인

본 연구에서 확립된 잔류분석법을 이용하여 분석된 pencycuron 잔류분 결과에 대한 신뢰성을 확보하기 위해 재확인 (confirmation)용 LC/MS법을 확립하였다. ESI (electro spray ionization) positive mode에서 capillary voltage 60 V에서 이온화하였고 이동상은 HPLC와 같은 acetonitrile/water 혼합액에 추가로 이온화를 위한 proton을 제공하고 해당 peak의 모양을 향상시키는 장점을 가지고 있는 formic acid를 0.1%사용하였다(Lee et al., 2011). Pencycuron 표준용액 1 mg/L, 5 μL를 주입하여 total-ion chromatogram (TIC)과 mass spectrum을 확인하였다(Fig. 5). 머무름시간 3.3분에 pencycuron을 확인할 수 있었으며, pencycuron의 nominal mass가 328.1 이기에 ESI positive mode에서 m/z가 329.2인 양성자화된 분자이온 [M+H⁺]을 확인할 수 있었고 해당 이온을 SIM 분석을 위한 ion으로 결정하였다. 한편, pencycuron 분자구조 내 존재하는 1개의 Cl 원자로 인하여 Cl 동위원소 ³⁵Cl과 ³⁷Cl의 비율 100:32.5에 따라 [M+H⁺=329]와 [M+2+H⁺=331]이 확인되었다. 농산물 종류별 pencycuron 잔류분을 앞서 설정된 LC/MS법에 따라 분석한 결과, pencycuron 머무름 시간대에 분석 간섭물질이 관찰되지 않아 본 LC/MS법을 잔류분 재확인 분석법으로 결정하였다(Fig. 6).

Table 7. Recovery of pencycuron by different agricultural commodities

| Fortification (mg/kg) | Recovery ^{a)} (%) | | | |
|-----------------------|----------------------------|------------|-------------|--------------|
| | Korean cabbage | Apple | Brown rice | Green pepper |
| 0.02 | 108.4 ± 2.9 | 81.9 ± 3.9 | 101.3 ± 7.0 | 98.1 ± 6.0 |
| 0.2 | 88.9 ± 0.8 | 90.5 ± 0.4 | 72.2 ± 9.9 | 93.4 ± 4.0 |
| 2.0 | 89.3 ± 1.5 | 88.5 ± 0.6 | 81.3 ± 4.2 | 89.4 ± 1.0 |

^{a)}mean ± RSD, n=3

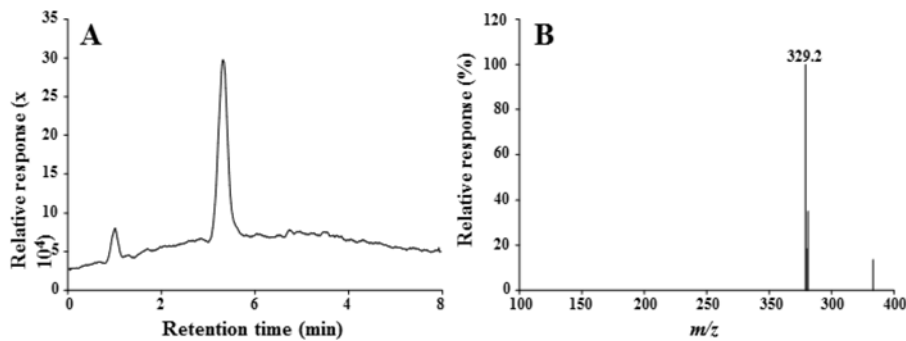


Fig. 5. Total-ion chromatogram (A) and full scan mass spectrum (B) of pencycuron by LC/MS. A standard solution (1 $\mu\text{g/mL}$) was analyzed.

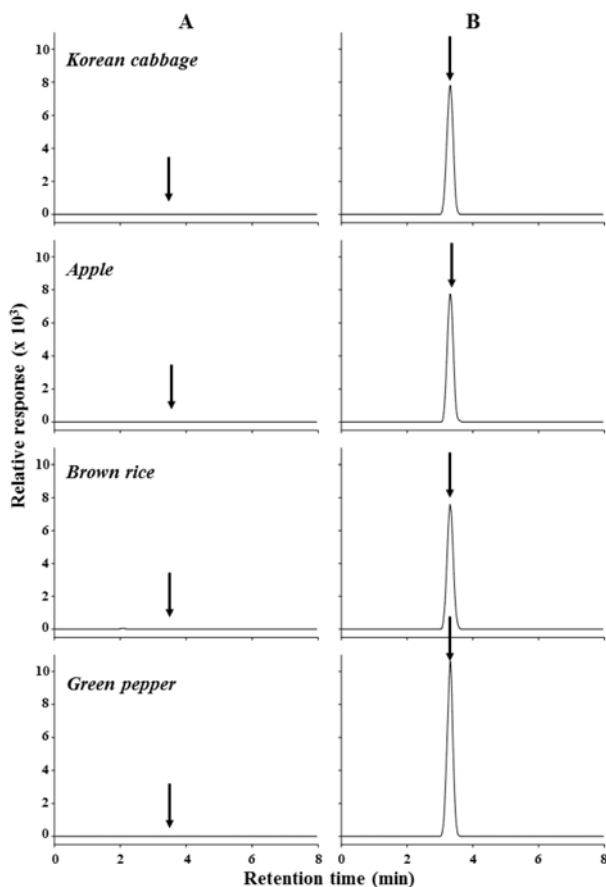


Fig. 6. Selected-ion monitoring chromatograms of pencycuron by LC/MS. A; control, B; fortified at 0.02 mg/kg.

감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전처의 연구개발비 (09072잔류약997-4403)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Literature Cited

Choi, J. C., Y. J. Lee, S. H. Kim, S. Y. Choi, H. J. Choi, S. W. Jeong, H. J. Park and W. S. Kim (2005) Multiresidue

analytical method of pesticides in rice by HPLC. *J. Environ. Sci.* 14(4):445-449.

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

KCPA (Korea Crop Protection Association) (2016) *Guideline Crop Protection Agents.* Korea Crop Protection Association, Seoul, Korea, pp. 320-322, 1270, 1291.

Kwon, C. H., Y. D. Lee and M. H. Im (2011) Simultaneous determination of oryastrobin and its isomers in rice using HPLC-UV and LC-MS/MS. *J. Agri. Food Chem.* 59: 10826-10830.

Lee, H., M. Riu, H. Park, Y. Na, H. Song, Y. S. Keum, Y. Zhu and J. H. Kim (2009) Establishment of analytical method for fenhexamid residue in korean cabbage, apple, mandarin and green pepper. *Korean J. Pestic. Sci.* 13(4):223-231.

Lee, Y. D., J. H. Oh and S. W. Jang (2011) High-performance liquid chromatographic determination of phenothrin and silafufen residues in crops with mass spectrometric confirmation. *Korean J. Pestic. Sci.* 15(4):389-400.

Lee, H., H. Choi, E. Kim, Y. D. Lee and J. H. Kim (2015) Establishment of analytical method for carpropamid in agricultural commodities using HPLC-DAD/MS. *Korean J. Pestic. Sci.* 19(3):185-194.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety) (2013) *Practical manual for analysis of pesticide residue in food (4th).* Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, pp. 70-71.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety) (2016a) *Food code.* Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, pp. 360-362.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety) (2016b) *Attached table 3, Pesticides MRLs in Food.* In: *Food Code.* Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, pp. 69-70.

Miller, J. M. (2005) *Chromatography : concepts and contrasts (2nd),* Wiley Interscience, USA, pp. 286-287.

Rolle, S. D. and Cormis, L (1989) High-performance liquid chromatography for the determination of pencycuron residues in several vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 37:975-978.

Rood, D. (2007) The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers. Wiley-VCH, USA, pp. 16-17, 22.

Turner, J. A (2015) The Pesticide Manual (17th). British Crop Protection Council, Hampshire, UK, pp. 847-848.

대표 농산물 중 살균제 Pencycuron의 HPLC 정밀 잔류분석법 개발

이혜리^{1,†} · 최 훈^{2,†} · 김병준 · 김은혜 · 김수희 · 이진범 · 이영득³ · 김정한*

서울대학교 농생명공학부, ¹국립환경과학원 금강물환경연구소, ²원광대학교 생물환경화학과, ³대구대학교 생명환경학부

요 약 대표 농작물 중 살균제 pencycuron의 잔류량을 정밀하게 분석할 수 있는 단성분 분석법을 개발하였다. 대표 농작물로 배추, 사과, 현미, 고추를 선정하였으며, 정밀분석을 위해 고성능 액체크로마토그래피를 사용하였다. 농작물 시료 중 pencycuron 잔류분을 acetone을 이용하여 진탕 추출하고 에틸아세테이트/헥산을 이용한 액-액 분배법과 silica 크로마토그래피법을 통해 정제하였다. 역상 액체크로마토그래피를 이용해 UV 240 nm 파장에서 pencycuron을 정량분석하였으며, 질량분석기를 통해 잔류분을 확인하였다. 본 분석법을 통한 pencycuron의 기기정량한계는 2 ng으로 분석정량한계는 0.02 mg/kg이었다. 표준용액을 3수준(분석정량한계×1, ×10, ×100), 3반복으로 무처리 시료에 첨가하고 본 분석법의 회수율을 산출한 결과 72~108%이었다. 따라서, 본 분석법은 농산물 중 pencycuron 잔류분석을 위한 공전시험법으로써 분석개발기준을 충족하였다.

색인어 분석법, 액체크로마토그래피, pencycuron, 잔류분