

## 액-액 분배법을 활용한 작물 중 pymetrozine의 잔류분석법 확립

윤지영 · 문혜리 · 박재훈 · 한예훈<sup>1</sup> · 이규승\*충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, <sup>1</sup>신젠타 코리아(주)

## Establishment of Analytical Method for Pymetrozine Residues in Crops Using Liquid-Liquid Extraction(LLE)

Ji-Young Yoon, Hye-ree Moon, Jae-hun Park, Ye-hoon Han<sup>1</sup> and Kyu-Seung Lee\*(Department of Bio-Environmental Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, <sup>1</sup>Syngenta, Korea Ltd)

(Received on May 14, 2013. Revised on May 30, 2013. Accepted on June 19, 2013)

**Abstract** Polar pesticides like pymetrozine ( $\log P_{ow}$ : -0.18) are known to be difficult to analyze. The analytical method of pymetrozine using hydromatrix included in the official method of KFDA was uncommon and provided ambiguous evidence to confirm both the identity and the quantity. Therefore, precise single residue analytical method was developed in representative crops for using liquid-liquid extraction (LLE). The pymetrozine residue was extracted with methanol from 11 representative crops which comprised apple, blueberry, broccoli, cabbage, cherry, crown daisy, hulled rice, Korean cabbage, potato, rice and watermelon. The extract was purified serially by liquid-liquid extraction (LLE) and silica solid phase extraction (SPE). For rice and hulled rice samples, *n*-hexane partition was additionally adopted to remove nonpolar interferences, mainly lipids. The residue levels were analyzed by HPLC with DAD, using C<sub>8</sub> column. LOQ (limit of quantitation) of pymetrozine was 1 ng (S/N > 10) and MQL (method quantitation limit) was 0.01 mg/kg. Mean recoveries from 11 crop samples fortified at three levels (MQL, 10 × MQL and 50 × MQL) in triplicate were in the range of 83.1~98.5% with coefficients of variation (CV) of less than 10%, regardless of sample type, which satisfies the criteria of KFDA. The method established in this study could be applied to most of crops as an official and general method for analysis of pymetrozine residue.

**Key words** Analysis, LLE (liquid-liquid extraction), Pymetrozine, Residue

## 서 론

잔류농약분석은 화학분석 중에서도 미량분석 분야이며 현재 식품 중 잔류농약의 허용기준은 0.005~50 mg/kg 범위가므로 잔류농약분석법은 허용기준 이하를 충분히 검출하도록 감도가 높아야 한다. 또한 분석결과가 대부분 공공의 목적으로 사용되므로 높은 신뢰성을 아울러 요구하고 있다. 따라서 식품 중 잔류농약 수준을 검사, 평가하여 안전성을 확보하기 위해서는 정확하고 신뢰성 있는 잔류농약 분석법의 확립이 필수적이다. 그리고 동일한 분석성분이라도 검체의

종류에 따라 추출효율, 방해물질의 종류 및 양이 매우 상이하므로 분석하고자 하는 검체의 종류에 따라 신중한 분석법의 선택이 요구 된다(Korea Food & Drug Administration, 2012).

Pymetrozine [(*E*)-4,5-dihydro-6-methyl-4-(3-pyridylmethyleneamino)-1,2,4-triazin-3(2*H*)-one]은 피리딘아조메틴계의 침투이행성 살충제로서, 흡습해충, 특히 진딧물에 탁월한 방제효과를 발휘한다(Fuog 등, 1998; Harrewijin 등, 1997; Kayser 등, 1994; Kristinsson, 1994). 수박, 쌀, 감자, 고추, 오이, 취나물, 겨자채 등에서 진딧물류와 멸구류의 방제에 사용되고 있으며(Korea Crop Protection Council, 2012), 2013년 6월 현재 0.03~3.0 mg/kg 범위로 잔류허용기준(MRLs, Maximum Residue Limits)이 설정되어 있다(Korea

\*Corresponding author

Tel: +82-42-821-6735, Fax: +82-42-822-5781

E-mail: kslee@cnu.ac.kr

Food & Drug Administration, 2012). Pymetrozine의 물리화학적 특성을 살펴보면 *n*-octanol/water 분배계수(log  $P_{ow}$ )가 -0.18이며, 수용해도가 0.29 g/L인 극성 화합물로 검체로부터 이런 분석대상농약의 회수율을 높이는 것은 매우 어렵다. 현재 국내 식품공전에서는 log  $P_{ow}$ 가 -3.55(Mepiquat chloride) ~2.0 범위인 70종의 극성농약에 대하여 대부분 대상성분의 서로 섞이지 않는 두 용매 간 분배계수의 차이를 이용하여 불순물을 제거하는 방법인 액-액 분배법을 이용하는 방법이 제시되어 있으며, 유일하게 pymetrozine 분석 시 hydromatrix 분배법을 이용하도록 고시되어 있다. 이 hydromatrix 분배법은 solid phase extraction(SPE) 컬럼의 일종으로 친수성 물질은 흡착하고 소수성 물질을 추출하는 성질을 가지고 있는 표면적이 넓은 입자로 되어 있는 다공성 구조토를 충전제로 사용 한다(Korea Food & Drug Administration, 2012).

잔류농약분석 시 일반적인 액-액 분배법에서는 발암가능성 물질로 알려진 dichloromethane을 많이 사용하기 때문에 잔류농약 분석자의 안전을 위협하며 추출 후 남은 폐액의 처리에도 환경오염을 유발할 수 있는 문제점이 있을 수 있지만(Hwang 등, 2011), hydromatrix 분배법을 적용하면 이와 같은 dichloromethane의 문제점을 해결할 수 있을 뿐 아니라, 액-액 분배법에서 층 분리가 어려운 경우에도 적용이 가능한 장점이 있다. 그러나 Hong 등(2012)은 hydromatrix 분배법과 액-액 분배법을 비교하여 추출효율을 분석한 결과 회수율과 변이계수 측면에서 액-액 분배법을 이용한 분석이 타당하다고 보고하였다. 또한 액-액 분배법을 이용하여 농산물 또는 토양 중 pymetrozine 잔류량을 분석한 방법이 보고되었으며(Guoqing 등, 2009; Zhang 등, 2007), Cun 등(2011)은 농토양과 토양수 중 pymetrozine을  $C_{18}$  SPE cartridge를 이용하여 분석하는 방법을 제시하였으나, hydromatrix 분배법을 이용한 pymetrozine 잔류분석에 관한 논문은 전무한 실정이다.

액-액 분배법은 다소 많은 시간과 노력을 필요로 하지만, 앞서 분석자의 자질에 따라 발생될 수 있는 오차 및 오류가 덜하며, 확실한 간섭물질의 제거와 높은 분리효율 및 회수율을 보고한 바, 선행 연구 중 Hong 등(2012)의 액-액 분배법을 이용한 분석방법으로 사과, 감자, 배추, 썩갯, 현미 그리고 대두, 6종의 농산물 시료에 대하여 적용해본 결과, 회수율이 52.6~74.2% 수준으로 만족할 만한 회수율을 얻을 수 없었기에, 다양한 작물에 대해 적용가능한 적절한 분석방법이 필요할 것으로 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 Hong 등(2012)의 연구 논문을 변형, 액-액 분배법을 이용한 분석 시 회수율을 향상시키고 보편적이고 일반적인 신뢰성 높은 분석법으로 개선하여 pymetrozine이 사용되는 다양한 작물에 대해 적용성을 확보함으로써 pymetrozine 잔류분석의 범용성과 효율성을 극대화하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기구

Pymetrozine(순도 99.9%)의 분석용 표준품을 Dr. Ehrenstorfer(Germany)사의 것을 구입하여 사용하였다. Hydromatrix는 Varian Inc.(USA)사로부터 구입하여 수분을 제거한 후 사용하였다. Silica gel(0.063~0.200 mm, 잔류분 석용)은 Merck(Germany)사로부터 구입하여 130°C에서 하룻밤 가열하여 탈수시킨 후 활성화하여 사용하였으며, silica SPE cartridge(1 g, 6 mL)와 florisil SPE cartridge(1 g, 6 mL)는 Phenomenex(USA)사로부터 구입하여 사용하였다. Dichloromethane, ethyl acetate, *n*-hexane, methanol은 HPLC급을 J. T. Baker(USA)사로부터 구입하여 사용하였으며, sodium chloride, 무수 sodium sulfate 및 기타 무기시약은 GR급으로 Junsei Chemical Co.(Japan)에서 구입하여 사용하였다. 시료 전처리를 위한 분쇄기는 Blixer 4(Robot Coupe, USA)를 이용하였으며, 진탕기(Vision Scientific Co., Korea) 및 감압농축기(Eyela N-N series, Japan)는 시료 추출 및 추출액 농축 시 사용하였다. 또한 membrane filter(PVDF, 0.45  $\mu$ m  $\times$  25 mm)는 Whatman(UK)사로부터 구입하여 사용하였다.

### 기존 고시 분석법 검토

식품공전상에 고시되어 있는 pymetrozine 잔류분석법에 따라 무농약 사과, 감자, 배추 및 현미 시료를 대상으로 실시하였으며 기기분석은 HPLC-DAD를 사용하였고, 분석조건은 Table 1과 같다.

### 선행 연구 방법의 적용

선행 연구 중 Hong 등(2012)의 액-액 분배법을 이용한 분석방법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위하여 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 무농약 사과, 감자, 배추, 썩갯, 현미 및 대두 시료를 마쇄하고 20 g을 칭량한 후, 0.1 mg/L 및 0.5 mg/L이 되도록 pymetrozine 표준용액을 처리하여 60 mL의 methanol과 0.05 M-borax 완충용액 7 mL를 가하고 1시간 동안 진탕 추출하였다. 진탕이 끝난 균질시료를 Whatman GF/A filter paper와 celite 545를 이용해 흡인여과한 후 20 mL의 methanol로 용기 및 잔사를 씻어 앞의 여과액과 합하여 40°C 이하에서 methanol을 증발, 제거하여 약 10 mL로 감압농축하였다. 농축액을 250 mL의 분액여두에 옮겨 1차 분배 시 3 mL, 2차 분배 시 2 mL의 포화식염수를 가하고 dichloromethane 40 mL로 4회 분배하였다. 유기용매층을 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하고 감압농축한 후, methanol:ethyl acetate(7:93, v/v) 2 mL로 용해하였다. 상기 용해액 전량을 florisil SPE cartridge에 가하고, methanol:ethyl acetate(7:93, v/v) 4 mL로 세척한 다음

**Table 1.** HPLC operating condition for the analysis of pymetrozine

	Hydromatrix	Hong et al. (2012)	LLE
Instrument		Shimadzu SCL-10Avp	
Detector		Diode array detector (DAD)	
Column	ZORBAX Eclipse Plus C <sub>8</sub> (4.6 i.d. × 250 mm, 5 μm, Agilent, USA)	Phenomenex Luna C <sub>8</sub> (4.6 i.d. × 250 mm, 5 μm)	ZORBAX Eclipse Plus C <sub>8</sub> (4.6 i.d. × 250 mm, 5 μm, Agilent, USA)
Column temp.		40°C	
Mobile phase	Water:methanol (85:15, v/v)	Water:Methanol (70:30, v/v)	Water:Methanol (71:29, v/v) <sup>a)</sup> Water:methanol (75:25, v/v) <sup>b)</sup> Water:methanol (80:20, v/v) <sup>c)</sup>
Flow rate		1 mL/min	
Injection vol.		20 μL	
Wavelength	300 nm	298 nm	296 nm

<sup>a)</sup>Apple, <sup>b)</sup>Blueberry, broccoli, cabbage, crown daisy, hulled rice, Korean cabbage, potato, rice and watermelon, <sup>c)</sup>Cherry.

methanol:ethyl acetate(30:70, v/v) 8 mL로 용출시켰다. 용출액을 감압농축한 후 건조물에 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고 borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 HPLC에 20 μL를 주입하였다. 6종의 농산물 시료 중 pymetrozine의 분석은 HPLC-DAD를 사용하였고, 분석조건은 Table 1과 같다.

## Pymetrozine 분석방법 연구

### 대표작물 선정

본 연구의 분석대상 대표 농산물은 식품 중 농약잔류허용기준에 pymetrozine을 대상성분으로 등록되어 있는 농산물 23종(Korea Food & Drug Administration, 2012)과 Codex Alimentarius Commission에서 정한 농산물 부류별 대표시료 분류표(CAC, 2003)를 참조하여 곡류에서는 쌀과 현미, 채소류에서 감자, 고추, 브로콜리, 배추, 수박 및 쑥갓, 과실류에서는 블루베리, 체리 및 사과를 대표시료로 선정하였다. 농산물별 무농약 시료는 대형마트에서 유기농 인증시료를 구입한 후 식품공전(Korea Food & Drug Administration, 2012)상 검체 처리방법에 따라 전처리하여 -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였으며, 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인한 후 사용하였다.

### 기기분석조건

Pymetrozine의 기기분석은 diode array detector(DAD)가 장착된 Shimadzu SCL-10Avp HPLC(Shimadzu, Japan)를 사용하였으며, pymetrozine의 최대 흡수파장을 알아보기 위해 230 nm에서 300 nm까지의 파장을 주사한 결과 296 nm에서 최대 흡수를 나타내었으므로, HPLC에서 검출기에 의한 정량분석 파장은 296 nm로 하였다(Table 1).

### Pymetrozine의 검출한계 및 정량한계 측정

Pymetrozine 표준용액 0.01, 0.05, 0.1 mg/L을 20 μL씩

HPLC에 주입하여 크로마토그램 상의 signal과 noise의 비를 구하여 검출한계(LOD; Limit Of Detection) 및 정량한계(LOQ; Limit of Quantitation)를 설정하였다.

### 재현성(Reproducibility) 검증

Pymetrozine 표준용액 0.05 mg/L을 20 μL씩 HPLC에 10번 주입하여 크로마토그램 상의 머무름 시간( $t_r$ ) 및 peak의 면적 및 높이의 변이를 비교 검토하여 분석기기의 재현성을 평가하였다.

### 표준검량선 작성

Pymetrozine 표준품을 methanol:borax 완충용액(50:50, v/v) 혼합용액으로 녹여 1,000 mg/L의 농도로 조제한 stock solution을 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 및 5 mg/L의 농도가 되도록 차례로 희석한 후 20 μL씩 HPLC에 주입하여 나타난 크로마토그램 상의 peak 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다.

### 정제조건 확립

#### 가. Silica gel column을 이용한 정제

내경 1.1 cm, 길이 30 cm의 유리 깔럼에 10 g의 silica gel과 그 위에 1 cm 높이로 무수 sodium sulfate를 차례로 습식 충전하고 50 mL의 ethyl acetate를 통과시켜 활성화 시킨 후, pymetrozine 표준용액(2 mg/L) 1 mL를 가하였다. 5%, 10%, 20%, 30%의 methanol/ethyl acetate 혼합용액을 각각 30 mL씩 3회 용출시켰으며, 각 용출액을 농축시킨 후 건조물에 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고, borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 HPLC로 분석하여 용출액의 조성별 pymetrozine의 회수율을 검토하였다.

#### 나. Solid-phase extraction(SPE) cartridge를 이용한 정제

Silica SPE cartridge(1 g, 6 mL)를 ethyl acetate 5 mL로

활성화 시킨 후, pymetrozine 표준용액(2 mg/L) 1 mL을 가하였다. 5%, 10%, 20%, 30%의 methanol/ethyl acetate 혼합 용액을 각각 3 mL씩 3회 용출시켰으며, 각 용출액을 농축시킨 후 건조물에 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고, borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 HPLC로 분석하여 용출액의 조성별 pymetrozine의 회수율을 검토하였다.

#### 분배조건별 분배효율 검증

80 mL의 methanol에 pymetrozine 표준용액(2 mg/L) 1 mL와 borax 완충용액 20 mL를 넣은 뒤 40°C 이하에서 methanol을 증발 제거하여 약 20 mL로 농축하였고, 농축액에 포화식염수 10 mL 및 증류수 20 mL를 첨가한 후 250 mL 용량의 분액여두에 옮겨 dichloromethane 50 mL로 3회 분배, dichloromethane 70 mL로 3회 분배, 각각 처리를 달리하여 추출하였다. 또한 농축액에 증류수를 가하지 않고 포화식염수 10 mL만을 첨가한 후 250 mL 용량의 분액여두에 옮겨 dichloromethane 50 mL로 3회 분배, dichloromethane 70 mL로 3회 분배, dichloromethane 70, 50, 30 mL로 분배, dichloromethane 100, 30, 30 mL로 분배, 각각 처리를 달리하여 추출하였다. 분배 추출액을 무수 sodium sulfate에 통과 시켜 수분을 제거하고 40°C 이하에서 감압농축 한 후, 건조물을 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고 borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 HPLC로 분석하였으며 회수율을 검토하였다.

한편, 현미와 같이 비극성인 지용성 물질이 다량 함유되어 있는 농산물의 비극성 유지성분의 제거를 위한 추가적 액-액 분배과정의 효율을 검토하였다. 80 mL의 methanol에 pymetrozine 표준용액(2 mg/L) 1 mL와 borax 완충용액 20 mL를 넣은 뒤 40°C 이하에서 methanol을 증발 제거하여 약 20 mL로 농축하였고, 농축액에 포화식염수 10 mL를 첨가한 후 250 mL 용량의 분액여두에 옮겨 *n*-hexane 50 mL로 1회 분배하였다. 수용액층을 다시 dichloromethane 80, 50, 30 mL로 분배하여 추출액을 무수 sodium sulfate 20 g에 통과 시켜 수분을 제거하고 40°C 이하에서 감압농축한 후 건조물을 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고, borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 HPLC로 분석하였으며 회수율을 검토하였다.

#### 추출조건의 확립

마쇄한 체리시료 20 g에 pymetrozine 표준용액(2 mg/L) 1 mL를 첨가하여 1시간 방치하였다. Borax 완충용액 20 mL를 넣은 다음 1 N-NaOH를 첨가하여 추출용매로 methanol 80 mL를 가하고 1시간 동안 진탕추출한 다음 흡인여과하였다. 잔사를 40°C 이하에서 methanol을 증발, 제거하여 약 20 mL로 감압농축하였다. NaCl 6 g을 첨가하여 20분간 진탕한 후 분액여두에 옮겨 dichloromethane 80, 50, 30 mL로

차례로 분배추출하였다. 분배 추출액을 감압농축하여 methanol:ethyl acetate(10:90, v/v) 2 mL로 용해하였다. 상기 용해액 전량을 methanol:ethyl acetate(10:90, v/v) 5 mL를 통과시켜 활성화시킨 Silica SPE cartridge에 첨가하고, methanol:ethyl acetate(10:90, v/v) 8 mL로 세척한 다음, methanol:ethyl acetate(30:70, v/v) 8 mL로 용출시켰다. 용출액을 감압농축한 후 건조물에 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고 borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 membrane filter(PVDF, 0.45 μm)를 통과시켜 여과한 후 HPLC로 분석하여 pymetrozine의 회수율을 측정하였다.

#### 분석정량한계(MQL; Method Quantitative Limit)의 산출

분석법의 정량한계는 분석기기의 정량한계(LOQ)와 시료량 및 분석과정 중의 회석배율을 고려하여 식 (1)에 의하여 산출하였다.

$$\text{MQL} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{정량한계}(\text{ng}) \times \text{기기주입전시료용액량}(\text{mL}) \times \text{회석배수}}{\text{기기주입량}(\mu\text{L}) \times \text{시료량}(\text{g})} \quad (1)$$

#### 개선 분석법의 회수율 검증

본 연구에서 확립한 pymetrozine 잔류분석법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위하여 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 무농약 농산물 시료(쌀, 현미, 감자, 고추, 배추, 브로콜리, 수박, 쪽감, 사과, 블루베리 및 체리)를 마쇄하고 시료 20 g에 pymetrozine 표준용액을 MQL 수준, MQL의 10배 및 50배 수준이 되도록 첨가한 다음 상기 분석과정을 행하여 HPLC 분석 크로마토그램으로부터 얻은 peak의 면적을 표준검량선에 대입하여 시료에 대한 pymetrozine의 양을 산출한 다음 회수율을 구하였다. 또한 모든 실험은 3반복으로 수행하였고, 상대표준편차(RSD)와 변이계수(CV)를 계산하여 그 결과를 바탕으로 실험의 정확도와 정밀도를 나타내었다.

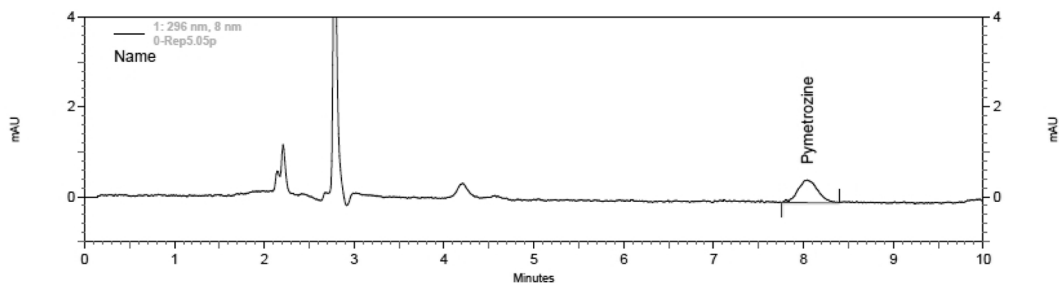
## 결과 및 고찰

#### 기존 고시 분석법 및 선행 연구 방법 적용 시 회수율 검증

식품공전에 pymetrozine을 대상농약으로 고시되어 있는 분석법에 따라 hydromatrix 분배법을 이용하여 사과, 감자, 배추 및 현미 4종의 농산물 시료에 대하여 회수율시험을 한 결과 사과의 경우 31.0~36.3%, 감자의 경우 44.9~46.1%, 배추의 경우 27.3~41.2% 그리고 현미의 경우 39.6~51.9%로 낮은 회수율을 나타내었다. 또한 silica SPE 정제 시 식품공전에 고시되어있는 용출용매인 methanol:ethyl acetate (5:95, v/v) 20 mL로 용출시켰을 때 대상성분이 검출되지 않았기 때문에 methanol:ethyl acetate (30:70, v/v) 8 mL로 용출시켰다. Pymetrozine 표준용액(2 mg/L)을 가하여 회수율

**Table 2.** LOQ and reproducibility in pymetrozine analysis

LOQ	Reproducibility			
		Retention time ( $t_r$ )	Area	Height
0.05 mg/L	Min.	8.0	7556.0	730.0
	Max.	8.1	8192.0	766.0
	Mean	8.0	8061.4	748.2
	SD	0.0	204.5	11.5
	CV (%)	0.3	2.5	1.5

**Fig. 1.** LOQ for pymetrozine standard (0.05 mg/L).

시험을 하였을 때 회수율이 98% 이상이었으나 작물에 적용 시 ethyl acetate 100 mL로 3회 분배하였음에도 매우 낮은 회수율을 보인 것인 시료가 함유하고 있는 간섭물질의 영향인 것으로 판단되어 지며, 또한 정제 시 최적의 용출용매 체계가 필요하다고 판단되어진다.

선행 연구 중 Hong 등(2012)의 pymetrozine 분석법을 사과, 감자, 배추, 쪽갓, 현미 및 대두, 6종의 농산물 시료에 대하여 적용해본 결과 회수율이 사과의 경우 67.7~69.8%, 감자의 경우 61.7~67.9%, 배추의 경우 60.0~65.1%, 쪽갓의 경우 52.6~60.8%, 현미의 경우 66.8~74.2% 그리고 대두의 경우 67.5~69.6% 수준으로 만족할 만한 회수율을 얻을 수 없었다. Hong 등(2012)은 취나물 중 pymetrozine 잔류량을 같은 방법으로 분석하였을 때 91.8%의 회수율을 얻었다고 보고하였다. 또한, Guoqing 등(2009)은 브로콜리에서 액-액 분배법을 이용하여 분석한 결과 90.8%의 회수율 결과를 얻었으며, Zhang 등(2007)은 액-액 분배법을 이용하여 담배잎 중 pymetrozine 잔류량을 분석하였을 때 91.6%의 회수율을 얻었다고 보고하였다.

선행 연구결과들은 분석대상이 특정한 시료에 대한 농약의 잔류성을 평가하기 위해 수행되어진 단편적인 결과들이기 때문에, 다양한 작물을 대상으로 실험을 수행하는 경우에는 작물별로 회수율이 대체로 낮게 나타나는 것이라고 보았다. 따라서 작물의 특성과 대상성분의 물리화학적 성질을 고려하여 더 정밀하고, 다양한 작물에 대해 적용가능한 적절한 분석방법이 필요하다고 확신하였다.

#### 분석기기의 검출한계, 정량한계 및 재현성 평가

다양한 농도의 pymetrozine의 표준용액을 분석하여 S/N 비를 계산한 결과 정량한계( $S/N \geq 10$ )는 1 ng( $LOD = 1/3LOQ$ , 0.03 ng)이었으며, 분석의 재현성을 알아보기 위해 본 연구에서 설정한 정량한계의 양(1 ng)을 10번 분석한 결과 머무름 시간( $t_r$ ), peak의 면적 및 높이의 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 2).

#### 검량선의 직선성 확인

Pymetrozine 표준품을 methanol로 제조하여 HPLC로 분석할 때 peak의 분리가 불량하여 분석이 어려움이 있었다. 따라서 borax 완충용액을 함께 가해주어 pymetrozine의 이온화를 억제함으로써 해결할 수 있었다. 이는 이동상 용매로 인해 pymetrozine이 가수분해 혹은 양이온화되어 peak의 분리가 불량해지므로 ammonium acetate 완충용액을 기기 주입 전 최종 정용액과 이동상 혼합용매로 이용한 Zhang 등(2007)의 연구보고와 일치하였다.

Pymetrozine의 농도별 표준회석용액(0.05~5 mg/L) 각 20  $\mu$ L씩을 HPLC에 주입 후 얻어진 크로마토그램의 peak 면적으로 표준검량선을 작성한 결과 검량선의 회귀방정식은  $y = 149,172.9x + 2,597.6$ 이었다. 또한 검량선 작성을 위한 농도 범위(0.05~5 mg/L)에서 결정계수(Coefficient of determination,  $R^2$ )가 0.999이상으로 직선성을 보여 peak의 면적과 표준용액 농도 간에 높은 상관관계를 나타내었다.

**Table 3.** Efficiency of liquid-liquid partition with different solvent conditions

	Recovery (%)			
	1st	2nd	3rd	Total
Partition I <sup>a)</sup>	39.8	23.5	12.1	75.3
Partition II	54.2	24.3	9.8	88.3
Partition III	68.7	19.4	4.8	92.8
Partition IV	78.1	15.4	3.1	96.6
Partition V	73.8	14.6	3.0	91.3
Partition VI	84.4	9.2	2.7	96.2
Partition VII	0	0	0	0
Partition VIII	83.9	7.9	3.2	94.9

<sup>a)</sup>Mixture partition solvents:

I: 10 mL sat. NaCl + 20 mL distilled water + 50 mL dichloromethane (× 3 times)

II: 10 mL sat. NaCl + 20 mL distilled water + 70 mL dichloromethane (× 3 times)

III: 10 mL sat. NaCl + 50 mL dichloromethane (× 3 times)

IV: 10 mL sat. NaCl + 70 mL dichloromethane (× 3 times)

V: 10 mL sat. NaCl + 70, 50, 30 mL dichloromethane

VI: 10 mL sat. NaCl + 100, 30, 30 mL dichloromethane

VII: 10 mL sat. NaCl + 50 mL *n*-hexane (× 3 times)

VIII: After 50 mL *n*-hexane partition, 10 mL sat. NaCl + 80, 50, 30 mL dichloromethane.

### Silica 흡착 크로마토그래피 정제조건 최적화

Pymetrozine 분석 시 기기분석이 가능하도록 분배 추출액을 최종적으로 정제하기 위해 국내 식품공전에서는 silica SPE를 이용하여 methanol:ethyl acetate 혼합용매로 용출하는 방법을 고시하고 있다. Hong 등(2012)은 methanol:ethyl acetate 혼합용매로 용출하는 방법으로 florisil SPE를 이용하였으며, Guoqing 등(2009)은 silica gel을 이용한 정제방법으로 ethyl acetate를 용출용매로 이용하였다. 또한 Cun 등(2011)은 C<sub>18</sub> SPE cartridge를 이용한 정제방법으로 methanol: water 혼합용매체계를 이용하였다.

본 연구에서는 pymetrozine은 극성이 높으므로 florisil이나 alumina보다 흡착력이 상대적으로 약한 silica gel을 흡착제로 선정하였다(Lee 등, 2010). 용출용매로는 methanol:ethyl acetate 혼합용매체계를 변경하여 최적의 용출조건을 확립하고자 예비실험을 수행하였다. 그 결과 5~10% methanol:ethyl acetate(v/v) 혼합용액을 흘려주었을 때 농약 성분이 검출되지 않았으며, methanol:ethyl acetate(30:70, v/v) 혼합용액을 흘려주었을 때 98% 이상의 회수율을 보였다.

위의 결과를 토대로 용출체계는 시료 추출액 주입 후 먼저 methanol:ethyl acetate(10:90, v/v) 혼합용액을 가하여 대상성분보다 빠르게 용출되는 불순물을 제거하고, 연속하여 methanol:ethyl acetate(30:70, v/v) 혼합용액을 흘려 대상성분을 용출시키는 silica gel 흡착 크로마토그래피를 확립하였다. 한편, 농산물 시료에 적용 시 silica gel 칼럼과 silica SPE cartridge 정제조건을 비교하였을 때 큰 차이가 없는 것으로 평가 되어 정제방법을 간소화하고, 다양한 작물에도 적용이 가능한 최적의 정제방법으로 silica SPE cartridge를

이용한 방법을 결정하였다.

### 분배과정 확립

농산물 추출액으로부터 pymetrozine 성분 외에 함께 추출되는 농산물 유래 방해물질을 1차적으로 제거하기 위해 액-액 분배법을 사용하였다. 대상성분의 액-액 분배조건에 따른 분배효율을 조사한 결과(Table 3) 분획용매 III조건인 dichloromethane 50 mL로 3회 분배추출하였을 때 처음 1회 분배 회수율은 39.8%, 분획용매 IV조건인 dichloromethane 70 mL로 3회 분배추출하였을 때 처음 1회 분배 회수율은 78.1%, 분획용매 VI조건인 dichloromethane 100, 30, 30 mL로 분배추출하였을 때 1회 분배 회수율은 84.4%로 처음 1회 분배 시 가해진 dichloromethane의 양이 많을수록 회수율이 더 높았다. 또한, 분획용매 II조건인 증류수를 가해주었을 때 회수율은 88.3%였으며, 분획용매 IV조건인 증류수를 가하지 않을 때의 회수율은 96.6%로, 분획용매 IV조건이 분획용매 II조건보다 높은 회수율을 나타내었다.

Pymetrozine은 log P<sub>ow</sub>가 -0.18이며, 수용해도가 0.29 g/L인 극성화합물로, 분획용매에 극성이 높은 수분의 비율이 높아질수록 상대적으로 대상성분의 dichloromethane층으로의 분배율이 낮아지므로 농산물 시료 적용 시 시료 자체 수분함량을 감안하여 포화식염수 대신 NaCl을 가하여 salting-out 효과와 이온강도를 높여 분배효율을 높여주었다. NaCl의 수용해도는 359 g/L로 본 연구에서 분배 전 추출액을 약 20 mL로 감압농축하므로 그 양을 고려하여 NaCl을 가해주었을 때 분배효율을 조사한 결과 NaCl 7 g을 가하여 20분간 진탕한 뒤 dichloromethane 80, 50, 30 mL를 차례로 가하여

분배추출하는 것을 최종 분배조건으로 결정하였다. Hong 등(2012)은 dichloromethane 40 mL로 4회 분배, Zhang 등(2007)은 dichloromethane 50 mL로 4회 분배하였는데, 이 방법들 보다는 dichloromethane 80, 50, 30 mL을 차례로 가하여 분배하는 것이 시간과 인력의 소모성 면에서 효율성이 더 높다고 판단되었다.

대상시료 중 쌀과 현미는 유지 함량이 1~3% 정도인 시료이므로 이러한 유지성분의 제거를 위하여 *n*-hexane 50 mL로 4회 분배추출하였을 때 유기용매층에서 분석 대상성분이 전혀 추출되지 않았으므로, 먼저 *n*-hexane 50 mL로 1회 분배한 후 수용액층을 dichloromethane 80, 50, 30 mL로 분배추출하였을 때 회수율은 94.9%수준으로 양호하여 유지성분을 효율적으로 제거할 수 있었다.

### 시료 추출과정 확립

농산물 시료로부터 pymetrozine을 추출하기 위한 용매로는 대상성분이 극성이 높은 화합물이기 때문에 acetone이나 acetonitrile 보다는 극성이 높은 methanol을 사용하였다. 또한 pymetrozine은 짝산의 pKa가 4.06인 약한 염기성 화합물로 약염기성 완충용액을 가해 pH를 조절하여 이온화를 억제, 유기용매 가용성이 되도록 해야 한다(Korea Food & Drug Administration, 2012). 국내 식품공전상에서는 시료에 borax 완충용액을 가하고 methanol로 추출하도록 고시되어 있으며(Korea Food & Drug Administration, 2012), Cun 등(2011)은 시료에 methanol:water:ammonium hydroxide(80:20:0.2, v/v/v) 50 mL를 가하여 추출하였으며, Zhang 등(2007)은 추출 후 농축 건고물을 ammonium acetate 완충용액에 재용한 후 1 M-NaOH 2 mL를 가하여 액-액 분배를 실시하였다.

본 연구에서는 pH 조절을 위해 borax 완충용액 20 mL를 가하였다. 한편, 시료를 진탕추출한 후 pH 측정을 한 결과 쌀, 현미, 감자, 배추, 고추, 쑥갓 및 수박은 pH가 7 이상이었으나, 사과, 블루베리 및 체리의 경우 pH가 각각 6.5, 4.6, 5.8로 산성 시료이기 때문에, 1 N-NaOH를 첨가하여 pH를 7 이상으로 조절하여 protonation을 억제하여 추출효율을 높여주었다.

### 분석정량한계의 산출

분석정량한계(MQL)는 정량한계, 시료량 및 분석과정 중 회석배율 등을 감안하여 산출한 수치로서(식 (1)), 연구에서 사용한 분석방법으로 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계를 의미하며, 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서에서는 잔류농약 분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 농약잔류허용기준(MRL)의 1/2 이하까지 검출이 가능하도록 추천하고 있다(Korea Food & Drug Administration, 2012). 본 연구 분석법의 정량한계(식 (2))는 0.01 mg/kg으로서 잔류분석법 기

준에 적합하였고, pymetrozine에 대하여 설정한 농약잔류허용기준은 0.03~3.0 mg/kg이므로 농약잔류허용기준의 1/2 이하까지 검출이 가능하였다.

$$\frac{1 \text{ (ng)} \times 4 \text{ (mL)}}{20 \text{ (\mu L)} \times 20 \text{ (g)}} = 0.01 \text{ (mg/kg)} \quad (2)$$

### Pymetrozine 분석방법의 확립

위와 같은 실험결과들을 바탕으로 농산물 시료 중 액-액 분배법을 이용한 pymetrozine 잔류분석방법을 확립하였다. 즉, 쌀, 현미, 감자, 고추, 배추, 브로콜리, 수박, 쑥갓, 사과, 블루베리 및 체리 중 pymetrozine의 분석방법은 methanol 80 mL와 borax 완충용액(pH 9) 20 mL를 가하고, 사과, 브로콜리, 블루베리의 경우 시료액이 약산성으로 1 N-NaOH 수용액을 가하여 pH 조절을 한 후 1시간 동안 진탕 추출하였다. 곡류의 경우 건조 상태에서는 추출효율이 열등하므로 쌀과 현미 시료는 미리 20 mL의 borax 완충용액을 가하고 30분간 방치, 습윤화 한 후 methanol로 추출하였다. 진탕이 끝난 균질 시료를 Whatman GF/A filter paper와 celite 545를 이용해 흡인여과 한 후, 20 mL의 methanol로 용기 및 잔사를 씻어 앞의 여과액과 합하여 40°C 이하에서 methanol을 증발, 제거하여 약 20 mL로 감압농축하였다. 농축액에 NaCl 7g을 첨가한 후 20분간 진탕하여 분액여두에 옮기고 dichloromethane 80, 50, 30 mL로 차례로 분배추출하여 추출액을 합하였으며, 쌀과 현미 시료는 유지성분의 제거를 위하여 *n*-hexane 50 mL로 분배하여 수용액 층을 다시 dichloromethane 80, 50, 30 mL로 차례로 분배추출하여 추출액을 합하였다. 추출액을 무수 sodium sulfate를 통과시켜 수분을 제거하고 40°C 이하에서 감압농축한 후 건고물을 2 mL methanol:ethyl acetate(10:90, v/v)에 용해시켰다. 상기 용해액 전량을 methanol:ethyl acetate(10:90, v/v) 5 mL를 통과시켜 활성화시킨 silica SPE cartridge에 첨가하고, methanol:ethyl acetate(10:90, v/v) 8 mL로 세척한 다음, methanol:ethyl acetate(30:70, v/v) 8 mL로 용출시켰다. 용출액을 감압농축한 후 건고물에 methanol 2 mL를 가하여 잘 녹이고, borax 완충용액 2 mL를 첨가하여 재용해한 후 membrane filter(PVDF, 0.45 μm)를 통과시켜 여과하여 HPLC로 분석하였다.

### 개선분석법의 회수율 검증

본 연구에서는 마쇄한 쌀, 현미, 감자, 고추, 배추, 브로콜리, 수박, 쑥갓, 블루베리, 체리 및 사과 무처리 시료에 pymetrozine 표준용액을 MQL 수준과 MQL 수준의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가한 후 앞서 확립된 분석방법으로 3회 반복하여 회수율을 시험한 결과(Table 4) MQL 수준에서는 83.1~97.9%, MQL 수준의 10배에서는 84.6~

**Table 4.** Recoveries and MQL for pymetrozine in crops

Crop	Fortification (mg/L)	Recovery (%) <sup>a)</sup>	CV (%) <sup>b)</sup>	MQL (mg/kg)
Rice	0.01	85.3 ± 4.8	5.7	0.01
	0.1	88.1 ± 3.8	4.3	
	0.5	94.6 ± 4.7	5.0	
Hulled rice	0.01	83.1 ± 2.1	2.5	
	0.1	86.4 ± 5.3	6.2	
	0.5	88.4 ± 5.9	6.7	
Potato	0.01	94.9 ± 8.1	8.5	
	0.1	93.3 ± 2.0	2.1	
	0.5	92.3 ± 3.6	3.9	
Green pepper	0.01	97.9 ± 4.9	5.0	
	0.1	98.2 ± 4.9	5.0	
	0.5	93.2 ± 7.7	8.3	
Korean cabbage	0.01	93.0 ± 8.2	8.8	
	0.1	95.8 ± 2.8	2.9	
	0.5	96.9 ± 3.5	3.6	
Broccoli	0.01	97.3 ± 1.7	1.7	
	0.1	93.0 ± 3.2	3.5	
	0.5	89.8 ± 5.9	6.5	
Crown daisy	0.01	95.8 ± 6.9	7.2	
	0.1	93.4 ± 7.9	8.4	
	0.5	91.6 ± 1.6	1.8	
Watermelon	0.01	97.8 ± 1.1	1.1	
	0.1	97.0 ± 1.3	1.3	
	0.5	96.7 ± 2.0	2.1	
Blueberry	0.01	95.0 ± 6.8	7.1	
	0.1	94.9 ± 0.3	0.4	
	0.5	96.5 ± 0.8	0.9	
Cherry	0.01	91.4 ± 5.3	5.8	
	0.1	84.6 ± 1.4	1.7	
	0.5	87.4 ± 1.2	1.3	
Apple	0.01	93.0 ± 1.9	2.1	
	0.1	89.1 ± 3.5	3.9	
	0.5	86.7 ± 3.0	3.5	

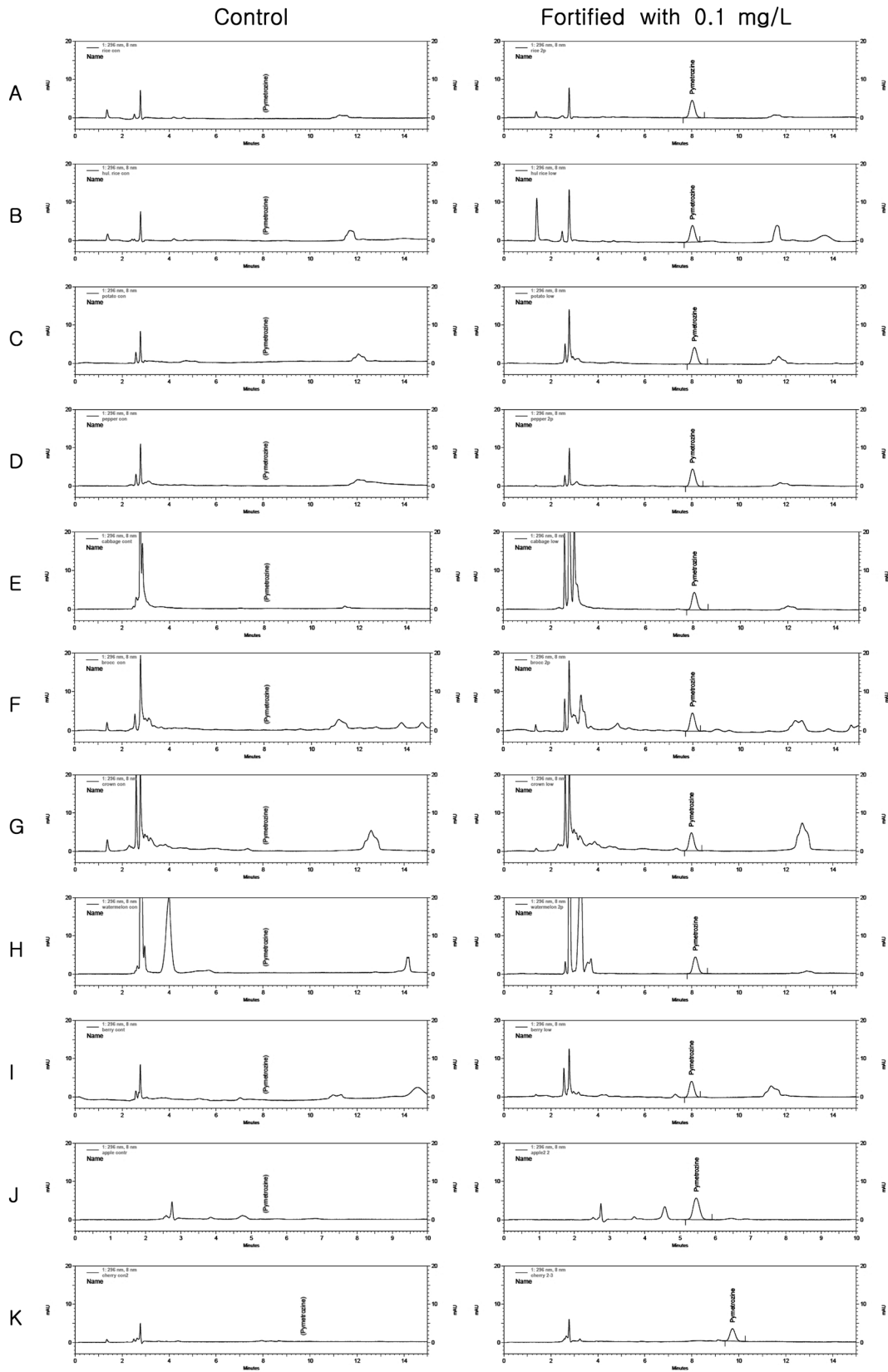
<sup>a)</sup>Mean values of triplicate samples with standard deviations.

<sup>b)</sup>CV(Coefficient of variation, %) = Standard deviation/Average × 100.

98.2%, MQL 수준의 50배에서는 86.7~96.9%로 나타나 잔류농약 분석 기준인 70~120% 이내의 회수율을 만족하였다. 변이계수(Coefficient of Variation, CV) 역시 전체 시료에서 8.8% 이하로 나타나 잔류분석 기준인 10% 이내를 만족하였

다. 한편 HPLC로 분석된 크로마토그램상에서 대상 분석성분에 영향을 주는 간섭물질은 관찰되지 않았다(Fig. 2). 따라서 이상의 결과에서 확립된 개선 분석법은 농산물에 충분히 적용이 가능함을 알 수 있었다.





**Fig. 2.** HPLC chromatograms of crop extracts for the analysis of pymetrozine residues (A, rice; B, hulled rice; C, potato; D, green pepper; E, Korean cabbage; F, broccoli; G, crown daisy; H, watermelon; I, blueberry; J, apple; K, cherry).

## Literature Cited

- Codex Alimentarius Commission (CAC) (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.
- Cun, L., Y. Ting, H. Weiguo and W. Yinliang (2011) Residue and dynamics of pymetrozine in rice field ecosystem. *Chemosphere*. 82:901~904.
- Fuog, D., S.J. Fergusson and C. Fluckiger (1998) Pymetrozine: a novel insecticide affecting aphids and whiteflies, In: Ishaaya, I. and Degheele, D.(Eds), *Insecticides with Novel Modes of Action: Mechanism and Application*, Springer, Berlin, Germany, pp.40~49.
- Guoqing, S., H. Xuan and H. Yinan (2009) Kinetic study of the degradation of the insecticide pymetrozine in a vegetable-field ecosystem. *J. Hazard. Mater.* 164:497~501.
- Harrewijin, P. and H. Kayser (1997) Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behavior. *Pestic. sci.* 49:130~140.
- Hong, J.H., C.R. Lee, J.S. Lim and K.S. Lee (2011) Comparison of analytical methods and residue patterns of pymetrozine in *Aster scaber*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87:649~652.
- Hwang, J.I., Y.H. Jeon, H.Y. Kim, J.H. Kim, J.W. Ahn, D.R. Seok, Y.J. Lee, J.Y. Park, D.H. Kim and J.E. Kim (2011) Improvement of analytical method for residue pesticides in herbal medicines using macroporous diatomaceous earth column. *Korean J. Environ. Agric.* 5(2):140~148.
- Kayser, H., L. Kaufmann and F. Schurmann (1994) Pymetrozine (CGA 215, 944): a novel compound for aphid and whitefly control. An overview of its mode of action. *Proc Brighton Crop protect conf-Pests and Diseases*, BCPC, Alton, Hants, UK, pp.737~742.
- Korea Food & Drug Administration(KFDA) (2012) MRLs for Pesticide in Foods.
- Korea Food & Drug Administration(KFDA) (2012) Practical commentary Korean Food Standards Codex pesticide residues analysis method, third ed. pp. 1-91, 449-452.
- Kristinsson, H. (1994) Pymetrozine: A new insecticide, in: Briggs, G.G. (Eds), *Advances in the Chemistry of insect Control III*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp.85~102.
- Lee, H.R., M.J. Riu, E.H. Kim, J.K. Moon, J.A. Do, J.H. Oh, K.S. Kwon, M.H. Im, Y.D. Lee and J.H. Kim (2010) Establishment of analytical method for cyprodinil residue in apple, mandarin, Korean cabbage and green pepper. 2010. *Korean J. Pestic. Sci.* 14(4):371~380.
- Tomlin, C.D.S. (2009) The pesticide manual: A world compendium, fifteenth ed., BCPC, Hampshire, UK.
- Zhang, X., X. Cheng, C. Wang, Z. Xi and Q. Li (2007) Efficient high-performance liquid chromatography with liquid-liquid partition cleanup method for the determination of pymetrozine in tobacco. *Annali di Chimica.* 97:295~301.

## 액-액 분배법을 활용한 작물 중 pymetrozine의 잔류분석법 확립

윤지영 · 문혜리 · 박재훈 · 한예훈<sup>1</sup> · 이규승\*

충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, <sup>1</sup>신젠타 코리아(주)

**요약** 액-액 분배법을 이용한 pymetrozine의 잔류분석방법을 다양한 작물에 적용이 가능하도록 작물의 특성과 대상농약의 물리화학적 특성을 고려하여 간섭물질을 최소화한 방법을 확립하였다. 확립된 분석법의 validation을 진행하였으며 정확성 및 정밀성, 검출한계, 정량한계, 직선성(표준물질의 검량선)을 기준으로 진행하였다. 대표 농산물로 쌀, 현미, 감자, 고추, 배추, 브로콜리, 수박, 썩갯, 블루베리, 사과 및 체리를 선정하였으며, 농산물 시료에 borax 완충 용액과 1N-NaOH 수용액을 가하여 pH를 조절하고 methanol로 추출된 pymetrozine 잔류분은 dichloromethane 액-액 분배법과 silica SPE cartridge를 이용한 silica 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다. Pymetrozine의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건을 확립하였고, C<sub>8</sub> 칼럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 11종의 대표 농산물 중 pymetrozine의 분석정량한계(MQL)는 0.01 mg/kg이었다. 전체 농산물에 대한 회수율은 83.1~98.5%였으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계없이 반복 간 분석오차는 10% 미만을 나타내어 잔류분석 기준이내를 만족하였다. 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 충분히 만족하였으므로, 본 연구에서 확립된 분석법은 기존의 hydromatrix 분배법을 대체하여 농산물 중 pymetrozine의 잔류분석법으로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

**색인어** 잔류분석법, 액-액 분배법, 피메트로진, 잔류분