

HPLC-UVD/MS를 이용한 작물 중 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 분석법 확립

이수진 · 김영학 · 황영선 · 권찬혁¹ · 도정아¹ · 임무혁² · 이영득³ · 정명근*

강원대학교 생약자원개발학과, ¹식품의약품안전평가원 화학물질과,
²식품의약품안전청 식품기준과, ³대구대학교 생명환경학부

(2010년 3월 8일 접수, 2010년 3월 18일 수리)

Determination of Methoxyfenozide, Chromafenozide and Tebufenozide Residues in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS

Su-Jin Lee, Young-Hak Kim, Young-Sun Hwang, Chan Hyeok Kwon¹, Jung-A Do¹, Moo Hyeog Im², Young Deuk Lee³ and Myoung-Gun Choung*

Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, 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

The diacylhydrazine insecticides, methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide are new-generation insecticides. These insecticides induce premature molting and cause the death of insects by mimicking their hormone. Also, these insecticides have already been widely used for vegetables planting in worldwide. High-performance liquid chromatography (HPLC) is the most widely used procedure for determination of each compound residues in crops. However, simultaneous analysis method of these diacylhydrazine insecticides was not reported. The purpose of this study is to develop a simultaneous determination procedure of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide residue in crops using HPLC-UVD/MS method. These insecticide residues were extracted with acetone from representative samples of five raw products which comprised hulled rice, soybean, apple, pepper, and Chinese cabbage. The extract was diluted with saline water, and dichloro-methane partition was followed to recover these insecticides from the aqueous phase. Florisil column chromatography was additionally employed for final cleanup of the extracts. The analytes were quantitated by HPLC-UVD/MS, using a C₁₈ column. The crops were fortified with each insecticide at two levels per crop. Mean recoveries ranged from 89.0 to 104.8% in five representative agricultural commodities. The coefficients of variation were less than 3.9%. Quantitative limits of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide were 0.04 mg/kg in crop samples. A HPLC-UVD/MS with selected-ion monitoring was also provided to confirm the suspected residues. The proposed simultaneous analysis method was reproducible and sensitive enough to determine the residues of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide in agricultural commodities.

Key words methoxyfenozide, chromafenozide, tebufenozide, residue, HPLC-UVD/MS

서론

국내 농약 사용량은 1970년에 3,719 M/T이었으나, 2006년 24,076 M/T으로 크게 증가하였고, 2006년 통계 기준 1,200여 품목이 등록되어 있으며(한국작물보호협회, 2008), 농약은 농작물의 병·해충 및 잡초 등의 방제를 통한 막대한 양의 식량증산, 품질향상 및 노동력 절감에 기여하는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 농약은 생물의 생리작용을 저해하는 역할을 하기 때문에 근본적으로 독성을 가진 화합물이며, 작물에 살포된 후 농약의 특성이나 환경조건에 따라 수확물에 잔류되는 경우가 발생한다. 따라서 농약이 과다하게 잔류된 농작물 혹은 식품을 섭취할 경우 건강 위해성이 발생할 수 있는 가능성이 있기 때문에 농산물의 농약잔류허용기준(Maximum Residue Limit; MRL, 단위 mg/kg (ppm))을 설정하여 국제적 수준에서는 물론, 국가차원에서 관리감독을 실시하고 있다(Lee 등, 2008).

최근 농약잔류성 문제가 농산물의 청정성을 해치는 주요 요인이라는 국민들의 선입관이 생기면서 농약을 전혀 사용하지 않았거나, 조금만 사용하는 친환경 농법이 확산되고 있으며, 농산물의 안정성에 많은 관심이 고조되고 있는 실정이다. 현재 국내사용 농약의 경우 일부 속효성 약제를 제외하고는 방제 목적상 살포 후 일정기간 잔류되는 약제 특성이 있어 최종 수확 농산물에 살포농약이 잔류할 가능성이 있으므로 살포 농약들로부터 안전성의 확보는 반드시 이루어져야 할 것이다(권 등, 2003).

농작물의 병·해충 방제에 사용되는 농약에는 살충제, 살균제, 제초제, 식물생장조절제, 살웅애제 등 다양한 종류가 사용되고 있으나, 이중 diacylhydrazine계 살충제인 methoxyfenozide [N-tert-butyl-N'-(3-methoxy-o-toluoyl)-3,5-xylohydrazide], chromafenozide [2'-tert-butyl-5-methyl-2-(3,5-xyloyl) chromane-6-carbohydrazide] 및 tebufenozide [N-tert-butyl-N'-(4-ethyl-benzoyl)-3,5-dimethylbenzohydrazide]는 곤충생장조절(IGR)계 살충제로 비교적 간단한 분자구조로 되어 있어 곤충체와 식물체내에 침투가 용이하고, 곤충 탈피 호르몬인 20-hydroxyecdysone의 길항물질(agonist)로 작용하여 유충의 조숙탈피를 유발하며, 탈피 시 치사시키고, 또한 섭식 저해효과도 탁월한 것으로 보고되고 있다(Smagghe 등, 1999). 전 세계적으로 벼의 이화명나방과 흑명나방, 목초지의 멸강나방 및 배추, 고추, 파, 감, 사과, 감귤, 수박, 고구마, 딸기의 나방류 등 해충방제에 폭넓게 사용되고 있으며(Korea Crop Protection Council, 2005), 비교적 최근에 개발된 ec-

dysone agonist들로서, 기존 살충제와 작용 기작이 상이하여 저항성 유발이 상대적으로 작은 장점이 있어 사용량이 급증하고 있는 살충제 부류이다.

Methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 물리화학적 특성을 살펴보면 대상농약의 *n*-octanol/water 분배계수(log Pow, 25°C)는 각각 3.72, 4.25 및 2.7로 비극성 혹은 중간극성의 중성 화합물이며, 증기압이 1×10^{-3} mPa 미만으로 비휘발성의 특성을 나타내고, 20°C 물에 대한 용해도는 0.83~3.3 mg/L를 나타내며, 일반유기 용매에는 잘 용해되는 특성이 있다.

현재 diacylhydrazine계 살충제 중 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 기기분석은 대상 화합물들이 비휘발성의 특성과 분자구조 내에 -NH기를 함유하고 있으므로 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)를 이용한 분석이 적용된바 있으나(Sundaram, 1997; Nippon Kayaku Co., 2000; Lo 등, 2007) 대상 화합물 3종을 포괄한 계열별 동시분석법은 아직 보고된 바 없는 상황이며, 단지 methoxyfenozide 및 tebufenozide의 경우 기존 HPLC-UVD 방법보다 LC/MS/MS 분석법이 상대적으로 시간 효율적, 실시간 검증 및 정확성 면에서 우수하다는 내용의 동시분석법이 보고된 바 있다(Lin 등, 2008).

현재 methoxyfenozide 및 tebufenozide의 경우 국내 식품공전(식품의약품안전청, 2009)의 분석방법은 4.1.2.2 다중농약다성분 분석법 - 제 2법의 적용으로 HPLC-UVD 254 nm 조건의 기기분석을 적용하고 있으므로 분석 대상성분의 최적 분석조건이 고려되지 않은 상태에서 다성분 분석법으로 분석되고 있으며, 특히 다중농약다성분 분석법의 특성 상 정제정도가 충분하지 못하여 간섭물질의 혼입을 초래하고, 정확성 및 재현성이 불량한 것으로 평가되고 있다. 또한 chromafenozid의 경우 국내 등록된 농약이나 잔류분석법이 미비하여 분석법 개발의 필요성이 있고, 화합물의 특성 상 methoxyfenozide 및 tebufenozide와 유사하므로 동시 시료조제법의 적용이 가능하다고 판단된다.

따라서 본 연구에서는 물리화학적 특성이 유사한 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide를 대상으로 계열별 분석법을 확립하여 농축, 유지 제거과정 및 정제과정이 간소화된 신뢰성 높은 HPLC-UVD/MS 동시분석법을 확립하여 일상적 분석법으로서의 범용성과 효율성을 극대화하고자 하였다.

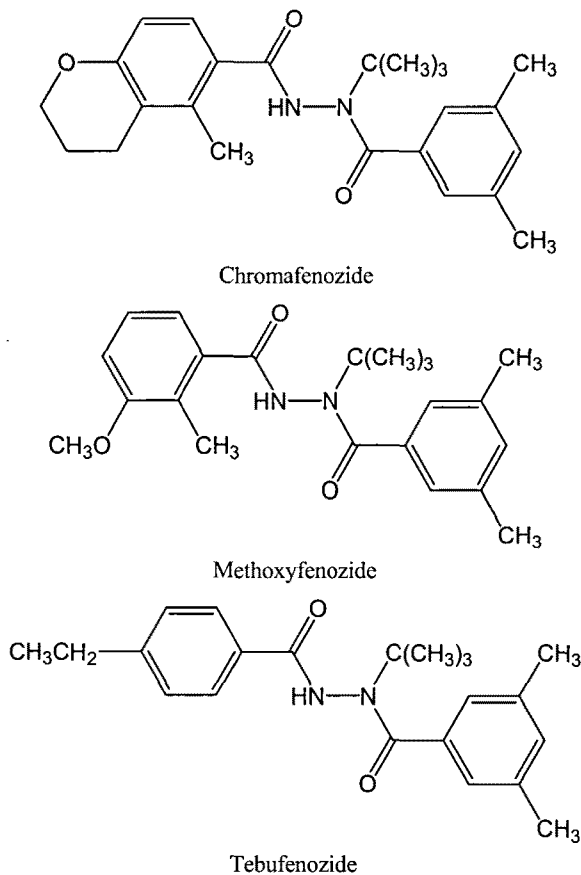


Fig. 1. Chemical structures of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide.

재료 및 방법

시약 및 기구

본 연구에서 사용된 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 분석용 표준품은 순도 98% 이상의 분석용 표준품을 Chem Service로부터 구입하여 사용하였다. 표준품의 stock solution은 methanol에 각 500 mg/L의 농도로 조제하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 필요시마다 보관 중인 stock solution을 희석하여 사용하였다. Florisil(60~100 mesh, 잔류분석용)은 J. T. Baker(USA)로부터 구입하여 130°C에서 하룻밤 가열하여 탈수시킨 후 활성화하여 사용하였다. n-Hexane, dichloromethane, acetonitrile 및 ethyl acetate는 잔류분석용을 acetone, methanol 및 deionized water는 HPLC용을 J. T. Baker(USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 유기용매 및 무기시약은 시약특급 또는 잔류분석용을 사용하였다. 농축기는 Eyela NE-1000SW(Japan)를 사용하였고, 농산물 시료는 호모게나이저(IKA, Ultra-Turrax T-25, USA)를 이용하여 마쇄 및 균질화 하였다.

Table 1. HPLC operating conditions of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide

HPLC system	Agilent 1200 series (USA)
Detector	Diode Array Detector (225 nm)
Column	YMC-pak ODS AM 303 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm spherical, Japan)
Column Temp.	35°C
Mobil phase	Solvent A: Water, Solvent B: Methanol Isocratic elution 67% B (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection vol.	20 μL

농산물 시료

식품의 농약 잔류허용기준(식품의약품안전청, 2009) 중 methoxyfenozide 및 tebufenozide에 사용등록 되어 기준이 설정된 농산물 중 곡류는 현미, 두류는 콩, 채소류는 고추 및 배추, 과일류 중 사과를 대표시료로 선정하였고, chromafenozide의 경우 아직 국내 잔류허용기준이 설정되어 있지 않아 methoxyfenozide 및 tebufenozide와 동일한 농산물 시료를 적용하였다. 분석에 사용된 현미, 콩, 고추, 배추 및 사과의 무농약 시료는 지역 대형마트에서 유기농 인증시료를 구입한 후 식품공전 상 검체 처리방법에 따라 전처리 하였으며(식품의약품안전청, 2009), 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인한 후 사용하였다.

HPLC-UVD/MS 기기분석 조건

농산물 중 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1200 series(USA)를 사용하였고, 컬럼은 YMC-pak ODS AM 303(4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm spherical)을 사용하였고, 기타 분석조건은 Table 1과 같다. 한편 LC/MS분석은 Agilent 6110 Quadrupole LC-MS를 사용하였고, 분석 조건 중 일부는 HPLC 분석과 달리하여 분석을 실시하였으며, 자세한 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

검출한계(Limit of Detection) 및 정량한계(Limit of Quantification) 측정

Methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 각 표준용액 0.05~0.5 mg/kg을 20 μL씩 HPLC에 주입하여 크로마토그램의 signal/noise의 비를 구하여 LOD 및 LOQ를 계산하였다.

Table 2. LC-MS operating conditions of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide

HPLC system	Agilent 1200 series (USA)
MSD	Agilent 6110 Quardropole LC/MSD
Column	YMC-pak ODS AM 303 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm spherical, Japan)
Column temp.	35°C
Mobil phase	Solvent A: Water contained 0.1% formate Solvent B: Methanol contained 0.1% formate Isocratic elution 67% B (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection vol.	5 μL
Ionization	ESI Positive-ion mode
Gas temp.	350°C
Drying gas	N ₂ , 12 mL/min
Mass range	200~600 m/z
Capillary voltage	4.0 kV

표준검량선 작성

Methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 농도별 표준용액은 각각의 stock solution을 혼합하여 성분별 0.02~2 mg/L의 농도가 되도록 차례로 희석하고, 20 μL를 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

분배용매별 분배효율 검증

150 mL의 acetone에 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 혼합 표준용액(2 mg/L) 1 mL를 첨가하고, 50 mL의 포화식염수와 450 mL의 증류수를 가한 뒤, 분액여두에 옮기고, 분배용매로 *n*-hexane 100 mL, *n*-hexane/dichloromethane(20/80, v/v) 100 mL, dichloromethane 50 mL (× 2회) 및 문헌적으로 우수한 추출효율을 보인다고 보고된 (Lin 등, 2008) 1M NaOH를 첨가한 dichloromethane 50 mL (× 2회)로 처리를 달리하여 각각 추출하였다. 각 분배 추출액은 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하고 40°C 이하에서 감압농축 하였다. 농축된 잔류물은 10 mL 67% 메탄올에 재용해하여 HPLC로 분석하였으며, 분배용매별 3반복으로 실험을 수행하여 회수율을 계산하였다. 한편 현미 및 콩과 같이 비극성인 지용성 물질이 많이 함유되어 있는 농산물에서 비극성 유지성분의 제거를 위한 추가적 액-액 분배과정의 효율 검토는 분배용매별 효율 검증에서 가장 우수한 분배용매로 결정된 dichloromethane 50 mL(× 2회)로 분배된 추출액을 무수 sodium sulfate 20 g에 통과시켜 수분을 제거

하고 40°C 이하에서 감압농축한 후, acetonitrile이 포화된 *n*-hexane 40 mL를 첨가하고, *n*-hexane이 포화된 acetonitrile 40 mL씩 2회 및 3회 분배 추출한 후 40°C 이하에서 감압농축 하였으며, 농축된 잔류물은 10 mL 67% 메탄올에 재용해하여 HPLC로 분석하였고, *n*-hexane/acetonitrile 분배 횟수별 회수율을 계산하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건외의 검토

130°C에서 하룻밤 동안 가열하여 탈수시킨 활성화된 florisil 10 g을 내경 1.5 cm, 길이 40 cm의 유리칼럼에 건식 충전한 후, 3 g의 무수 sodium sulfate를 위에 첨가하였다(이하 florisil 컬럼). 충전된 florisil 컬럼에 *n*-hexane 50 mL를 가하여 상단에 소량의 *n*-hexane이 남을 정도로 유출시켜 활성화시킨 후 *n*-hexane에 용해된 2 mg/L 농도의 표준용액 10 mL를 가하고, 다시 100 mL의 *n*-hexane/ethyl acetate(90/10, v/v) 용액으로 pre-washing 후 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액의 조성별로 각각 50 mL씩 3회 용리시켰으며, 각 혼합용액의 조성별 용리액을 농축시킨 후 67% 메탄올 10 mL로 재정용 하였다. 이 용액 20 μL를 HPLC로 분석하여 용리액의 조성별 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 회수율을 검토하였다.

분석정량한계(MQL; Method Quantitative Limit)의 설정

분석정량한계(MQL)는 정량한계(LOQ)와 시료량 및 분석조작 중의 희석배율을 고려하여 아래의 공식에 의하여 계산하였다.

$$\text{MQL (mg/kg)} = \frac{[\text{정량한계} \times \text{HPLC 주입전 최종시료용액량 (mL)}]}{[\text{HPLC 주입량 (μL)} \times \text{시료량 (g)}]}$$

대표작물 중 회수율의 측정

본 연구에서 확립한 잔류분석법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위하여 회수율 시험을 수행하였다. 즉 무농약 농산물 시료를 마쇄하고 시료 25 g에 MQL의 10 및 50배에 해당하는 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 표준용액을 첨가한 다음 상기 분석과정을 행하여 회수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건 확립

Methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 *n*-

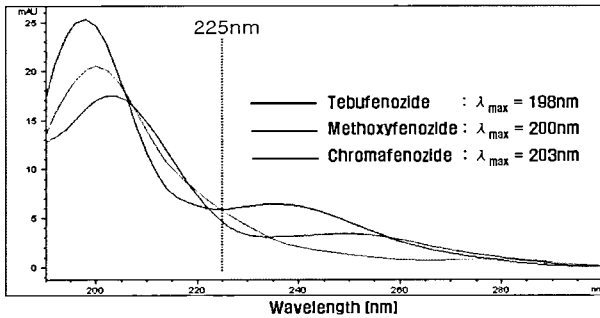


Fig. 2. UV absorption spectra of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide in on-line HPLC/DAD.

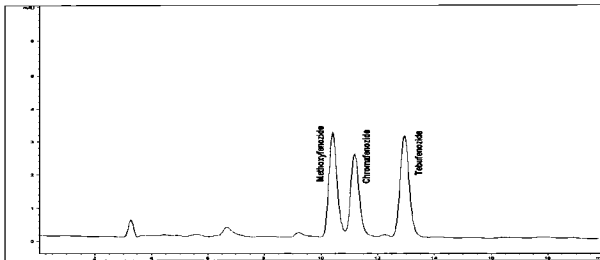


Fig. 3. Chromatographic behavior of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide in HPLC (0.5 mg/kg).

octanol/water 분배계수(log Pow, 25°C)는 2.7~4.3이며, 20°C 물에 대한 용해도는 0.83~3.3 mg/L으로 거의 녹지 않는 비극성 화합물이다. 또한 증기압이 모두 1×10^{-3} mPa 미만으로 매우 낮아 GLC로 분석하기는 어려울 것이므로 HPLC에 의한 분석법을 검토하였다. 잔류농약 분석 시 HPLC의 검출기로 사용빈도가 높은 검출기는 자외흡광검출기, 형광검출기 및 전기화학검출기를 들 수 있으나, 대상 농약들은 산화환원 반응을 피지 않고, 자체 분자구조 내 형광을 나타내지도 않으며, 분자구조 내 -NH기를 함유하고 있어 분자구조상 230~260 nm에서 흡광도가 발생할 것으로 예상되어 자외흡광검출기법을 선택하였다. 대상 화합물 3종의 동시분석을 위한 최적의 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 메탄올에 용해한 각 2 mg/L의 표준품을 on-line HPLC/DAD를 이용하여 200~300 nm 범위에서 각 성분별 최대흡수파장(λ_{max})을 검토하였다. 그 결과 methoxyfenozide는 200 nm에서, tebufenozide는 198 및 236 nm, chromafenozide는 203 및 250 nm에서 각각 높은 흡광도를 나타내었으며(Fig 2), 세 가지 농약 성분의 최대 흡광도를 고려할 때 검출파장으로는 약 200~210 nm가 가장 감도가 우수할 것으로 예상되나, 210 nm 부근의 파장 영역에서는 용매에 의한 노이즈 현상이 심할 것으로 판단되어 세 성분의 최적 흡광도를 고려하여 분석파장을 225 nm로 설정하였고, 분석파장이 다소 단파장임으로 시료추출 후 충분한 정

Table 3. Reproducibility of HPLC peak area and retention time (Rt.) for methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide

Parameter	Methoxyfenozide		Chromafenozide		Tebufenozide	
	Area	Rt.	Area	Rt.	Area	Rt.
CV (%)	1.66	0.31	1.79	0.32	1.53	0.34

제과정을 통해 농산물 및 식품시료에서 유래하는 천연 성분이 충분히 제거 되어야만 HPLC를 이용한 기기분석이 가능할 것으로 판단되어진다.

분석용 HPLC 칼럼은 C₁₈계열의 YMC-pak ODS AM 303 (4.6×250 mm, 5 μ m)을 이용하였고, 이때 이동상으로 여러 종류의 용매계를 검토한 결과 증류수 : 메탄올(33:67, v/v)의 isocratic 조건에서 분리가 가장 양호한 양상을 나타내었으며, 상기 Table 1의 HPLC 분석조건에서 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 머무름 시간을 조사한 결과 15분 미만에 대상 성분 모두 극성별로 분리 용출이 가능한 것을 확인하였다.

검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)의 설정 및 분석 재현성 평가

검출한계는 기기분석 시 크로마토그램에서 peak로 검출할 수 있는 한계농도를 의미하는 것으로 크로마토그램 상에서 S/N(signal/noise)비가 3 이상을 나타내는 성분의 농도를 의미한다. 한편 정량한계는 크로마토그램의 해석 시 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계농도로서, 크로마토그램 상에서 검출된 peak의 S/N(signal/noise)의 비가 10 이상(LOD의 3배 이상)을 나타내는 성분의 농도를 의미한다(Fong 등, 1999; Miller, 2005). Table 1의 HPLC 조건에서 다양한 농도의 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과 정량한계(S/N \geq 10)는 0.1 mg/kg(2 ng/20 μ L) 수준이었다. 한편 분석 기기의 안정성 평가를 위해 재현성 평가를 실시하였는데 1 mg/kg의 혼합 표준품을 10번 반복 주입 분석하여 머무름 시간 및 peak 면적의 변이계수(CV, %)를 조사하였고, 두 변수 모두 최대 1.79% 미만으로 극히 높은 분석 재현성을 나타내어 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 3).

검량선의 직선성

Methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 농도별 표준용액(0.02~2 mg/L) 20 μ L를 HPLC에 주입, 분석

하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 각각 $y=62.719x-0.8229$ ($R^2=0.9998$), $y=52.8377x-0.8571$ ($R^2=0.9995$) 및 $y=67.37x-0.486$ ($R^2=0.9996$)으로 직선성이 우수하였다.

분배용매별 분배효율 검증

농산물 시료로부터 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 성분을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용하였다. Acetone은 USFDA법이나 AOAC법에서 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매로서 이미 많은 연구자들에 의하여 농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다(Kwon 등, 2008). 농산물 추출물로부터 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 성분 외에 추출 혼입된 농산물 유래 불순물을 세척하기 위한 조정제 분배법으로 *n*-hexane, *n*-hexane/dichloromethane 혼합액, dichloromethane 및 문헌적으로 대상 농약의 추출 효율이 우수하다고 보고된(Lin 등, 2008) 1M NaOH가 함유된 염기성 조건의 dichloromethane을 분배용매로 이용하여 최적의 분배법을 확립하고자 하였다. 분석대상 농약이 비교적 낮은 극성 혹은 중간극성을 나타내는 점을 감안하여 수용성 유기용매 추출액을 포화식염수/증류수로 희석한 후 직접 비극성 용매인 *n*-hexane이나 *n*-hexane/dichloromethane 혼합액, 혹은 낮은 극성을 나타내는 dichloromethane 등으로 분배하는 방법을 검토하였다(Table 4). 대상성분들의 액-액 분배조건에 따른 분배효율을 조사한 결과 *n*-hexane 용액 100 mL로 분획하였을 때 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 성분의 회수율은 각각 55~78% 였으며, *n*-hexane/dichloromethane(20:80, v/v)용액 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 약 82~102% 수준을, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 약 95~118%, 문헌적으로

Table 4. Efficiency of liquid-liquid partitioning with four different solvents

Compound	Recovery ratio (%) ¹⁾			
	Partition I ²⁾	Partition II	Partition III	Partition IV
Methoxyfenozide	60.13±2.01	81.90±1.50	95.47±3.48	93.77±1.17
Chromafenozide	55.10±2.81	102.43±2.70	118.07±2.32	120.50±1.85
Tebufenozide	77.67±3.51	82.70±3.97	97.03±1.70	96.03±1.50

¹⁾Mean values of triplicate samples

²⁾Mixture partition solvent : 150 mL acetone+50 mL saturated NaCl+450 mL distilled water. I, 100 mL *n*-hexane, II, 100 mL *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v), III, 50 mL dichloromethane (× 2 times), IV, 50 mL dichloromethane contained 1 mL 1M NaOH (× 2 times)

우수하다고 알려진(Lin 등, 2008) 1M NaOH 1 mL함유 dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 94~121%를 나타내었으나 일부 성분이 120%가 넘는 양상을 나타내었고, 1M NaOH가 함유되지 않는 조건과 큰 차이가 없어 분획용매 III을 액-액 분배조건에 의한 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 성분의 분배 용매로 선정하였다.

Dichloromethane을 이용한 액-액 분배과정에 의하여 시료 중에 포함된 상당부분의 극성 및 일부 비극성 방해물질은 제거되었으리라 판단되지만, dichloromethane 분배 시 *n*-hexane에 비하여 불순물이 많이 추출되기 때문에 비극성 간섭물질은 완전하게 제거되지 않았을 것으로 판단되므로 추가적인 정제과정이 필요할 것이다. 또한 본 연구의 대상 시료들 중 일부 시료인 현미와 콩은 지방 함량이 최대 20% 이상 함유되어 있을 수 있으므로 비극성 지방성분을 제거하는 데 효율이 높은 *n*-hexane/acetonitrile법과 같은 지방 제거법을 적용하여 분배효율을 검토하였다(Table 5). *n*-Hexane/acetonitrile 분배를 2회 수행하였을 때 각 성분별 회수율이 최소 97% 이상을 나타내었고, 3회의 분배를 수행하여도 회수율이 크게 향상되지 않는 양상을 나타내었으므로, 유지 등 비극성 간섭물질의 제거를 위한 *n*-hexane/acetonitrile 분배법은 분획조건 I로 분배하는 것으로 설정하였으며, 이 방법은 고 유지 시료로 판단되는 콩 및 현미 시료의 회수율 시험에 적용할 계획이며, 반면 지방함량이 1% 미만인 저 지방 시료인 배추, 사과, 고추 등에서는 그 정제정도가 극히 미미할 것으로 판단되어 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 생략하고 회수율 시험을 수행하였다.

Florisil 흡착크로마토그래피 정제조건 검토

이온성을 띄지 않는 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 경우 흡착 크로마토그래피에 의한 추가

Table 5. Efficiency of liquid-liquid partitioning with *n*-hexane/acetonitrile

Compound	Recovery ratio (%)	
	Partition I ¹⁾	Partition II
Methoxyfenozide	99.60±3.37	100.53±4.24
Chromafenozide	109.91±2.86	108.83±6.68
Tebufenozide	96.99±1.95	95.80±2.67

¹⁾Mixture partition solvent : I, 40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile+40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (× 2 times), II, 40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile+40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (× 3 times)

Table 6. Elution profile on forisil dry column

Elution solvent (v/v)	Recovery ratio (%) ¹⁾											
	0 - 50 mL			51 - 100 mL			101 - 150 mL			Total		
	1 ²⁾	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
90 : 10 ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85 : 15 ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80 : 20 ³⁾	1.67	4.45	36.76	26.67	16.60	52.94	42.00	31.98	10.88	70.33	53.04	100.59
70 : 30 ⁴⁾	14.33	18.62	71.76	74.00	66.80	28.44	7.67	20.24	0	96.00	105.67	100.20
70 : 30 ⁵⁾	52.00	40.08	92.94	44.67	54.66	9.90	0	17.00	0	96.67	111.74	102.84

¹⁾10g of activated florisil (60-100mesh) was dry packed.

²⁾Pesticide: 1, methoxyfenozide; 2, chromafenozide; 3, tebufenozide.

³⁾*n*-Hexane/ethyl acetate (20/80, v/v).

⁴⁾Pre-washed 100 mL of *n*-hexane/ethyl acetate (90/10, v/v), and then eluted *n*-hexane/ethyl acetate (v/v/v).

⁵⁾Pre-washed 100 mL of *n*-hexane/ethyl acetate (85/15, v/v), and then eluted *n*-hexane/ethyl acetate (v/v/v).

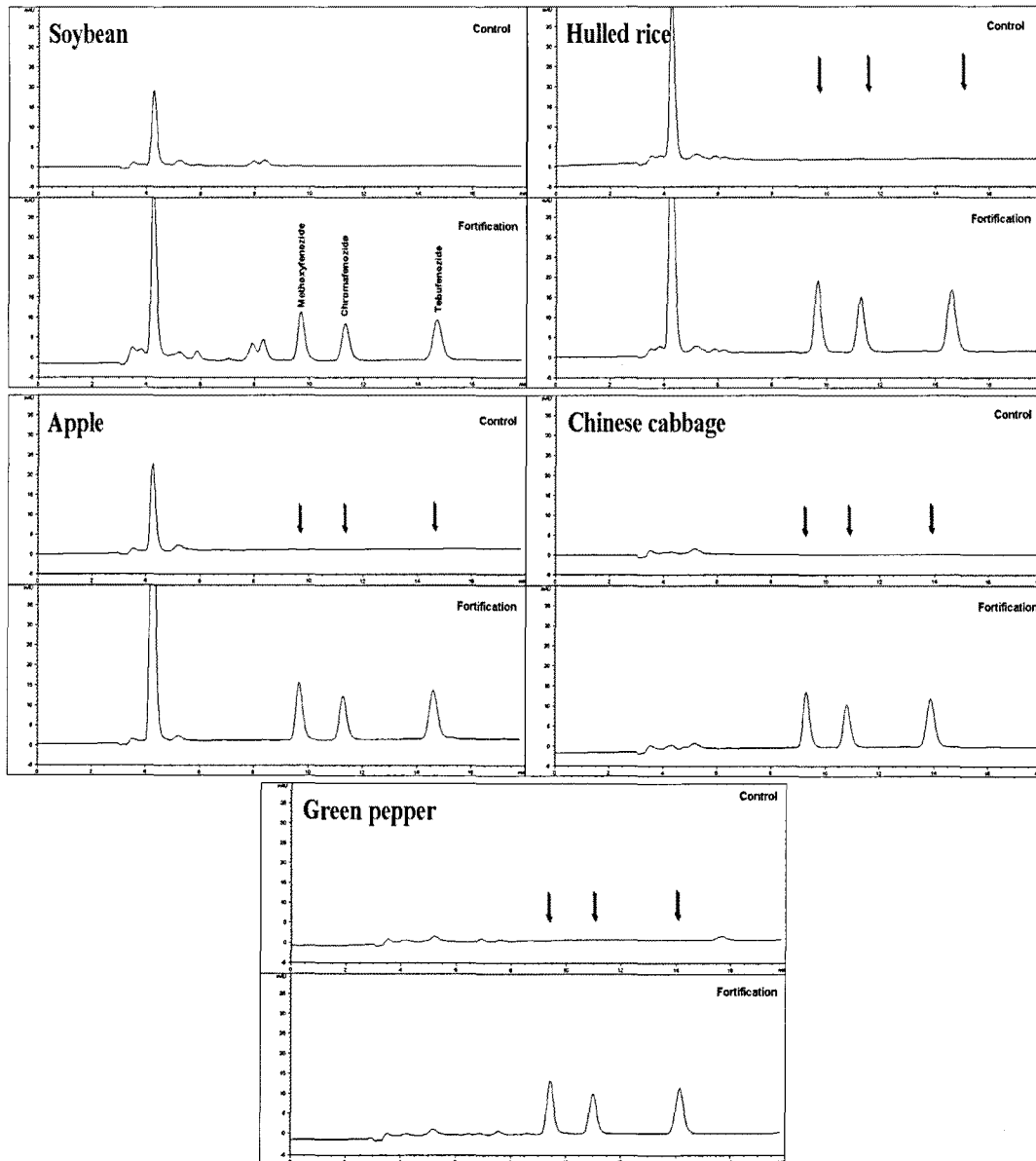


Fig. 4. HPLC chromatograms of different agricultural commodity extracts (fortification concentration: ten-fold of MQL).

정제가 농산물 시료로부터 유래한 기타 불순물의 추가정제에 효율적일 것으로 판단된다. 흡착크로마토그래피는 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 방법으로, 흡착제로는 silica gel, florisil 및 alumina가 많이 사용되어 진다. 이 중 florisil은 색소와 지방의 제거가 뛰어나 미국의 FDA(1999)나 AOAC (2000) 등에서 가장 많이 사용하는 방법이다. 본 연구에서도 분석대상 성분의 극성 등을 고려하여 florisil을 흡착제로 선정 하였으며, 용매의 극성 조절을 위해 *n*-hexane/ethyl acetate의 용매체계를 사용하여 최적의 정제방법을 검토하였다(Table 6).

Florisil 흡착크로마토그래피용 용매의 다양한 극성 조절을 이용하여 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 회수율을 검토한 결과 *n*-hexane/ethyl acetate(85:15, v/v) 용매 100 mL로 pre-washing 한 후, *n*-hexane/ethyl acetate(70:30, v/v)의 혼합용매 150 mL로 용출할 경우 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 세 성분 모두 최소 97~112%의 회수율을 확인할 수 있어 검토된 용매체계 중 가장 우수한 양상을 나타내어 florisil 흡착크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거법으로 확립하였다.

분석정량한계

분석정량한계는 정량한계, 시료량 및 분석조작 중의 희석 배율 등을 감안하여 산출한 수치로서, 실험에 적용된 전체적 분석방법이 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계를 의미하며 (Lee 등, 2008) 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(이영득, 2009)에는 0.05 mg/kg 이하 또는 MRL의 1/2 이하까지 정량이 가능하도록 추천하고 있다. 본 실험의 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 분석정량한계는 모두 0.04 mg/kg으로 계산되어 잔류분석법 기준에 적합하였다.

농산물 적용 시의 회수율

마쇄한 각각의 농산물 무처리 시료에 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 표준용액을 10 및 50 MQL의 농도가 되도록 첨가하고, 상기 검토된 전체적 분석방법으로 3회 반복하여 분석한 결과(Fig. 4) 10 MQL수준에서는 88.98~100.16%, 50 MQL 수준에서는 91.69~104.75%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성도 양호하여(CV < 3.9%) 분석성분, 처리수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석 기준인 회수율 70~120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하였다(Table 7~9). 따라서 이상의 결과에서 확립된 분석법은 국내 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide에 대해 잔류허용기준이 설정된 농산물에 충분히 적용이 가능함을 알 수 있다.

LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인 및 회수율 검증

한편, 개발된 분석법의 신뢰성을 증대하기 위하여 LC/MS 의한 재확인 과정을 추가하였다. LC/MS 분석 시 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다(Kwon 등, 2008). Methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 이온화를 돕기 위하여 HPLC 분석에 이용된 이동상 용매에 0.1%의 formic acid를 첨가하여 분석을 실시하였고, ESI positive-ion mode에서 높은 감도를 나타내었으며, total-ion chromatogram으로 Fig. 5~6과 같은 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 mass spectrum을 얻을 수 있었으며, 각 성분에 대한 모분자로 부터 sodium(Na)이 결합된 형태인 부가생성물의 특징적인 측정 fragments를 확인할 수 있었다.

Table 7. Recovery ratio of methoxyfenozide in different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%) ¹⁾	CV (%)	MQL (mg/kg)
Soybean	0.4	97.24±0.52	0.54	0.04
	2.0	91.69±0.89	0.97	
Hulled rice	0.4	97.97±1.38	1.41	0.04
	2.0	92.16±0.66	0.65	
Apple	0.4	93.64±1.79	1.94	0.04
	2.0	96.41±3.57	3.71	
Green pepper	0.4	88.98±1.38	1.55	0.04
	2.0	92.00±0.94	1.02	
Chinese cabbage	0.4	94.55±0.41	0.43	0.04
	2.0	93.69±1.92	2.05	

¹⁾Mean values of triplicate samples with standard deviations.

Table 8. Recovery ratio of chromafenozide in different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%) ¹⁾	CV (%)	MQL (mg/kg)
Soybean	0.4	97.26±1.55	1.60	0.04
	2.0	92.55±0.75	0.81	
Hulled rice	0.4	100.16±1.14	1.14	0.04
	2.0	104.75±0.70	0.67	
Apple	0.4	94.20±1.98	2.10	0.04
	2.0	96.34±3.71	3.85	
Green pepper	0.4	90.66±2.56	2.82	0.04
	2.0	92.40±0.77	0.84	
Chinese cabbage	0.4	96.46±1.19	1.24	0.04
	2.0	93.83±1.75	1.86	

¹⁾Mean values of triplicate samples with standard deviations.

Table 9. Recovery ratio of tebufenozide in different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%) ¹⁾	CV (%)	MQL (mg/kg)
Soybean	0.4	100.06±0.76	0.75	0.04
	2.0	97.79±0.74	0.76	
Hulled rice	0.4	99.44±1.95	1.96	0.04
	2.0	100.70±2.10	2.08	
Apple	0.4	95.58±1.38	1.44	0.04
	2.0	100.85±1.61	1.60	
Green pepper	0.4	95.58±1.13	1.18	0.04
	2.0	98.21±0.47	0.48	
Chinese cabbage	0.4	95.89±0.37	0.39	0.04
	2.0	99.11±1.77	1.79	

¹⁾Mean values of triplicate samples with standard deviations.

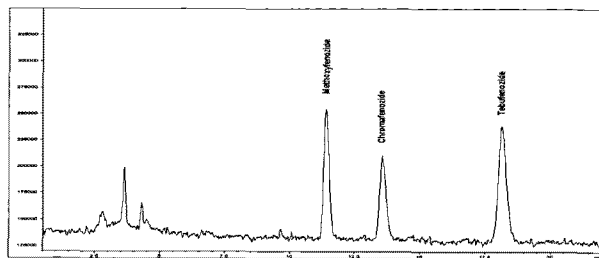


Fig. 5. Total-ion chromatogram of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide in LC/MS (Each 5 ng was injected).

Fig. 7에서는 selected ion monitoring(SIM) mode에서 본 실험에 사용한 농산물의 대표성 시료에서 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 잔류분을 재확인한 chromatogram이다. 본 실험에서 사용한 농산물의 무처리 시료에서는 대상 농약성분의 peak가 전혀 관찰되지 않았으며, 처리된 시료에서는 각 성분별 동일한 머무름 시간대에 정확

하게 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 잔류분만을 확인할 수 있었다. 또한 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 세 성분 모두 검출할 수 있는 감도 또한 S/N >10에서 0.02 mg/kg 수준의 잔류분 까지 검출할 수 있는 높은 감도를 나타내었고, 5종의 대표 작물에 대한 회수율을 검증한 결과 10 및 50 MQL 수준에서 86.5~96.7%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성도 양호하여(CV < 1.8%) 분석성분, 처리수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70~120% 범위와 분석오차 10% 이내를 완전하게 만족시켰다. 따라서 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC/UVD를 이용한 정량법과 더불어 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 추가적인 정량법으로도 완벽하게 사용이 가능할 것으로 판단된다.

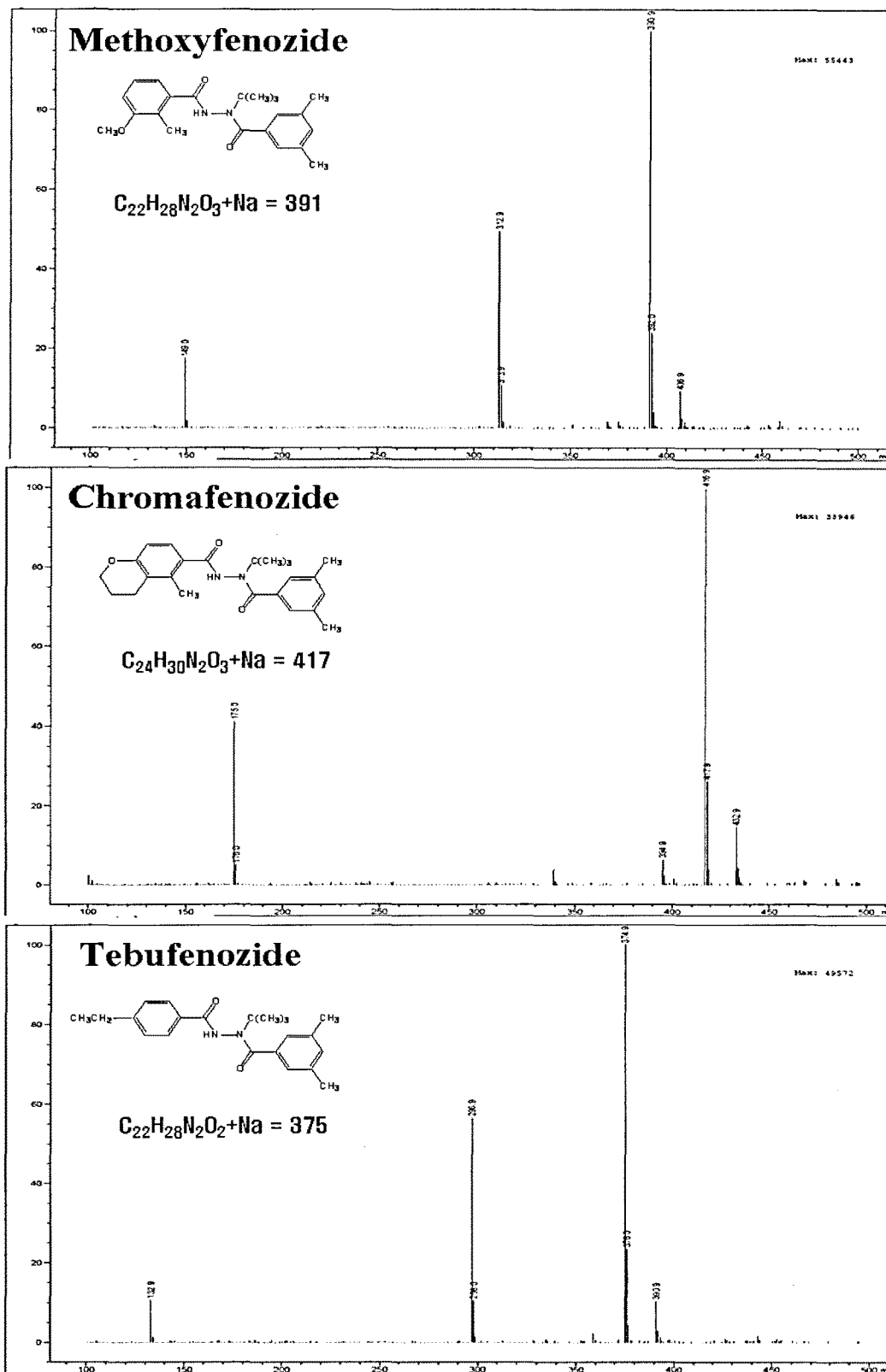


Fig. 6. Typical mass spectra of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide.

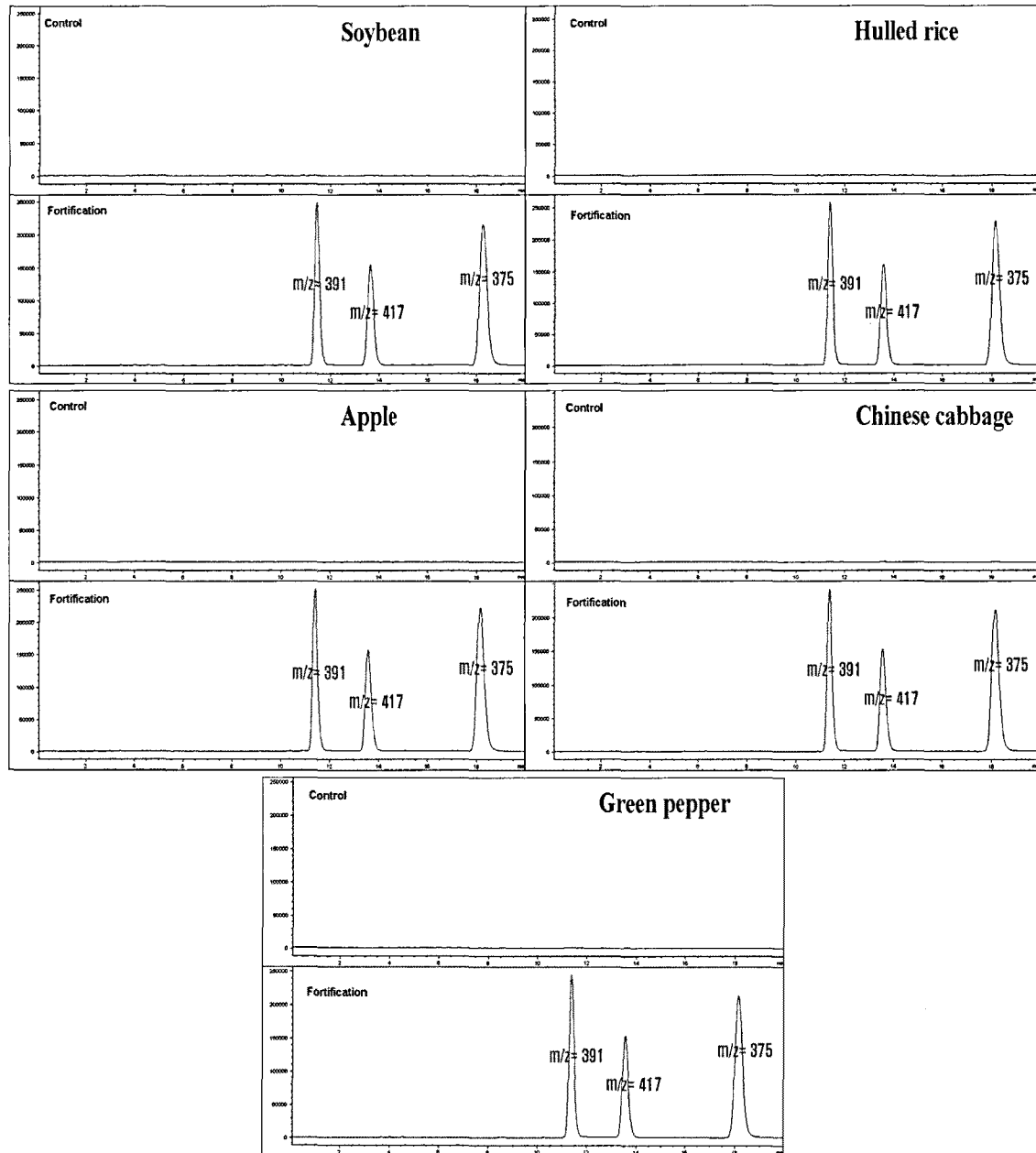


Fig. 7. SIM chromatograms of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide for agricultural commodities (fortification concentration: ten-fold of MQL).

결론

HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 시료에서 diacylhydrazine계 살충제인 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 잔류 분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 acetone을 가하여 추출된 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 florisil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다. C₁₈ 컬럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은

없었으며, 대표 농산물 중 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 분석정량한계(MQL)는 0.04 mg/kg이었다. 전체 농산물에 대한 회수율은 89.0~104.8%였으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계없이 10%미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석 기준 이내를 만족하였다. 본 연구에서 확립한 diacylhydrazine계 살충제인 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 잔류분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인과정 및 회수율 검증

의 결과를 총괄해 볼 때 분석과정의 편이성 및 신뢰성이 확보된 공정분석법으로 사용이 가능 할 것으로 판단된다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- AOAC (2000) 'Pesticide and industrial chemical residues, In Official method of analysis', 17th ed., pp.1~88, AOAC International, Arlington, VA, USA.
- 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.
- Korea Crop Protection Council (2005) Pesticides application manual, Seoul, Korea, pp.366~670.
- Kwon, C. H., M. I. Chang, M. H. Im, H. Choi, D. I. Jung, S. C. Lee, J. Y. Yu, Y. D. Lee, J. O. Lee, and M. K. Hong (2008) Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *Analytical Sci. & Technology* 21(6):518~525.
- Lee, J., Park, H., Keum, Y., Kwon, C., Lee, Y., Kim, J (2008) Dissipation pattern of Boscalid in cucumber under green house condition. *Korean Journal of Pesticide Science* 12:67~73.
- Lee, J. H., H. W. Park, Y. S. Keum, C. H. Kwon, Y. D. Lee, and J. H. Kim (2008) Dissipation pattern of boscalid in cucumber under greenhouse condition. *The Korean Journal of Pesticide Science* 12(1):67~73.
- Lin, D., J. Z. Xu, T. Ding, J. J. Zhu, B. Wu, C. Y. Shen, and Y. Jiang (2008) Determination of tebufenozide and methoxyfenozide residues in vegetables using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.* 36(1):87~90.
- Lo, S. C., C. H. Hwang, K. Y. Yoo and S. S. Han (2007) *Korean Journal of Environmental Agriculture* 26(3):246~253.
- Miller, J. M. (2005) *Chromatography : concepts and contrasts* (2nd), Wiley Interscience, p.286~287, USA.
- Nippon Kayaku Co., Ltd. (2000) *Analytical Method of Chromafenozide in ANS-118 5%SC (NK-AZ/118/AM-201)*. pp.5.
- Smagghe, G., Carton, B., Wesemael, W., Ishaaya, I. and Tirry, L. (1999) Ecdysone agonists-Mechanism of action and application on *spodoptera* species, *Pesti. Sci.* 55:386~389.
- Sundaram, K. M. S (1997) High performance liquid chromatographic method for the assay of tebufenozide insecticide in suspension formulations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 20(15):2451~2459.
- US FDA, 'Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multi residue Methods (3rd ed.)', US Food and Drug Administration, USA. 1999.
- 권찬혁, 이영득 (2003) 살충제 monocrotophos와 phosphamidon의 사과 중 잔류특성 평가. *생명과학연구* 1(3):277~286.
- 식품의약품안전청 (2009) *식품공전*.
- 식품의약품안전청 (2009) *식품의 농약 잔류허용기준*.
- 이영득 (2009) *식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서, 식품의약품안전청*.
- 한국작물보호협회 (2008) *생활과 농약*. 1-2:24~27.

HPLC-UVD/MS를 이용한 작물 중 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 분석법 확립

이수진 · 김영학 · 황영선 · 권찬혁¹ · 도정아¹ · 임무혁² · 이영득³ · 정명근*

강원대학교 생약자원개발학과, ¹식품의약품안전평가원 화학물질과, ²식품의약품안전청 식품기준과, ³대구대학교 생명환경학부

요 약 HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 중 diacylhydrazine계 살충제인 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 잔류 분석법을 확립하였으며, 대상 농산물은 현미, 콩, 사과, 배추 및 고추를 선정하였다. 시료에 acetone을 가하여 추출된 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide 성분을 dichloromethane 분배법과 florisil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 HPLC-UVD/MS 분석대상 시료로 하였다. 대상 농약의 동시분석을 위한 최적 HPLC 분석조건을 확립하였으며, 분석대상 농약의 분석정량한계(MQL)는 0.04 mg/kg 이었다. 각 대표 농산물에 대해 정량한계의 10 및 50배 수준에서 회수율을 검정한 결과 모든 처리농도에서 89.0~104.8% 수준을 나타내었으며, 반복 간 변이계수(CV)는 최대 3.9%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70~120% 및 분석오차 10%이내를 충족시키는 만족한 결과를 도출하였다. 본 연구에서 확립된 diacylhydrazine계 살충제인 methoxyfenozide, chromafenozide 및 tebufenozide의 HPLC-UVD 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 분석법 또한 회수율이 우수하여 확인 및 정량법으로 사용가능한 방법이었다.

색인어 methoxyfenozide, chromafenozide, tebufenozide, 잔류분, HPLC-UVD/MS