

고체상 추출법과 GC/MS를 이용한 포도주 중의 fungicides 정량

박교범 · 이석근*

한국화학연구원 분석실

(2003. 9. 15 접수, 2003. 9. 26 승인)

Determination of fungicides in wines by solid-phase extraction and gas chromatography with mass selective detection

Gyo-Beom Park and Sueg-Geun Lee*

Chemical Analysis Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology

P.O. Box 107, Yusong, Taejeon 305-606, Korea

(Received Sep. 15, 2003, Accepted Sep. 26, 2003)

요 약 : 본 연구에서는 우리나라에서 시판되고 있는 국내 및 외제 와인에 대하여 vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, procymidone 등의 살균제 잔류함량을 고체상 추출법을 이용한 GC/MS-SIM방법으로 정량 하였다. 분석결과 모든 시료에서 procymidone의 함량이 2.2-76.1 $\mu\text{g/L}$ 가 검출되었고, 회수율은 81.3-93.1%, 표준편차는 1.4-3.4%로 나타났다.

Abstract : The fungicides, used for grape growth and remained in the wine products from domestic and foreign countries such as vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, procymidone were quantitatively analyzed after solid-phase extraction using a GC/MS-SIM method. The results obtained were as follows: for all the samples, the content of procymidone was in the range from 2.2 to 76.1 $\mu\text{g/L}$, recoveries 81.3-93.1%, and standard deviation 1.4-3.4%.

Key words : fungicides, wine, GC/MS.

1. 서 론

포도주는 포도를 재배하는 과정에서 발생하는 병해충으로부터 보호하고 품질 향상과 수확량 증가를 위하여 살균제 등을 살포하며 이렇게 살포된 농약은 대부분 자연광이나 토양미생물, 강우 등에 의하여 분해되나 일부는 토양이나 포도에 잔류한다. 이와 같이 잔류된 농약은 포도주를 제조하는 과정에서 제거되지 않고 포도

주와 증류액에 잔류되며^{1,2} 이것을 사람이 섭취함으로써 체내에 축적되어 만성적인 독성을 유발시킬 수 있다.

따라서 유럽에서는 포도주에 대한 최대 허용기준을 규정하진 않았지만 포도주용으로 생산되는 포도에 대하여 최대 잔류허용기준을 규정하고 있으며 procymidone은 0.5 mg/Kg이다.^{3,4} 그러나 국내에서는 포도주의 제조에 관한 잔류농약의 연구발표와 규제치가 아직 설정되지 않았다.

포도주에서 잔류농약을 검출하기 위한 여러 가지 분석장비들 중 주로 많이 사용되는 분석방법으로 GC/NPD⁵ 와 GC/ECD⁶ 또는 GC/MS방법^{7,8} 등이 있으며, 용

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)42-860-7710 Fax : +82+(0)42-860-7704

E-mail : leesg@pado.kriec.re.kr

때 추출법^{9,11}을 사용하고 있으므로 이 방법은 자동화가 어려우며, 경쟁력이 떨어지고 많은 양의 용매를 사용함으로써 환경오염을 야기 시키는 결과를 초래한다. 그래서 최근에는 이러한 단점을 극복하고 소량의 용매를 사용하면서 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 기술이 개발되어왔다.

따라서 본 실험에서는 octadecyl silane 구조로 된 Sep-pak C₁₈ 카트리지와 poly divinyl benzene-co-N-vinyl pyrrolidone 구조의 친유성 단량체와 친수성 단량체를 함유하는 거대한 다공성 고분자 충전물을 가진 Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) 카트리지를 이용한 고체상 추출법으로 높은 회수율과 재현성을 얻을 수 있는 두 종류의 카트리지에 대한 회수율을 비교하고 이를 시판되고 있는 포도주에 적용하여 잔류농약을 검출하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 표준물질로 vinclozolin (96%), dichlofluanid (98.2%), penconazole (99.6%), procymidone (99.7%)은 Dr. Ehrenstorfer사 (Augsburg, Germany)로부터 각각 1000 µg/mL의 표준용액을 구입하고, 내부표준물질로 사용한 Endosulfan II (98%)는 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다. 고체상 추출법의 전처리방법에 사용된 Sep-Pak Plus C₁₈ 카트리지와 Oasis 카트리는 Waters사 (Mildford, MA, USA)제품이었고, 컨디셔닝하기 위하여 사용된 물은 Milli-Q 시스템 (Millipore, Bedford, USA)을 통과시킨 증류수를 사용하였다.

시료를 여과하기 위하여 0.45 µm (Millipore) syringe filter를 사용하였으며 Sep-Pak C₁₈카트리지와 Oasis 카트리지에 흡착시킨 후 흡착물을 용출하기 위해 사용한 메탄올은 Berdick & Jackson사 (Muskegon, MI, USA), 아세톤은 E. Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

분석에 사용한 기기는 HP5890 Series II Gas Chromatograph/HP 5971 A Mass Selective Detector (Hewlett-Packard, USA)를 사용하였으며 MS의 이온화 방식은 전자이온화 (electron impact)법을 사용하고 이온화 에너지는 70 eV로 하였다.

분석 컬럼은 HP-5MS cross linked 5% diphenyl, 95% dimethyl poly siloxane fused-silica capillary 컬럼 (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness)을 사용하였고 컬럼은 이온원에 직접 연결하고 운반가스는 헬

륨 (99.999%)을 사용하여 운반속도를 1.0 mL/min의 유속으로 흘려주었으며 transfer line 및 ion source온도는 각각 280 °C와 180 °C로 하였다. 컬럼의 온도는 90 °C에서 1분간 유지한 다음 10 °C/min으로 승온하여 290 °C까지 올려서 3분간 머물게 하였다. 시료는 주입구의 온도가 270 °C에서 1 µl을 비분할 (splitless)모드로 주입하였고 특정질량을 가지는 이온만을 선택하여 검출하는 Selected Ion Monitoring (SIM)방법에 의해 분석하였고 이때 사용된 표준물질과 내부 표준물질의 머무름 시간 및 특성이온은 Table 1에 나타났다.

Table 1. Retention time, quantitation and confirmation ions

Compounds	Retention time (min)	Characteristic ions(m/z)		
		Quantitation ion	Confirmation ion	
Vinclozolin	14.80	285	212	198
Dichlofluanid	15.58	123	167	224
Penconazole	16.54	159	161	248
Procymidone	16.88	96	283	285
ISTDa	18.52	195	237	159

^a Internal standard(Endosulfan II)

2.2. 표준용액의 제조

화합물의 표준용액의 제조는 위에서 구입한 1000 µg/mL의 표준원액을 아세톤을 사용하여 0.001 µg/mL ~ 0.5 µg/mL의 표준용액으로 희석하여 사용하였고, 내부표준용액의 제조는 위에서 구입한 순수한 표준품 즉 Endosulfan II 를 0.1 mg까지 무게로 아세톤을 사용하여 1000 µg/mL의 표준원액이 되도록 만들었다. 이 표준원액은 아세톤을 사용하여 100 µg/mL의 표준용액으로 희석하여 사용하였으며, 만든 표준용액은 -4 °C 이하의 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2.3. 시료

시료는 우리 나라에서 많이 유통되고 있는 국내산 A, B, C와 외국산 D, E, F, G, H의 적포도주 8종을 시중에서 직접 구입하여 사용하였다.

2.4. 검정곡선의 작성

검정곡선을 작성하기 위한 표준 검정용액은 위에서 만든 표준용액을 0.001, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 µg/mL의 농도 범위로 희석한 것을 2 mL vial에 각각 1 mL씩

넣고 여기에 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 내부표준용액을 2 μL 씩 spike한 후 뚜껑을 닫아 밀봉하였다.

검정곡선은 각 검정용액의 내부 표준물에 대한 피크 면적비로 농도비의 관계를 표시하는 표준검정곡선을 작성하였다. 즉, 각 화합물의 면적비 (A_s/A_{is})와 농도비 (C_s/C_{is})의 관계를 단순 선형회기선으로 작성하였다.

2.5. 시료의 추출방법

본 연구에 사용된 포도주에는 매우 복잡한 매질과 여러 종류의 폴리페놀 화합물을 포함하고 있다. 따라서 원하는 분석성분을 얻기 위해서는 시료 속의 매질을 제거하거나 원하는 성분만을 분리해야한다. 카트리지의 특성상 역상 Sep-Pak C_{18} 카트리는 실리카를 기반으로 하는 역상카트리지로 시료가 용해되어 들어가기 전에 건조한 상태로 있으면 회수율이 낮아지고 재현성이 떨어지기 때문에 사용하기 전 컨디셔닝을 해주어야 하며 시료 추출시에는 항상 건조하지 않도록 주의해야한다. 이에 비해 Oasis 카트리는 친유성과 친수성을 함께 가지고 있는 역상 충전제로 카트리가 건조해 지더라도 친수성 단량체가 물과 충전제 표면과의 접촉각을 감소시키므로 회수율에 큰 영향을 미치지 않는다. 따라서 Sep-Pak C_{18} 카트리지보다는 사용이 간편하고 더 넓은 범위의 화합물에 적용할 수 있는 장점이 있다. 두 카트리는 사용하기 전 다음과 같이 컨디셔닝을 하였다.

먼저 Sep-Pak C_{18} 카트리지와 Oasis 카트리지에 3 mL의 메탄올용액을 흘려주어 활성화를 시키고 다시 3 mL의 물을 흘려 씻어주며 평형을 시킨 후 여기에 5 mL의 포도주를 5 mL/min의 유속으로 흘려주어 흡착시켰다. 흡착된 카트리는 분석성분 이외의 매질과 당의 불순물을 제거하기 위하여 약한 용매인 5% 메탄올 용액 3 mL를 흘려주었다.

용출하기 전 물을 제거하기 위하여 아스피레이터를 이용하여 진공을 10분 정도 걸어주어 수분을 제거한 후 2 mL의 메탄올용액을 흘려주어 분석성분을 용출하였다. 용출한 용액은 GC/MS에 주입하기 전 0.45 μm syringe filter를 사용하여 여과한 후 여기에 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 내부표준용액을 2 μL 를 넣어 최종 부피를 1 mL가 되게 하여 1.0 μL 를 주입하여 분석하였다.

2.6. 회수율 측정

회수율을 측정하기 위하여 먼저 포도주에서 농약의

농도를 구한 다음 농약의 농도가 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 5 mL의 포도주에 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 표준용액을 50 μL 를 첨가한 후 앞의 시료와 같은 방법으로 활성화시킨 Sep-Pak C_{18} 카트리지와 Oasis 카트리지에 표준용액을 첨가한 시료용액을 통과시켜 흡착시킨 후 매질을 제거한 후 위의 추출방법과 같은 방법으로 용출한 후 GC/MS로 분석하여 크로마토그램의 피크를 측정한 후 면적을 구하여 앞에서 작성한 표준검정곡선으로부터 농도를 구하여 회수율을 계산하였다. 위의 과정을 3번을 반복하여 회수율과 표준편차를 계산하여 정확도와 정밀도를 측정하였으며 검출한계 (limits of detection, LOD)는 S/N비가 3일 때로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

농도 별로 만든 표준물질용액을 GC/MS로 농약을 분석하여 얻어진 상관 관계식과 상관계수는 Table 2에 나타내었다. Table 2에서와 같이 표준용액의 농도범위에서 R^2 값이 모두 0.9928 이상을 나타냄에 따라 직선성이 매우 좋고 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

Table 2. Simple linear regression of standard calibration for the fungicides

Compounds	Concentration range($\mu\text{g/mL}$)	Regression eqn.	Correlation coefficient(r)
Vinclozolin	0.01 ~ 0.5	$y = 9.8367x - 0.0025$	0.9956
Dichlofluanid	0.01 ~ 0.5	$y = 7.4697x - 0.0128$	0.9981
Penconazole	0.01 ~ 0.5	$y = 21.067x + 0.2774$	0.9977
Procyimidone	0.01 ~ 0.5	$y = 27.016x + 1.7054$	0.9928

3.2. 회수율 측정

회수율 측정은 표준물질 첨가법에 의하여, 시료를 먼저 분석하여 시료의 농도를 얻은 다음 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 되게 포도주에 첨가한 용액을 Sep-pak C_{18} 과 Oasis 카트리지에 흡착시킨 후 시료와 같은 방법으로 추출하여 포도주에 첨가한 농약의 함량을 측정된 후 회수율을 얻었으며, 측정결과는 Table 3에 나타내었다.

Sep-pak C_{18} 카트리지의 회수율은 82.8-91.2%이었고, Oasis 카트리지의 회수율은 81.3-93.1%로 나타나 Oasis 카트리지의 회수율이 좀더 높게 나타났으며, 표준편차 (standard deviation, S.D)는 평균 2.6%와 2.1%로 나타

나 재현성이 좋았다.

검출한계는 vinclozolin 과 dichlofluanid가 0.005 µg/mL로 같았으며 penconazole 과 procymidone은 0.001 µg/mL로 낮았다.

Table 3. Recovery(%) obtained in the extraction of 5 mL of wine samples spiked with 0.1 µg/mL of each fungicide, using different cartridges

Compounds	Fortification level(µg/mL)	Mean ^b ± S.D.	
		Sep-pak C ₁₈ cartridges	Oasis cartridges
vinclozolin	0.1	87.7 ± 2.2	89.3 ± 2.4
dichlofluanid	0.1	85.4 ± 2.4	87.9 ± 1.4
penconazole	0.1	91.2 ± 3.4	93.1 ± 2.3
procymidone	0.1	82.8 ± 2.5	81.3 ± 2.2

^b Mean value from 5 measurements

3.3. 실제시료의 분석

시중에서 구입한 포도주를 Sep-pak C₁₈과 Oasis 카트리지를 이용한 고체상 추출법으로 추출한 후 포도주의 추출액과 표준물질의 분석을 각각의 화합물에 대한 특성이온만을 선택한 selected ion monitoring (SIM)방법으로 분석하였으며 이때 사용된 표준물질의 이온크로마토그램은 Fig. 1이며 Sep-pak C₁₈ 카트리지를 사용하여 추출한 시료 G의 이온크로마토그램은 Fig. 2에 보여주었고, 같은 시료를 Oasis 카트리지로 추출한 이온크로마토그램은 Fig. 3에 보여주었다.

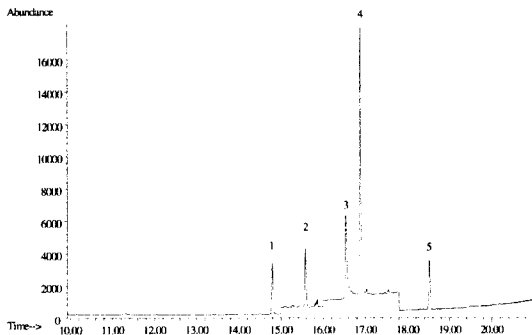


Fig. 1. Total ion chromatogram (TIC) of standard fungicides obtained by GC/MS-SIM. The numbered peaks are as follow: 1 = Vinclozolin; 2 = Dichlofluanid; 3 = Penconazole; 4 = Procymidone; 5 = Endosulfan II(ISTD).

Fig. 1의 표준물질 이온크로마토그램에서 보는바와 같이 표준물질은 본 연구에서 정립한 분석조건에서 모두 20분 이내에 vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, procymidone, endosulfan II (ISTD)순서로 분리가 아주 잘 되었으며, Fig. 2와 Fig. 3의 시료 G에 대한 이온크로마토그램에서는 Sep-pak C₁₈ 과 Oasis카트리지의 차이에 따른 매질의 영향은 별 차이가 없었으며 거의 유사한 경향을 나타내었다. 이온크로마토그램에서 보는바와 같이 두 종류의 카트리지로 전처리 한 후 16.8분 피크에서 포도주 내에 여러 성분들이 무척 많이 들어 있음에도 불구하고 procymidone이 매질에 전혀 간섭을 받지 않고 들어있는 것을 확인할 수 있었다.

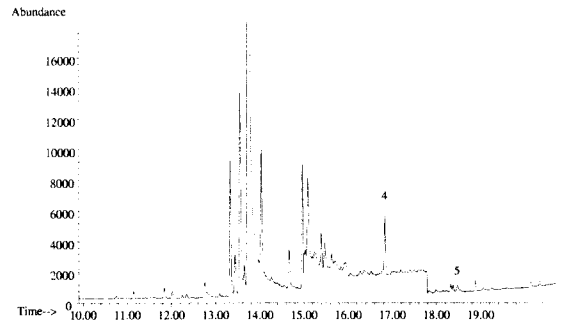


Fig. 2. Total ion chromatogram (TIC) of sample G obtained by GC/MS-SIM and extracted with Sep-pak C₁₈ cartridge. The numbered peaks are as follow: 4 = Procymidone; 5 = Endosulfan II(ISTD).

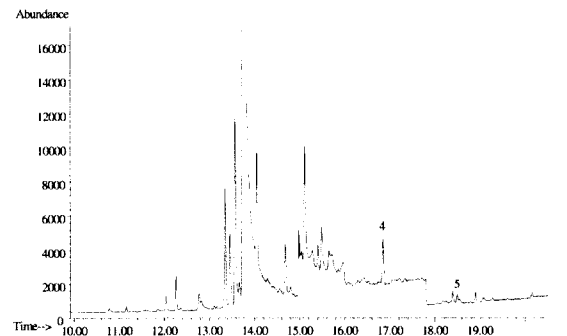


Fig. 3. Total ion chromatogram (TIC) of sample G obtained by GC/MS-SIM and extracted with oasis cartridge. The numbered peaks are as follow: 4 = Procymidone; 5 = Endosulfan II(ISTD).

시중에 판매되고 있는 포도주 8종을 구입하여 분석한 결과는 Table 4에 보여주었다. Table 4에서 보논바와 같이 4가지 fungicides 성분중 3성분은 검출되지 않았고 모든 포도주에서 procymidone 성분만 2.2 - 76.1 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 들어있음을 알 수 있었으며 시료 G의 경우 76.1 $\mu\text{g/L}$ 로 가장 많이 검출되었다. 그러나 국내외 모든 포도주에서 유럽에서의 포도에 대한 procymidone의 규제치 0.5 mg/Kg보다는 적게 검출되었다.

Table 4. Concentration ($\mu\text{g/L}$) of fungicides in wine

Compounds	A	B	C	D	E	F	G	H
Vinclozolin	-	-	-	-	-	-	-	-
Dichlofluanid	-	-	-	-	-	-	-	-
Penconazole	-	-	-	-	-	-	-	-
Procymidone	7.3	6.8	3.7	2.2	4.9	8.1	76.1	4.0

4. 결 론

포도주에서 fungicides를 분석하기 위한 시료의 전처리 방법으로 Sep-Pak C₁₈ 카트리지와 Oasis 카트리를 이용한 GC/MS의 방법은 적은 양의 시료를 고체상 추출법을 이용하여 간편하고 빠르게 추출하여 추출물을 바로 주입하여 분석할 수 있는 장점이 있으며 감도가 좋고 직선성이 뛰어났다.

분석결과 Sep-Pak C₁₈과 Oasis 카트리의 고체상 추출법의 회수율이 각각 82.8%-91.2%와 81.3%-93.1%로 비교적 높은 결과를 얻었고 표준편차도 평균 2.6%와 2.1%의 값을 얻었으며 재현성이 좋아 포도주에서 vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, procymidone의 잔류함량을 분석하기에 매우 유용한 분석방법이라 사료된다.

참고 문헌

1. P. Cabras, A. Angioni, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 967(2000).
2. P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, F. M. Pirisi, G. A. Farris, G. Madau, G. Emonti, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3854(1999).
3. S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva, *J. Chromatogr.*, **882**, 211(2000).

4. Commission Directive 2002/79/EC of 2 October 2002 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for certain pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables, European Union, Brussels, 2002.
5. A. Prieto, G. Ettiene, D. Mediane, I. Buscema, G. Gonzalez, L. Araujo, *Food Addit. Contam.* **16**, 57(1999).
6. P. Holland, D. McNaughton, C. Malcolm, *J. AOAC Int.* **77**, 79(1994).
7. J. Wong, M. Webster, C. Halverson, M. Hengel, M. McChesney, K. Ngim, S. Ebeler, presented at the 224th ACS National Meeting, Boston, MA, 2002, abstracts.
8. M. Natangelo, S. Tavazzi, E. benfenati, *Anal. Lett.* **35**, 327(2002).
9. A. Kaufmann, *J. AOAC Int.* **80**, 1302(1997).
10. P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, F. M. Pirisi, V. Brandolini, *J. AOAC Int.* **81**, 1185(1998).
11. G. Nissner, W. Buchberger, R. Eckerstorfer, *J. Chromatogr.*, **846**, 341(1999).