

콩나물중 살균제 carbendazim 잔류분의 정량 및 확인

김영국* · 박종태 · 홍석순

전라남도보건환경연구원 농축산물분석과

요약 : 콩나물중 carbendazim 잔류분을 정량하고 확인할 수 있는 새로운 분석법을 확립하고자 tandem HPLC(UV & FL) 및 APcI를 source로 사용한 LC/MS를 이용하였다. 이를 위해 FL(fluorescence) 검출기를 UV(ultraviolet) 검출기와 나란히 연결하여 UV 검출기의 경우 280 nm 파장을 그리고 FL 검출기의 경우는 excitation파장과 emission파장을 각각 280 nm 와 310 nm로 설정하였다. 분석결과 carbendazim의 검출한계는 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 콩나물에 carbendazim을 0.5, 1.0 및 2.0 ppm 수준으로 첨가하여 회수율을 측정한 결과 그 평균값은 89.1%이었다. APcI source를 사용한 LC/MS 질량스펙트럼 방법은 콩나물중 carbendazim 잔류분을 최종 확인할 수 있었다. APcI LC/MS 방법은 전자충격에 의한 질량스펙트럼에 비해 훨씬 간단한 fragment를 형성할 뿐 만 아니라 carbendazim의 경우 m/z 133, m/z 159, m/z 191(M⁺)의 전형적인 fragment 이온을 형성하므로, 이 방법을 병행한다면 콩나물중 carbendazim 잔류분을 효과적으로 확인할 수 있을 것으로 사료되었다.(1998년 2월 26일 접수, 1998년 12월 1일 수리)

Key words : carbendazim, tandem HPLC, APcI LC/MS, soybean sprout.

서론

콩나물은 국민 다소비 식품으로 국민 정서가 담긴 상징성 있는 식품이다. 콩을 원료로 사용하여 발아시킨 콩나물은 계절과 장소에 관계없이 단기간에 재배가 가능하며 단백질, 비타민과 무기질의 급원으로서 우리 식생활에서 널리 식용되어 왔다.

콩나물의 재배방법을 보면 예전에는 시루에 재를 덮고 물에 불린 콩을 넣은 후 물을 적당한 간격으로 뿌려 주어 천연 콩나물을 소규모로 재배하여왔으나 점차 도시화와 산업의 발전으로 대규모로 상품화된 콩나물이 대량 생산, 보급되고 있다(김, 1982).

콩나물의 대량 재배과정중 일부 재배업자들은 부패를 방지하거나 성장을 촉진하기 위하여 농산물의 종자소독제 농약을 사용하고 있는 것으로 알려지고 있으며 이로 인한 콩나물내 농약잔류분이 식품안전성에 대한 문제를 야기하여 왔다(신 등, 1996).

Carbendazim(methyl 2-benzimidazole carbamate)은 콩나물

에 사용되는 대표적인 종자소독제인데 콩나물의 경우 특별한 가공처리 없이 전체 부위를 그대로 식용하므로 국민 건강을 해칠 수도 있다. 따라서 우리 국민들이 안심하게 먹을 수 있는 무농약 청정 콩나물이 생산되도록 하기 위해서는 철저한 콩나물 수거검사가 절실히 요구된다.

지금까지 연구된 carbendazim 잔류 분석법은 거의가 HPLC/UV를 이용하였으며, 분석 시료 역시 음용수나 농산물들을 대상으로 하고 있다(Chiba 등, 1986; Lie 등, 1990; Kiigemagi 등, 1991; Marvin 등, 1991; Dhoot 등, 1993; Singh 등, 1993). 현행 식품공전에서도 농산물에 대한 carbendazim 잔류분석법이 고시되어 있으나(보건복지부, 1996), 이 방법은 분석하는데 많은 시간이 소요되고 확인방법이 결여되어 있어 콩나물 분석업무를 맡고 있는 연구자들에게 많은 어려움이 있어 왔다.

따라서 본 연구에서는 흡광검출기(UV)와 형광검출기(FL)이 직렬연결된 tandem HPLC를 이용한 이중 정량법과 atmospheric pressure chemical ionization(APcI) LC/MS를 이용한 잔류확인법을 사용, 콩나물에 잔류된 carbendazim 농약을 신속하고 정확하게 분석하고자 하였다.

*연락처자

재료 및 방법

시약

Carbendazim 표준품은 함량이 98% 이상인 Wako社 제품을 구입, 사용 하였고 유기용매는 Junsei社의 잔류농약 분석용을, 기타 시약은 분석용 GR급을 사용하였다.

시료조제 및 정제

농산물 및 음용수 중 benzimidazole계 농약의 잔류분석에 관한 연구논문(Chiba 등, 1986; Kiigemagi 등, 1991), Pesticide Analytical Manual(PAM)시험법 그리고 日本農藥登録保留基準시험법(農藥環境保全對策研究會, 1990) 등을 검토하여 콩나물에 적용할 수 있는 carbendazim 잔류분석법을 설정하였다. 즉 콩나물 50 g을 正取하여 세절한 다음 메탄올 100 ml를 가해 10분간 진탕한 후 흡인여과 하였다. 여액은 1M HCl 10 ml로 산성화한 다음 1% NaCl 100 ml와 dichloromethane 100 ml를 가해 10분간 진탕한 후 수용액층을 취하였다. 수용액층은 1M NaCl을 사용하여 pH 7.5~8로 조정한 후 dichloromethane 100 ml와 50 ml로 2회 진탕 추출하였다. Dichloromethane층은 합쳐 무수황산나트륨으로 탈수한 다음 40°C이하의 수욕 상에서 용매를 감압하에 날려버리고 잔류물을 methanol 10 ml로 녹여 HPLC 및 APci LC/MS 분석에 사용하였다.

기기분석

조제한 시험용액은 UV검출기와 FL검출기를 직렬 연결시켜 설치한 tandem HPLC system으로 분석하였는데 그 분석 조건은 표 1과 같다.

Table 1. HPLC operating conditions for analysis of carbendazim

Instrument	TSP 1000 liquid chromatograph(USA) equipped with P4000 pump, UV1000 and FL3000 detector, As 3000 Autosampler
Column	Waters μ Bondapak C18 column(3.9 mm ID \times 300 mm L.)
Detector	UV Absorption 280 nm Fluorescence Excitation 280 nm Emission 310 nm, bandpass
Mobile phase	Methanol/water(50/50, v/v)
Flow rate	1.0 ml/min
Sample size	10 μ l

HPLC로 분석한 결과 carbendazim 검출이 의심되는 것들은 APci LC/MS를 이용하여 최종확인시험을 하였는데 이 때의 분석조건은 표 2와 같다.

Table 2. LC/MS mass spectrometer operating conditions for analysis of carbendazim

Instrument	VG Quattro II triple quadrupole mass spectrometer(UK) equipped with APci source
Mass spectra	Selected ion monitoring mode (SIM dwell = 0.08 sec, span = 0.2amu)
Source temp	150°C
Cone voltage	25 volt
Corona	3.0 kV
APci probe temp	500°C
HPLC column	Inertsil ODS(4.6 mm ID \times 250 mm L.)
Mobile phase	Acetonitrile/water(50/50, v/v)
Flow rate	1.0 ml/min

결과 및 고찰

UV/FL Tandem HPLC에 의한 Carbendazim 분석

Carbendazim의 최대 흡수파장(λ max)을 알아보기 위해 PDA (Photodiode array)검출기로 230 nm에서 330 nm까지의 파장을 주사한 결과 280 nm에서 최대 흡수를 나타내었으므로 tandem HPLC에서 UV검출기에 의한 정량분석 파장은 280 nm로 설정하였다. 한편 carbendazim의 형광 검출기에서의 최대 흡수파장을 알아보기 위해 FL 검출기로 290 nm에서 400 nm까지의 파장을 주사한 결과 excitation 파장은 280 nm, emission 파장은 310 nm에서 최대를 나타내므로 이들 파장을 tandem HPLC에서의 FL 검출기 파장으로 설정하였다.

그림 1은 carbendazim 표준품을 methanol로 2.0 ppm로 희석한 다음 UV와 FL 검출기로 동시에 분석한 chromatogram을 보여주고 있는데, carbendazim이 4.0분에서 용출되었다.

Tandem HPLC를 이용한 분석에서 carbendazim의 검출 한계는 0.1 mg/kg이었다. 콩나물 50 g에 carbendazim 0.1 ppm, 0.5 ppm 및 1.0 ppm의 표준용액 각각 1 ml씩을 처리하고 이 연구의 실험방법에 따라 실험하였을 때 농도별 회수율은 표 3과 같으며 회수율은 80% 이상, 표준오차는 5% 미만으로 나타나 분석방법이 정확하고 재현성이 우수함을 보여주었다.

그림 2는 콩나물에 carbendazim을 첨가하여 저자 등이

설정된 시험법으로 분석한 chromatogram이고, 그림 3은 실제로 수거된 콩나물을 분석하였을 때 carbendazim이 검출되었던 chromatogram의 예를 보여주고 있다.

지금까지 carbendazim이나 benomyl과 같은 benzimidazole계 농약들을 분석한 많은 연구들을(Marvin 등, 1991; American Chemical Society, 1992; Singh 등, 1993) 보면 tandem이 아닌 UV 검출기만을 단독으로 사용하는 경우가 많았다. 콩나물의 경우는 생장촉진제를 사용하여 재배한 것들도 많은데, 이들 생장촉진제 등이 UV 검출기에서 유사한 용출(머무름)시간을 갖는 경우 분석에 간섭을 유발할 가능성도 배제할 수 없는 실정이다.

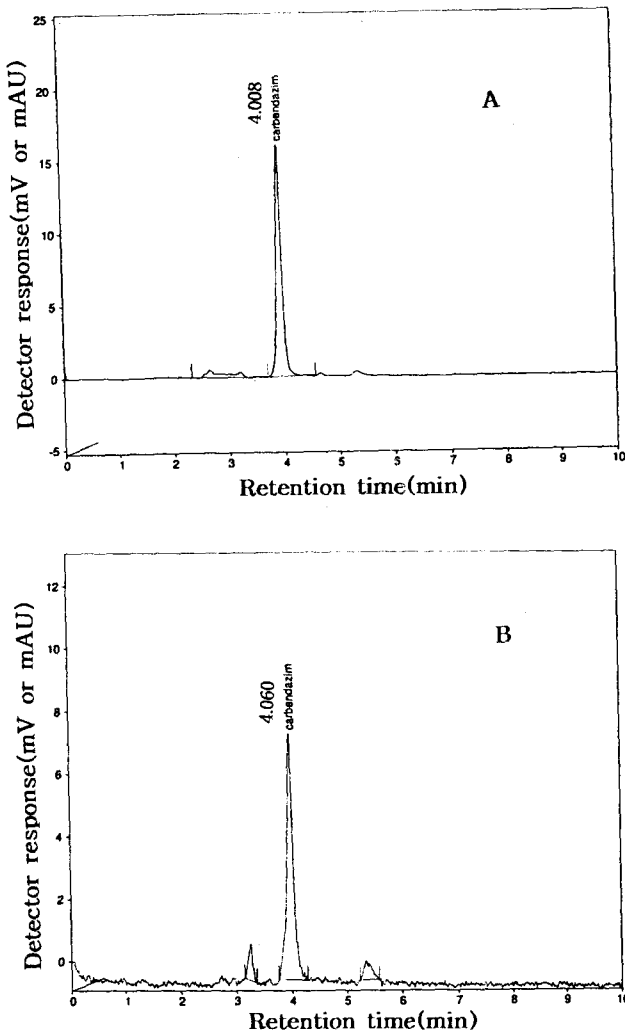


Fig. 1. Tandem HPLC(UV & FL) chromatograms of carbendazim standard.
A:UV detection, B : FL detection

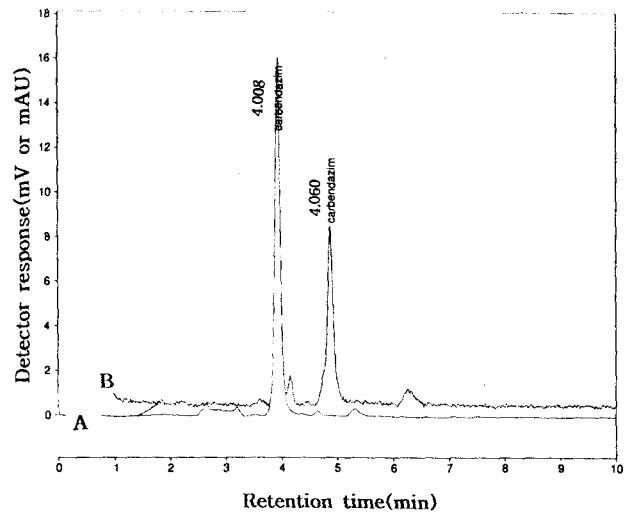


Fig. 2. Tandem HPLC(UV & FL) chromatograms of the extract of soybean sprout fortified with carbendazim at 1.0 mg /kg.
A : UV detection, B : FL detection

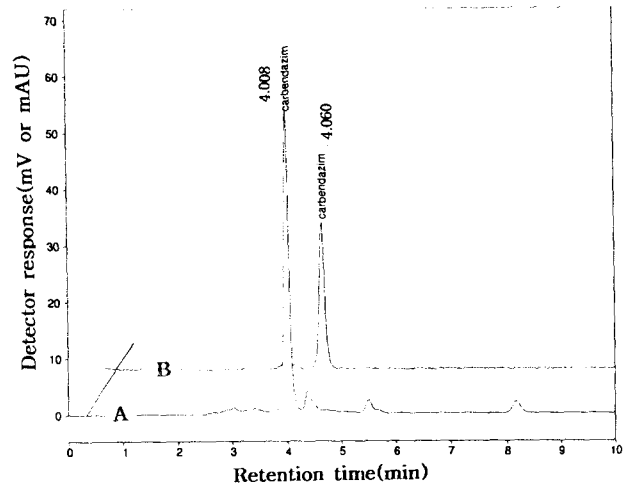


Fig. 3. Tandem HPLC(UV & FL) chromatograms of the extract of commercial soybean sprout in which carbendazim was detected.
A : UV detection, B : FL detection

Carbendazim은 강한 형광성을 갖고 있으나 생장촉진제 등은 형광성을 갖고 있지 않기 때문에 타성분의 혼입에 따른 오인을 피하기 위하여 콩나물에서의 carbendazim 분석에는 FL 검출기를 병행 사용하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

APCI LC/MS를 이용한 carbendazim 잔류분의 확인

최근에 개발된 APCI법은 corona 방전을 이용하여 열적으로 안정한 분자들을 효과적으로 이온화시켜 준다. 또한 APCI는 용매의 splitting이 필요없이 유속을 0.2~2 ml/min 사이에서 자유롭게 조절할 수 있는 장점도 있어서 GC/MS로 분석하기 어려운 비휘발성 농약성분을 확인하는데 많이 사용되고 있다(Doerge 등, 1992; Doerge 등, 1993).

Carbendazim의 LC/MS chromatogram을 확인하기 위하여 표준품을 methanol에 녹여 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 한 후 그 10 μl 를 주입하여 분석한 LC/MS spectrum은 그림 4

와 같다. 그림에 나타난 carbendazim의 spectrum을 보면 m/z 133, m/z 159와 m/z 191(M^+) 등과 같은 3가지 주요 이온들로 쪼개어지는데, 이 fragment ion들이 LC/MS spectrum에서 전형적인 carbendazim의 fragmentation pattern이었다. 이들 fragment ion들 가운데 m/z 133 fragment가 가장 두드러진 이온(base peak ion)이었는데, 이것은 carbendazim에서 CH_3COO^- 기가 이탈된 2-aminobenzimidazole(2-AB) ion으로 생각된다. Tandem HPLC 분석에서 UV, FL 모두에서 carbendazim이 검출된 콩나물 시료의 LC/MS spectrum은 그림 5에서 보는 바와 같이 carbendazim의 전형적인 fragment ion인 m/z 133, m/z 159,

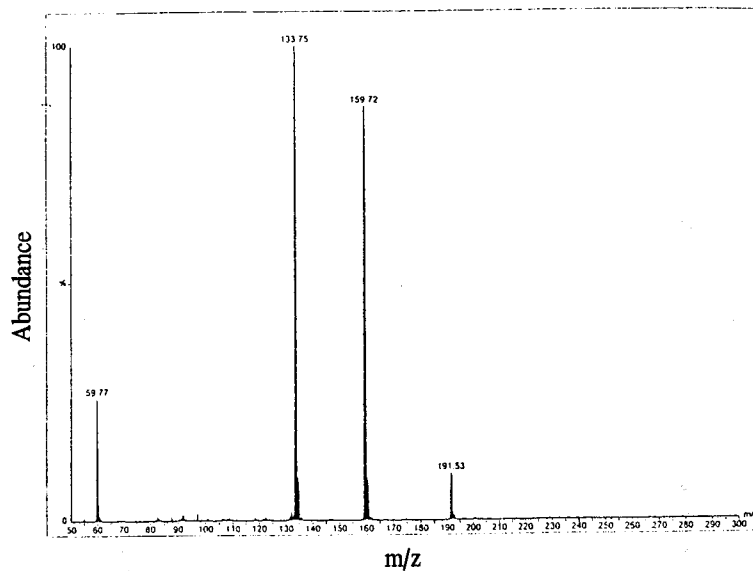


Fig. 4. Mass spectrum of carbendazim using standard APCI LC/MS.

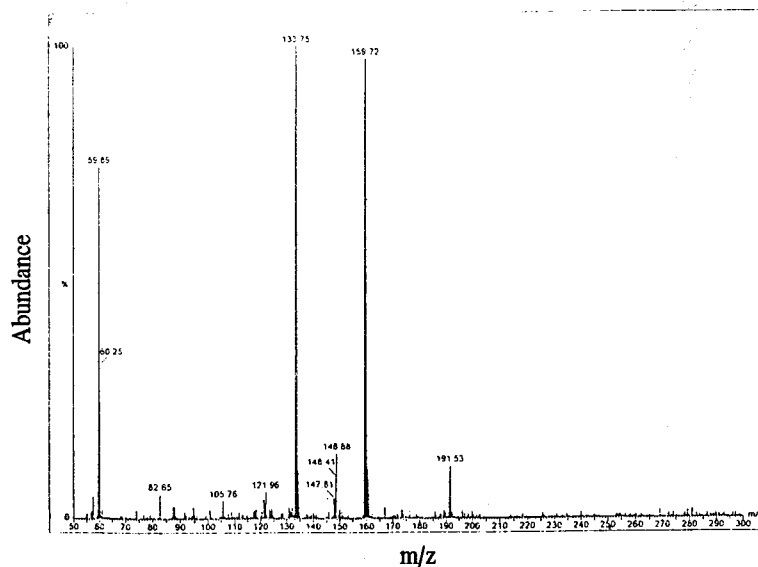


Fig. 5. Mass spectrum of the carbendazim residue from commercial soybean sprout sample.

m/z 191(M⁺) 등의 3가지 주요 이온 피크들이 나타남을 확인할 수 있었다. 이같은 결과로 볼 때 APcI LC/MS 방법은 콩나물에 잔류하는 carbendazim의 정성 및 정량분석에 아주 유용한 방법일 것으로 사료된다.

결론

콩나물중 carbendazim 잔류분을 정량하고 확인할 수 있는 새로운 분석법을 확립하고자 tandem HPLC(UV & FL) 및 APcI를 source로 사용한 LC/MS를 이용하였다. 이를 위해 FL(fluorescence) 검출기를 UV(ultraviolet) 검출기와 나란히 연결하여 UV 검출기의 경우 280 nm 파장을, 그리고 FL 검출기의 경우는 excitation 파장과 emission 파장을 각각 280 nm 와 310 nm로 설정하였다. 분석결과 carbendazim의 검출한계는 0.04 µg/kg이었다. 콩나물에 carbendazim을 0.5 ppm, 1.0 ppm 및 2.0 ppm 수준으로 첨가하여 회수율을 측정한 결과 그 평균값은 89.1%이었다. APcI source를 사용한 LC/MS 질량스펙트럼 방법은 콩나물중 carbendazim 잔류분을 효율적으로 확인할 수 있었다. APcI LC/MS법은 전자충격에 의한 질량스펙트럼에 비해 훨씬 간단한 fragment를 형성할 뿐만 아니라 carbendazim의 경우 m/z 133, m/z 159, m/z 191(M⁺)의 전형적인 fragment 이온을 형성하므로, 이 방법을 병행한다면 콩나물중 carbendazim 잔류분을 효율적으로 확인할 수 있을 것으로 사료되었다.

인용문헌

- American Chemical Society's Short Communications (1992) Stabilization of methyl[1-(butylcarbamoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate(Benomyl) in hydrochloric acid solutions. *J. Agric. Food Chem.* 40(8):1303~1306.
- Chiba, M. and R. Singh (1986) High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of benomyl and carbendazim in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 34:108~112.
- Dhoot, J. S. and A. R. del Rosario (1993) Determination and confirmation of benomyl and carbendazim in water using high-performance liquid chromatography and diode array detection. *J. Chromatography* 645:178~181.
- Doerge, D. R. and S. Bajic(1993) Pesticide analysis using a atmospheric pressure chemical ionization LC/MS. *Fisons Application Note* 207.
- Doerge, D. R. Doerge and S. Bajic (1992) Analysis of pesticides using liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6:663~666.
- Kügemagi, U., R. D. Inman, W. M. Mellenthin, and M. L. Deinzer (1991) Residues of benomyl(determined as carbendazim) and captan in postharvest-treated pears in cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 39:400~403.
- Lie, C. H., G. C. Mattern, X. Yu, and J. D. Rosen (1990) Determination of benomyl by high-performance liquid chromatography/mass/spectrometry/selected ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 38:167~171.
- Marvin, C. H. and I. D. Brindle (1991) Rapid on-line precolumn high performance liquid chromatographic method for the determination of benomyl, carbendazim and aldicarb species in drinking water. *J. Chromatography.* 555:147~154.
- Pesticide Analytical Manual Vol. 1 (1989) Methods for benzimidazole residues. Section 242.3~1, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Washington.
- Singh, R. P. and M. Chiba (1993) Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water, wettable powder formulations, and crops. *J. Chromatography* 643:249~260.
- 김길환 (1982) 콩, 두부와 콩나물의 과학, pp.186~188, 한국과학기술원.
- 農藥環境保全對策研究會 (1990), 農藥登録保留基準ハンドブック, pp.418~420.
- 보건복지부 (1996) 식품공전(별책)-제 7. 일반시험법, p.145.
- 신동화, 최웅 (1996) 콩나물 재배방법에 따른 생장 특성 비교, *한국식품과학회지* 28(2):240~245.

Determination and confirmation of the carbendazim residue in soybean sprout

Young-Gook Kim*, Jong-Tae Park and Suk-Soon Hong (*Agriculture & Livestock Products Analysis Division, Health and Environment Institute of Chollanam-do, Kwangju 502-201, Korea*)

Abstract : Tandem HPLC and atmospheric pressure chemical ionization(APCI) LC/MS method was used for the determination and confirmation of carbendazim residues in soybean sprout. Fluorescence(FL) detector was connected in tandem with the ultraviolet(UV) detector for dual detection of the carbendazim residue at the excitation and emission wavelength of 280 nm and 310 nm, respectively. The limit of detection for carbendazim was 0.1 $\mu\text{g/kg}$ sample. Recoveries of carbendazim from fortified soybean sprout at 0.5, 1.0 and 2.0 ppm were averaged 89.1%. Mass spectrometry using a APCI source confirmed the carbendazim residue in the soybean sprout sample. Fragmentation pattern on the APCI LC/MS spectrum of carbendazim was simpler than that from electron impact(EI) mass spectrum. Carbendazim produced 3 major ions including m/z 133, m/z 159 and m/z 191(M^+). This method was sensitive enough to provide reliable and reproducible results for practical applications.

*Corresponding author (Fax : +82-62-366-7413, E-mail : ygkim@chei.go.kr)