

HPLC를 이용한 사과, 감귤, 배추, 고추 중 살균제 Cyprodinil의 분석법 확립

이혜리·류명주·김은혜·문준관·도정아¹·오재호¹·권기성¹·임무혁²·이영득³·김정한*

서울대학교 농생명공학부, ¹식품의약품안전평가원 화학물질과, ²식품의약품안전청 식품기준과, ³대구대학교 생명환경학부

(2010년 12월 9일 접수, 2010년 12월 18일 수리)

Establishment of Analytical Method for Cyprodinil Residue in Apple, Mandarin, Korean Cabbage and Green Pepper

Hyeri Lee, Myoungjoo Riu, Eunhye Kim, Joon-Kwan Moon, Jung-A Do¹, Jae-Ho Oh¹, Ki-Sung Kwon¹, Moo Hyeog Im², Young Deuk Lee³ and Jeong-Han Kim*

Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Korea, ¹National Institute of Food and Drug Evaluation, Seoul 122-704, Korea, ²Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-754, Korea, ³Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

Abstract

This study was performed to develop a precise single residue analytical method of fungicide cyprodinil in representative crops for using as general residue analytical methods which could be applied to most of crops. Apple, mandarin, Korean cabbage and green pepper were selected as representative crops, and they were macerated, extracted with acetonitrile, concentrated and partitioned with *n*-hexane. Then the extracts were concentrated and cleaned-up through silica gel column with ethyl acetate:*n*-hexane (15:85, v/v) before concentration and analysis with HPLC. LOQ (limit of quantitation) of cyprodinil was 5 ng (S/N>10) and MQL (method quantitation limit) was 0.05 mg/kg. Recoveries were measured at three fortification levels (MQL, 10MQL and 100MQL) on crop samples and ranged from 82.0 to 108.2% and coefficients of variation were less than 10% regardless of sample type.

Key words Cyprodinil, HPLC, LOQ, MQL, Recovery

서론

Cyprodinil [N-(4-cyclopropyl-6-methyl-pyrimidin-2-yl)-aniline; Table 1]은 pyrimidine계 살균제로 1994년 스위스 Ciba-Geigy(현재 Novartis Crop Protection) AG사에서 개발되었으며(Heye 등, 1994) 현재 국내에서 유타제와 임상수화제가 판매되고 있고(한국작물보호협회, 2010), 각종 작물의 다양하고 넓은 범위의 병원체의 방제에 사용되고 있다. 적용대상

으로 배, 복숭아의 검은별무늬병, 배, 사과의 붉은무늬병, 사과와 감귤의 점무늬낙엽병, 인삼의 점무늬병, 감귤의 더덩이병, 감귤, 포도의 잿빛곰팡이병의 방제에 사용되고 있으며(한국작물보호협회, 2010) 특히 검은눈무늬병에 효과적이다(Knight 등, 1997).

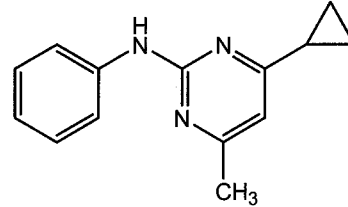
작물/식품 중의 cyprodinil 잔류 분석은 주로 GC-MS(Cabras 등, 1997; Pose-Juan 등, 2006) 및 GC-NPD(Garau 등, 2002; Moon 등, 2003; Marin 등, 2003) 또는 NMR(Dec, 1997)을 이용하여 작물 또는 토양 중 잔류량을 분석한 방법이 보고되었으며, Vaquero-Fernandez 등(2008)은 포도액과 포도주에서 Liu 등(2010)은 부추, 고추와 토양에서의 잔류량을 HPLC-

*연락처 : Tel. +82-2-880-4644, Fax. +82-2-873-4415
E-mail: kjh2404@snu.ac.kr

Table 1. Physico-chemical properties of cyprodinil (Tomlin, 2006)

Common name	Cyprodinil (Fungicide)	
Crops	Apple, mandarin, grape, peach, berry <i>et al.</i>	
Physico-chemical Properties	Molecular weight : 225.3	Log P_{ow} : 4.0 (pH 7, 9) (25°C)
	Water solubility (25°C) : 13 (pH 7) mg/L	Vapor pressure (25°C) : 5.1×10^{-1} , 4.7×10^{-1} mPa
Toxicology	LD ₅₀ for rats : > 2000 mg/kg	LC ₅₀ for rainbow trout : 2.41 mg/L (96hr)
Residue	DT ₅₀ in soil ≤ 20-60 days	MRLs : 1.0~5.0 ppm

Structure



DAD를 이용하여 분석하였다. 하지만 식품공전(식품의약품 안전청, 2010b)상에는 다성분 분석법의 일부 성분으로 고시 되어 있어 정량한계와 회수율 등의 자료를 갖춘 정밀표준분석법이 없고, 기존 문헌상으로 보고된 분석법도 정밀표준분석법으로 사용하기 곤란하며 또한 연구 대상 작물이 포도, 포도주, 토마토, 상추 등으로 한정되어 있다. 일본의 잔류분석법(農藥殘留分析研究班, 2006)에는 HPLC로 분석법을 제공하였으나 정제과정이 SCX column과 silica gel 두 가지의 흡착제를 사용해서 정제하기 때문에 복잡하고 시간과 노력이 많이 소요된다.

따라서 cyprodinil이 사용되는 다양한 작물에 대해 보편적이고 일반적인 정밀잔류분석법을 확립하기 위해 대표작물 [곡류(현미), 과일(사과, 감귤), 채소(배추, 고추), 두류 및 유지작물(콩), 서류(감자)]군 중에서 cyprodinil 해당 작물을 선정하고, GC보다는 분석대상 농약의 범위가 넓고 분석정밀도가 더 좋으며 조작과 사용이 간편한 HPLC를 이용하여, 정제법도 간단하게 개선한 대표 분석법을 확립하였다.

재료 및 방법

시약, 재료 및 기구

Cyprodinil 표준품(99.6%)은 Dr. Ehrenstorfer에서 구입하였고, acetonitrile, *n*-hexane, ethyl acetate은 HPLC급을,

sodium chloride 및 무수 sodium sulfate는 GR급을 사용하였다. Florisil(60-100 mesh, Fluka) 및 silica gel(70-230 mesh, Merck)은 흡착 크로마토그래피용을 구입하여 130°C에서 5시간 이상 활성화시켜 사용하였다.

무처리 시료(사과, 감귤, 배추, 고추)는 시중에서 유통 중인 유기농산물을 구입하였고, 믹서기(대성아트론, DA338-G)를 이용하여 마쇄하였으며, 진탕기(SA-2s, Taitec, Japan) 및 감압농축기(R-114, Büchi, Switzerland)는 시료 추출 및 추출액 농축 시 사용하였다.

대표 작물의 선정

연구에서 사용할 대표 작물은 농약 잔류허용기준(식품의약품안전청, 2010a)에 기준이 설정되어 있고(Table 2), 대상 농약에 대한 사용등록이 되어있는 배, 사과, 인삼, 감귤, 포도, 복숭아 등의 과일류이었으며, 이를 고려하여, 대표 작물로서 과일에서 사과와 감귤을, 향후 추가적으로 적용확대를 예상하여 선정한 채소류로서 배추와 고추를 선정하였다.

분석기기의 검출한계(LOD : limit of detection) 및 정량한계(LOQ : limit of quantitation) 측정

Cyprodinil 표준용액 0.02, 0.05, 0.1, 1 mg/L를 차례로 20 µL씩 HPLC에 주입하여 크로마토그램의 signal과 noise의 비(S/N)를 구하여 LOD(S/N=3) 및 LOQ(S/N=10)를 계

Table 2. Maximum residue limits of cyprodinil in various crops

Crop	MRL	Crop	MRL	Crop	MRL
Strawberry	1.0	Peach	1.0	Grape	5.0
Mandarin	1.0	Apple	1.0		
Pear	1.0	Kiwifruit	3.0		

산하였다.

재현성(Reproducibility)의 검정

Cyprodinil 표준용액 0.05 ppm을 연이어 7번 HPLC에 20 μ L씩 주입하여 크로마토그램 상의 머무름 시간(t_r), peak의 면적, peak 높이, peak의 대칭성의 변이를 비교하여 검토하였다.

Cyprodinil 표준검량선 작성

Cyprodinil 표준용액은 cyprodinil 표준품을 1000 mg/L가 되도록 acetonitrile에 용해시켜 stock solution으로 사용하였다. 이를 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/L의 농도로 희석조제하고, 20 μ L씩 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다.

분배용매별 분배효율 측정

25 mL의 증류수에 10 mg/L의 cyprodinil 표준용액 0.5 mL을 가하고 포화식염수 50 mL과 증류수 50 mL을 첨가한 뒤, 분액여두에 옮겨 분배용매인 dichloromethane과 *n*-hexane 100 mL로 각각 한 번씩 추출하였다. 분액여두에 남은 수용액을 각각의 분배용매 50 mL로 추가 분배 추출한 다음 분배 추출액을 합하여 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하고, 40°C 이하에서 감압농축 하였다. 농축 잔사를 5 mL acetonitrile에 재용해하여 기기분석을 행하고 분배효율을 구하여 분배용매에 따른 분배추출 효율을 계산하였다.

정제 조건의 확립

가. 정제조건 확립을 위한 예비실험

Florisil과 silica gel 각각 10 g을 내경 1.5 cm, 길이 35 cm의 칼럼에 건식충진 한 후, 3 g의 무수 sodium sulfate을 위에 첨가하였다(이하 Florisil 칼럼, silica gel 칼럼). 여기에 *n*-hexane 100 mL를 통과시켜 활성화시킨 후 1 mg/L cyprodinil 표준용액 5 mL를 가하였다. 5%, 10%, 15%, 20%, 25%의 ethyl acetate:*n*-hexane 혼합액 50 mL을 차례로 용리시켜 용리액을 농축시킨 후 acetonitrile 5 mL로 재정용 하였다. 이 용액을 기기분석하여 흡착제의 종류 및 용리액에 의한 cyprodinil의 회수율을 측정하였다.

나. 정제 조건의 확립

Silica gel 칼럼에 *n*-hexane 100 mL를 통과시켜 활성화시킨 후 1 mg/L cyprodinil 표준용액 5 mL을 가하였다. Ethyl acetate와 *n*-hexane의 비율을 달리한 세척용매(90:10, v/v),

용리액(85:15, v/v)으로 위의 실험과 같이 용리, 정용한 후 기기분석하여 용리액에 의한 cyprodinil의 회수율 측정하였다.

분석정량한계(MQL, method quantitation limit) 설정

분석정량한계(MQL, mg/kg)은 정량한계(LOQ)와 시료량 및 분석 조작 중의 희석배율을 고려하여 식 (1)에 의하여 계산하였다.

$$\frac{[\text{분석기기의 정량한계}(\text{ng}) \times \text{최종검체용액의 부피}(\text{mL})]}{[\text{검체 주입량}(\mu\text{L}) \times \text{분석검체량}(\text{g})]} \quad (1)$$

작물 중 cyprodinil의 회수율

무처리 시료(사과, 감귤, 배추, 고추) 25 g을 마쇄한 후 각각 cyprodinil 표준용액을 0.05, 0.5, 5 mg/kg이 되도록 처리한 다음 acetonitrile 100 mL을 첨가하고 1시간 동안 180 rpm에서 진탕 추출하였다. 진탕이 끝난 균질 시료를 Whatman GF/A filter paper를 이용해 흡인여과 한 후, 30 mL의 acetonitrile로 추가 세척하고, 여과액을 40°C 이하에서 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축액에 포화 식염수 50 mL 및 증류수 50 mL을 첨가한 후, 분액여두에 옮기고 *n*-hexane 100 mL 및 50 mL로 분배추출하여 추출액을 합하였다. 추출액을 무수 sodium sulfate를 통과시켜 수분을 제거하고 40°C 이하에서 감압농축한 다음, 잔사를 5 mL *n*-hexane에 용해시켰다. 이 추출액을 *n*-hexane을 통과시켜 활성화시킨 silica gel 칼럼에 첨가하고, ethyl acetate:*n*-hexane(5:95, v/v) 100 mL로 세척한 다음, ethyl acetate:*n*-hexane(15:85, v/v) 100 mL로 용리시켰다. 용리액을 감압농축하고 잔사를 acetonitrile 5 mL로 재용해하여 이 중 20 μ L를 HPLC에 주입하여 cyprodinil의 농도를 분석하였다.

HPLC 기기분석 조건

작물 중 cyprodinil의 분석은 diode array detector(DAD)

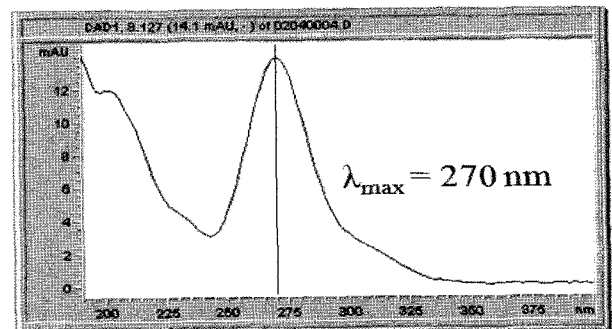


Fig. 1. UV spectrum of cyprodinil.

Table 3. HPLC operating condition for the analysis of cyprodinil

Instrument : Agilent 1100 series (U.S.A)
Detector : Diode array detector (DAD) 270 nm
Column : YMC-Pack Pro C18 (4.6 mm I.D, 250 mm length, 5µm particle size, Japan)
Mobile phase : A (acetonitrile), B (water)
A:B = 70:30 (apple, mandarin and Korean cabbage)
A:B = 65:35 (green pepper)
Flow rate : 1 mL/min
Injection volume : 20 µL

가 장착된 Agilent 1100 series HPLC(Agilent, USA)를 사용하였으며 검출파장은 270 nm로 하였다(Fig. 1, Table 3).

HPLC상 cyprodinil peak의 retention factor

Retention factor(*k*, capacity factor)는 머무름 시간 (retention time)과 보정머무름시간(*t*'_r, adjusted retention time)을 이용하여 식 (2)에 의하여 계산하였다.

$$k = \frac{t'_r}{t_m} \tag{2}$$

- t*_r = retention time
- t*_m = retention time of a non-retained compound
- t*'_r = *t*_r - *t*_m = adjusted retention time

나. HPLC 칼럼 효율성 (column efficiency)

이론단수(*N*, Number of plates)는 머무름 시간과 peak의 너비를 이용하여 식 (3)에 의하여 계산하였고(Rood, 2007), 계산

된 *N*과 칼럼의 길이를 이용하여 식 (4)에 의하여 이론단높이 (*H*, Height of theoretical plates)를 계산하였다(Rood, 2007).

$$N = 5.545 \left(\frac{t_r(\text{min})}{W_h(\text{min})} \right)^2 \tag{3}$$

*W*_h = peak width at half height

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

결과 및 고찰

분석기기의 검출한계, 정량한계 및 재현성

LOD 및 LOQ(이, 2009)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데[Fig. 2(Fong 등, 1999; Miller, 2005)], 다양한 농도의 표준 용액을 분석하여 S/N를 구한 결과, cyprodinil의 LOD

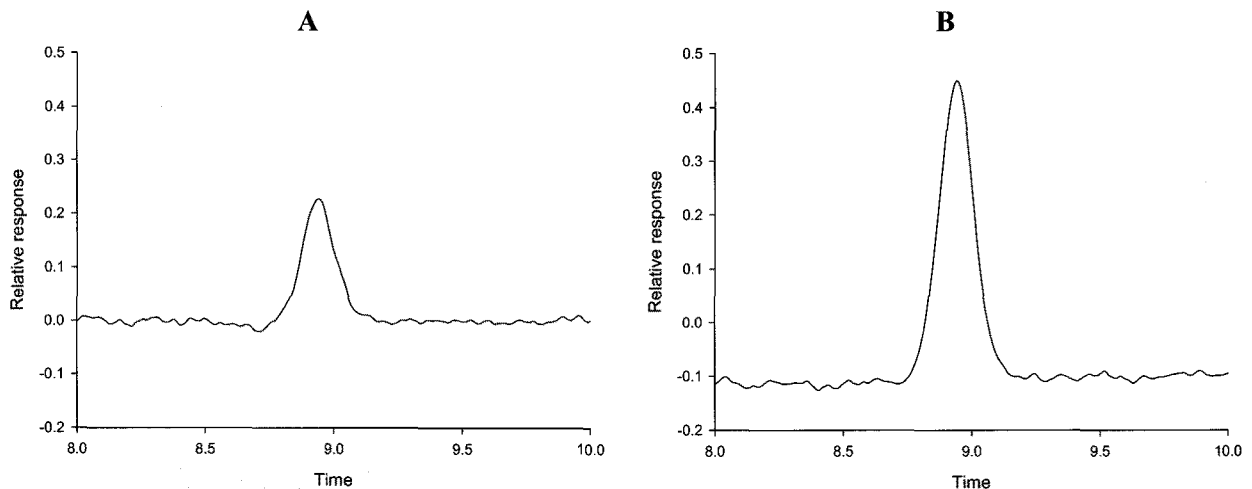


Fig. 2. LOD (A, 0.4 ng) and LOQ (B, 1 ng) of cyprodinil.

는 0.4 ng이었고, LOQ는 1 ng이었지만, 실제 분석에서는 설정된 MRL값을 고려하여 더 높은 수준인 5 ng으로 LOQ를 사용하였다. Liu 등(2010)은 부추, 고추, 토양에서 LOD가 2, 1, 0.4 ng이었다고 하였고, 일본의 잔류분석법(農薬残留分析研究班, 2006)에서는 최소검출한계를 0.4 ng으로 보고하였다.

분석의 재현성 시험은 일정한 양의 농약을 여러 번 반복주입 분석하여 머무름 시간(t_r), peak의 면적, peak 높이, peak의 대칭성(symmetry)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. Peak의 대칭성의 경우 0.9~1.1의 값이 일반적이지만 이 값을 넘을 경우 overloading, 다른 물질의 co-eluting 등을 고려해 볼 수 있다(Rood, 2007). 본 연구에서 설정한 정량한계의 양(5 ng)을 연속으로 7번 분석한 결과, t_r , area, height, symmetry의 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 4).

검량선의 직선성(Linearity)

Cyprodinil 표준용액(0.05~5 ppm)을 분석하여 얻은 검

Table 4. LOQ and Reproducibility of cyprodinil

LOQ	Reproducibility		
		Average	C.V ^{a)} (%)
5 ng	t_r	10.59 (min)	0.08
	Area	5.14	1.86
	Height	0.48	1.05
	Symmetry	0.94	8.93

^{a)}C.V (Coefficient of variation, %) = Standard deviation / Average × 100

량선의 회귀방정식은 사과, 감귤, 배추에서 $y = 89.3477x - 0.0071$ ($R^2 = 1.0000$), 고추에서 $y = 77.4246x - 0.1065$ ($R^2 = 1.0000$)로 모두 $R^2 > 0.99$ 로서 직선성이 우수하였다(Fig. 3).

분배 추출을 위한 분배용매의 결정

잔류분석에서의 액-액 분배는 물과 비극성 용매를 이용하여 대개 비극성인 농약성분을 수분이 함유된 작물에서 비극성의 용매로 이동 시키고, 극성의 방해물질을 수층으로 제거할 수 있다. 극성으로 제거되는 방해물질에는 당이나 alcohol, starch와 같은 탄수화물 등이 있다(Fong 등, 1999). 따라서 적절한 용매의 선택이 중요한데, 액-액 분배 용매에 적용할 용매로는 보편적으로 많이 사용되는 dichloromethane, *n*-hexane이 고려되었다. 두 용매로 100 mL 및 50 mL로 분배한 결과(Table 5) *n*-hexane이 96.1%, dichloromethane이 97.0%로 전량 회수가 가능하였다. 그러나 *n*-hexane의 경우가 간섭물질의 방해가 적어 *n*-hexane을 최종 분배용매조건으로 결정하였다.

Silica gel 칼럼을 이용한 정제조건 확립

정제과정(cleanup)은 액-액 분배에서 제거하지 못한 간섭

Table 5. Efficiency of liquid-liquid partition with two different solvents

Solvents	Recovery (%)		
	100 mL	50 mL	Total
<i>n</i> -Hexane	94.1	2.0	96.1
Dichloromethane	92.8	4.2	97.0

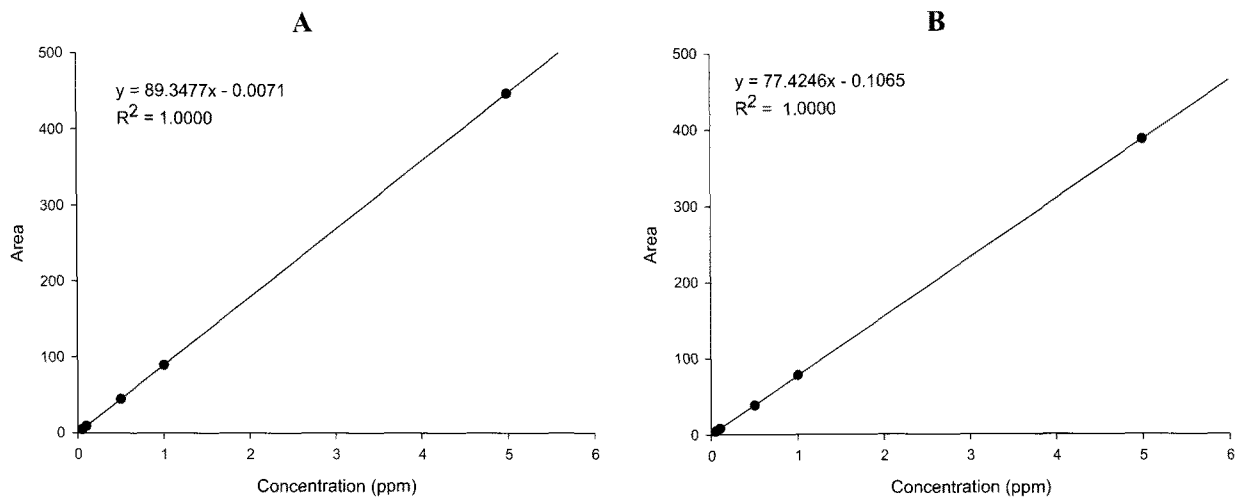


Fig. 3. Calibration curve of cyprodinil for the analysis of Korean cabbage, apple and mandarin (A), green pepper (B).

물질을 제거하는 과정으로 일반적으로 Florisil, silica gel, alumina 등의 흡착물질을 유리관에 충전한 칼럼크로마토그래피와 이와 동일한 역할을 하면서 크기가 작고, 상업적으로 구입이 가능한 SPE(Solid Phase Extract) cartridge 등을 이용하여 수행하는데 본 연구에서는 잔류농약 정제과정에서 가장 일반적으로 사용하는 Florisil과 silica gel을 선택하여 정제용 유리칼럼을 사용하였고, 용출 용매체계로서는 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 ethyl acetate:n-hexane 혼합액(5%, 10%, 15%, 20%, 25%) 50 mL을 사용하여 예비실험을 수행하였다. 용리한 결과 Florisil을 이용한 방법은 5~10%(v/v) 혼합액에서 대부분의 농약(95.2%)이 용출되었으나, silica gel을 이용할 경우 15~20%(v/v) 혼합액에서 97.3%의 회수율을 얻어 용출에 앞서 방해물질을 5~10%(v/v) 혼합액으로 세척제거할 수 있는 silica gel을 흡착크로마토그래피의 흡착제로 결정하였다(Table 6).

위의 결과를 토대로 시료에 적용하기 위해서 10% ethyl acetate/n-hexane 혼합액을 세척용액으로 사용하였는데, 그 이유는 농약이 용출되지 않으면서, 10% ethyl acetate/n-hexane 혼합액이 5% 혼합액보다는 더 많은 불순물을 제거할 수 있을 것으로 예상하였기 때문이다. 하지만 시료 적용시의 용매 양인 100 mL로 세척하였을 때, 세척용액에서도 24.9%가 용출되었기 때문에(Table 7) ethyl acetate의 양을 줄여서 5% ethyl acetate/n-hexane 100 mL를 세척용매로 사용하여 세척에 적용하고, 15% ethyl acetate/n-hexane 50+50 mL로

Table 6. Recovery rate of cyprodinil from column by ethyl acetate/hexane mixture elution

Ethyl acetate : n-hexane	Recovery (%)	
	Florisil	Silica gel
5 : 95	1.9	-
10 : 90	93.3	-
15 : 85	-	91.5
20 : 80	-	5.8
25 : 75	-	-
Total	95.2	97.3

Table 7. Recovery rate of cyprodinil with ethyl acetate/n-hexane mixture by silica gel column chromatography

Ethyl acetate/n-hexane	Volume (mL)	Recovery (%)
Washing (10:90)	100	24.9
Elution (15:85)	0-50	74.7
	50-100	-
Total		99.6

용출하였다. Moon 등(2003)은 silica gel을 이용한 정제방법으로 acetone/n-hexane 용출용매체계를 이용하였고, Liu 등(2010)은 n-hexane/acetone로 용출하는 방법으로 Florisil SPE를 이용하였다. 또한 일본의 잔류분석법(農藥残留分析研究班, 2006)에서는 다공성 구조토 칼럼 정제 후, SCX SPE, silica gel SPE를 이용하는 방법을 이용하였다. 본 연구에서는 silica gel 칼럼과 Florisil 칼럼을 비교하여 정제방법을 간소화하고, 다양한 작물에 적용이 가능한 최적의 정제방법으로 silica gel을 이용한 방법을 확립하였다.

분석정량한계

식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(이, 2009)에 의하면 분석법의 정량한계를 정량한계, 시료량 및 분석소작 중의 희석배율 등을 감안하여 역산출한 수치로 식 (1)과 같이 정의하고 있고 연구에 사용한 전체적 분석방법으로 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계를 의미하며(이 등, 2008), 식품의약품안전청에서는 0.05 mg/kg 이하 또는 MRL의 1/2 이하까지 검출이 가능하도록 추천하고 있다(이, 2009). 본 연구는 이 정의를 채택하여 계산하였으나 이에 해당하는 영어어휘가 없어서 식품 중 동시다성분 분석법 개선 연구(주)랩프런티어, 2004)의 동일 개념 영어어휘를 인용하여 ‘분석정량한계(MQL, method quantitation limit)’라는 정의로 사용하였다. 식 (1)에 의하여 계산한 본 연구의 분석정량한계(식 (5))는 0.05 mg/kg으로서 작물에 대한 MRL이 1~5 mg/kg인 것을 감안하면 잔류분석법기준을 충분히 만족하였다.

$$\frac{5 \text{ (ng)} \times 5 \text{ (mL)}}{20 \text{ (}\mu\text{L)} \times 25 \text{ (g)}} = 0.05 \text{ (mg/kg)} \quad (5)$$

Vaquero-Fernandez 등(2008)은 포도액과 포도주에서의 MQL이 각각 53.6, 45.9 $\mu\text{g/L}$ 이었고, Moon 등(2003)은 포도에서 0.02 mg/kg으로 보고하였다.

분석법의 회수율

회수율 시험은 무처리 시료에 일정량의 농약을 처리하고, 추출, 분배, 정제의 전체 과정을 거친 후 시료 중에서 농약이 얼마나 회수되는가를 알아보는 것으로 분석법 검증에서 정확성(평균 회수율%)과 정밀성(C.V.%)을 평가할 수 있다.

본 연구에서는 마쇄한 무처리 시료에 cyprodinil 표준용액을 MQL(0.05 mg/kg), 10MQL(0.5 mg/kg)과 100MQL(5 mg/kg)이 되도록 첨가하고, 앞에서 확립한 방법으로 3회 반복하여 분석하였다(Table 8). 분석 결과 MQL(0.05 mg/kg)

Table 8. Recovery and MQL for cyprodinil in crops

Fortified level (mg/kg)	Recovery (%), CV (%) ^{a)}				MQL (mg/kg)
	Korean cabbage	Apple	Mandarin	Green pepper	
0.05	108.2, 8.1	95.9, 4.8	82.0, 2.4	85.2, 5.5	
0.5	100.7, 1.2	95.6, 1.1	91.3, 2.3	92.1, 4.3	0.05
5	92.1, 2.1	84.2, 3.4	92.5, 0.6	89.5, 6.5	

^{a)}Average of triplicate.

수준에서는 82.0~108.2%, 10MQL(0.5 mg/kg)수준에서는 91.3~100.7%, 100MQL(5 mg/kg)수준에서는 84.2~92.5%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성(C.V.<8.1%)도 양호하여 식약청 분석법 기준을 만족하였다. 따라서 10% ethyl acetate/*n*-hexane 세척용액 대신에 5% ethyl acetate/*n*-hexane 세척용액 사용의 효율성이 입증되었다.

Vaquero-Fernandez 등(2008)은 포도액와 포도주에서 HPLC-

DAD를 이용하여 분석한 결과 각각 97.0, 99.5%의 회수율 결과를 얻었으며, Moon 등(2003)은 포도에서 GC-NPD를 이용하여 분석한 결과 111.4%의 회수율을 얻었다고 보고하였다.

Cyprodinil peak의 머무름 특징 및 칼럼 효율성

작물 중 cyprodinil의 분석 크로마토그램에서 cyprodinil의 머무름 시간은 사과, 감귤, 배추에서 8.9분, 고추에서 10.3

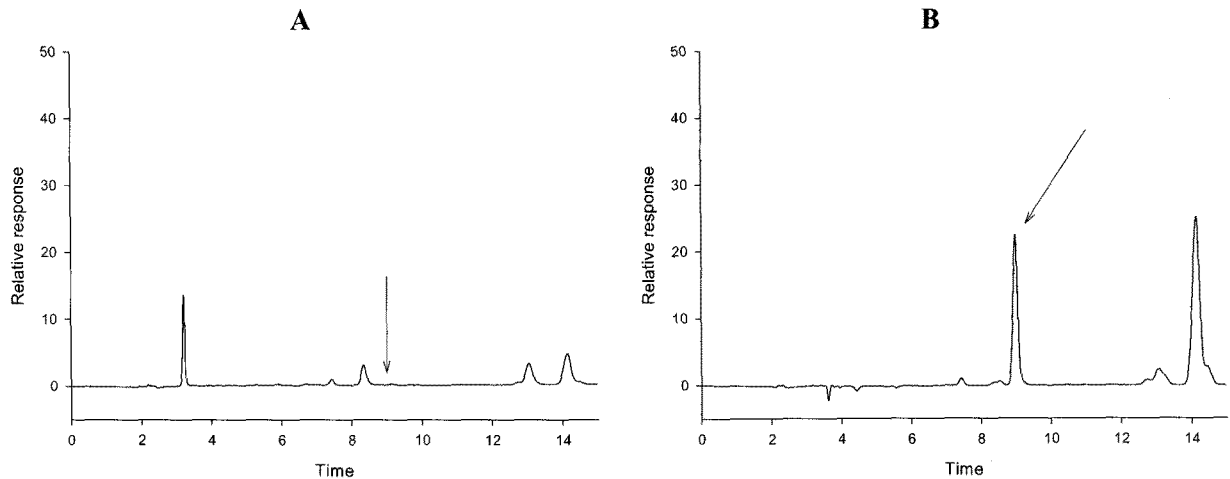


Fig. 4. Chromatograms of apple control (A) and a fortified at 0.5 mg/kg of cyprodinil apple sample (B).

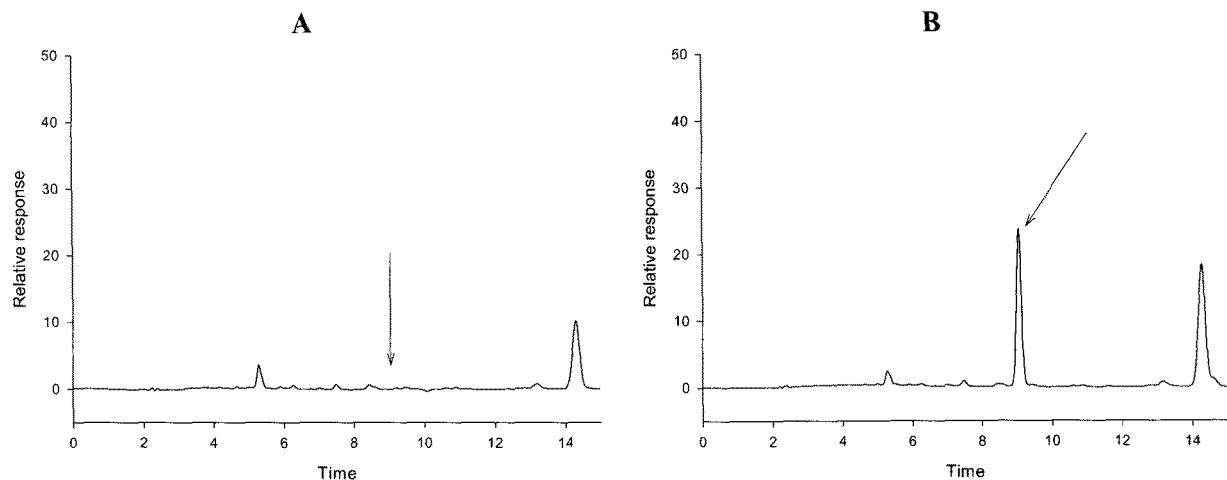


Fig. 5. Chromatograms of mandarin control (A) and a fortified at 0.5 mg/kg of cyprodinil mandarin sample (B).

분이었으며, 머무름 시간에서의 방해물질은 관찰되지 않았다(Fig. 4~7).

*K*는 실질적으로 분석물질이 정지상에 머무른 정도를 나타내며(김 등, 1997; Rood, 2007) 사과, 감귤과 배추에서 3.12, 고추에서 3.94이었다.

*N*과 *H*는 칼럼의 분리 효율을 나타내는데(김 등, 1997; McNair and Miller, 1997; Rood, 2007) *N*은 사과, 감귤, 배추에서 23451, 고추에서 27731이었으며, 따라서 *H*는 각각 0.0107, 0.0090 mm이었다(Table 9).

결론

Cyprodinil의 표준 잔류분석법을 다양한 작물에 적용이 가능하도록 확립하기 위하여 대표 농산물 시료(사과, 감귤, 배추, 고추)를 acetonitrile으로 추출하고, *n*-hexane으로 분배하여, silica gel 흡착 크로마토그래피법으로 정제하였다. Silica gel을 이용한 정제방법은 ethyl acetate/*n*-hexane(5:95, v/v) 100 mL로 세척한 후, ethyl acetate/*n*-hexane(15:85, v/v) 100 mL로 용리하는 방법을 이용하였다. LOQ는 5 ng이었

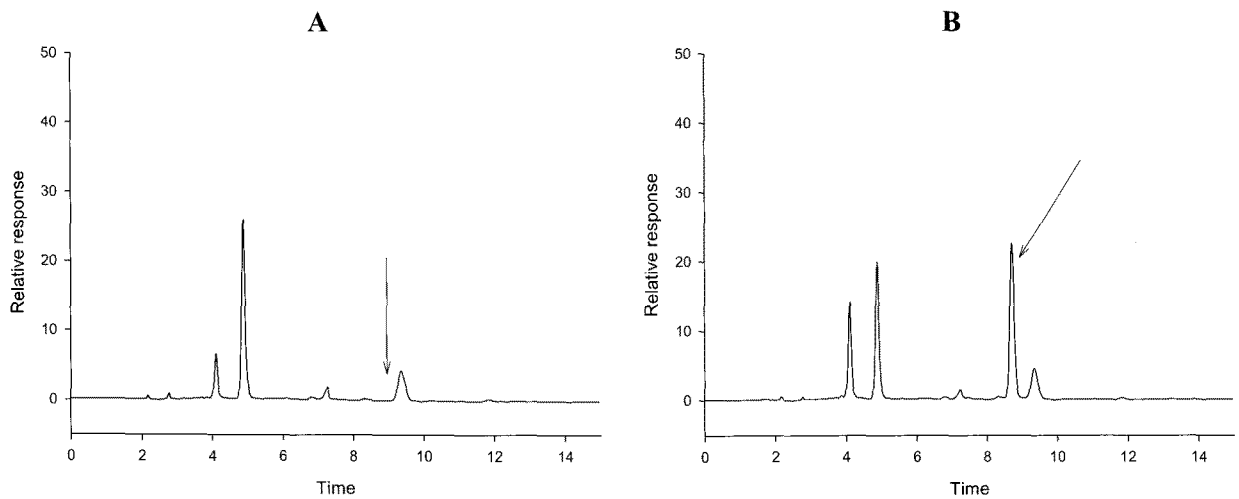


Fig. 6. Chromatograms of Korean cabbage control (A) and a fortified at 0.5 mg/kg of cyprodinil Korean cabbage sample (B).

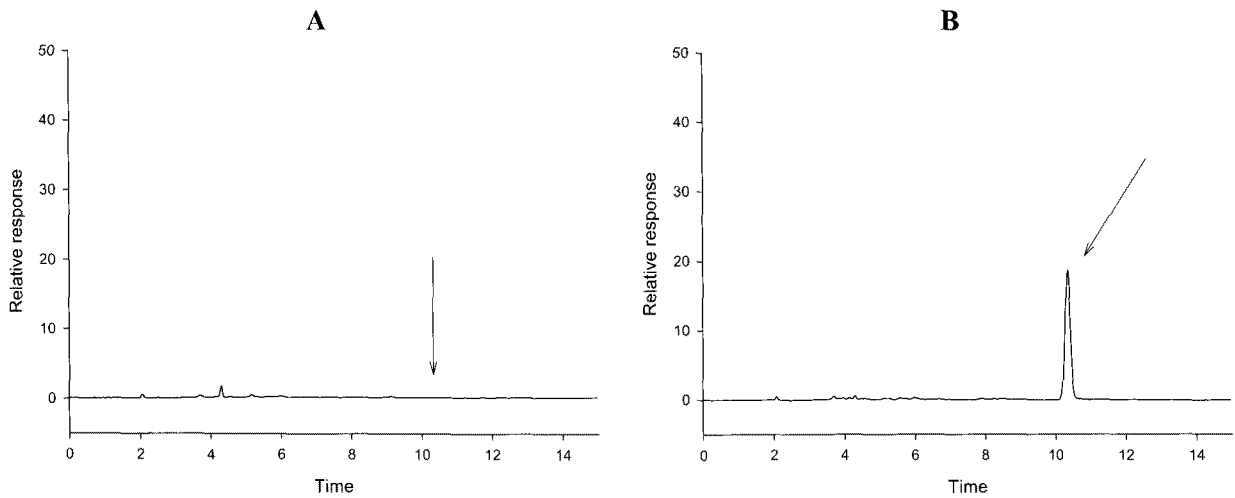


Fig. 7. Chromatograms of green pepper control (A) and a fortified at 0.5 mg/kg of cyprodinil green pepper sample (B).

Table 9. Retention times (*t_r*), retention factor (*k*), number of plates (*N*) and height of theoretical plate (*H*) of cyprodinil

Crop	<i>t_r</i> (min)	<i>t_m</i> (min)	<i>t_r'</i>	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>H</i> (mm)
Apple, Mandarin & Korean cabbage	8.98	2.18	6.80	3.12	23451	0.0107
Green pepper	10.33	2.09	8.24	3.94	27731	0.0090

고, 분석정량한계 MQL은 0.05 mg/kg이었으며, 회수율은 82.0~108.2%로 모든 작물에서 양호한 결과를 나타내었다. 현재 다양하고 복잡하게 되어있는 cyprodinil의 잔류분석법을 간단하고 보편적으로 이용할 수 있는 방법으로 확립하였으며, 개발된 분석법은 MRL이 설정된 과일 및 채소 중 cyprodinil의 표준 잔류분석법으로 사용이 가능성이 입증되었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 2010년 국가 잔류농약 안전관리 연구 사업단 - 농약의 단성분 분석법 개발 연구의 연구비 지원으로 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Cabras P., A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, E.V. Minelli, F. Cabitza and M. Cubeddu (1997) Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *J. Agric. Food Chem.* 45(7):2708~2710.
- Dec J., K. Haider, A. Benesi, V. Rangaswamy, A. Schaffer, U. Plucken and J. M. Bollag (1997) Analysis of soil-bound residues of ¹³C-labeled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 31:1128~1135.
- Fong, W. G, H. A. Moye, J. N. Seiber and J. P. Toth (1999) *Pesticide Residues in food: Methods, Technologies, and Regulations.* Wiley Interscience. pp. 3~4, 40~44, Canada.
- Garau V. L., A. Angioni, A. Aguilera, A. A. Del Real, M. Russo and P. Cabras (2002) Disappearance of azoxystrobin, pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil on tomatoes in a greenhouse. *J Agric Food Chem* 50:1929~1932.
- Heye, U.J., J. Speich, H. Siegle, R. Wohlhauser and A. Hubele (1994) CGA 219417-a novel broad-spectrum fungicide. *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 2:501~8.
- Knight S. C., V. M. Anthony, A. M. Brady, A. J. Greenland, S. P. Heaney, D. C. Murray, K. A. Powell, M. A. Schulz, C. A. Spinks, P. A. Worthington and D. Youle (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:349~72.
- Liu, C., S. Wang, L. Li, H. Zhao, S. Jiang and F. Liu (2010) Analysis of cyprodinil in leek and pepper and its decline under field condition. *Environ. Monit. Assess.* DOI: 10.1007/s10661-010-1730-y
- Marin A., J. Oliva, C. Garcia, S. Navarro and A. Barba (2003) Dissipation rates of cyprodinil and fludioxonil in lettuce and table grape in the field and under cold storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 51:4708~4711.
- McNair, H. M. and J. M. Miller (1997) *Basic Gas Chromatography.* pp.7, 51, Wiley Interscience, U.S.A.
- Miller, J. M. (2005) *Chromatography : concepts and contrasts (2nd),* Wiley Interscience, pp. 286~287, U.S.A.
- Moon J. K., H. J. Lee, Y. W. Kim, Y. H. Lee and J. H. Kim (2003) Establishment of pre-harvest interval for cyprodinil in grape. *Agric. Chem. Biotechnol.* 46(4):174~176.
- Pose-Juan E., B. Cancho-Grande, R. Rial-Otero and J. Simal-Gandara (2006) The dissipation rates of cyprodinil, fludioxonil, procymidone and vinclozoline during storage of grape juice. *Food Control* 17:1012~1017.
- Rood, D. (2007) *The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers* pp. 15-17, p. 22, Wiley-VCH, U.S.A.
- Tomlin, C. D. S. (2006) *The Pesticide Manual (14th),* pp. 264~266, British Crop Production Council, UK.
- Vaquero-Fernandez L., A. Sa'enz-Hernandez, J. Sanz-Asensio, P. Fernandez-Zurbano, M. Sainz-Ramirez, B. Pons-Jubera, M. Lopez-Alonso, S. Epifanio-Fernandez and M. Mart'nez-Soria (2008) Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *J Sci. Food Agric.* 88:1943~1948.
- 農薬残留分析研究班 (2006) 最新農薬 の残留分析残留分析 [改訂版], pp. 252~253, 中央法規出版
- 김강진, 김하석, 이대운, 이원 (1997) *분석화학 (제4판),* pp. 698, 자유아카데미.
- 식품의약품안전청 (2010a) *식품의 농약 잔류허용기준.*
- 식품의약품안전청 (2010b) *식품공전*
- 이영득 (2009) *식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서* pp. 3, 78~79, 식품의약품안전청.
- 이종화, 박희원, 금영수, 권찬혁, 이영득, 김정한 (2008) 시설 내 오이 재배 중 살균제 Boscalid의 잔류특성. *농약과학회지* 12(1):67~73.
- (주)랩프린터 (2004) *식품 중 동시다성분 분석법 개선 연구* pp. 89, 114 *식품의약품안전청.*
- 한국작물보호협회 (2010) *농약사용지침서, 삼정인쇄공사* pp. 144~145.

HPLC를 이용한 사과, 감귤, 배추, 고추 중 살균제 Cyprodinil의 분석법 확립

이혜리·류명주·김은혜·문준관·도정아¹·오재호¹·권기성¹·임무혁²·이영득³·김정한*

서울대학교 농생명공학부, ¹식품의약품안전평가원 화학물질과, ²식품의약품안전청 식품기준과, ³대구대학교 생명환경학부

요 약 본 연구는 살균제 cyprodinil의 잔류분석을 대부분의 해당 농작물에 적용할 수 있도록 대표 작물을 선발하고, 회수율을 포함한 분석법 검증을 통하여 cyprodinil의 단성분 정밀 분석법을 개발하였다. 대표 작물로는 사과, 감귤, 배추, 고추를 선정하였고, 마쇄한 농작물 시료에 acetonitrile을 가한 후 진탕하여 잔류물을 추출하였다. 추출액을 감압농축 한 뒤, 농축물을 포화식염수와 증류수로 희석하고 *n*-hexane으로 분배하였다. 분배액을 농축하고 ethyl acetate:*n*-hexane 혼합액(15:85, v/v)으로 용리하는 silica gel 크로마토그래피법으로 정제 후, 농축하여 HPLC로 분석하는 방법을 확립하였다. Cyprodinil의 정량한계(LOQ : limit of quantitation)는 5 ng(S/N>10)이었고, 분석정량한계(MQL : method quantitation limit)는 0.05 mg/kg이었다. 무처리 시료에 cyprodinil 표준용액을 3수준(MQL, 10MQL과 100MQL) 3반복으로 처리하여, 확립된 전체 분석과정을 이용하여 회수율을 산출한 결과는 82.0~108.2%이었으며, 농산물 시료에 관계없이 반복 간 분석오차는 10% 미만이었다.

색인어 Cyprodinil, HPLC, LOQ, MQL, 회수율