

HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 fomesafen의 분석

이수진·황영선·김영학·남미영·홍승범·윤원갑¹·권찬혁²·도정아²·임무혁³·이영득⁴·정명근*

강원대학교 생약자원개발학과, ¹경북해양바이오산업연구원, ²식품의약품안전평가원 화학물질과
³식품의약품안전청 식품기준과, ⁴대구대학교 생명환경학부

(2010년 5월 3일 접수, 2010년 5월 17일 수리)

Determination of Fomesafen Residue in Agricultural Commodities using HPLC-UVD/MS

Su-Jin Lee, Young-Sun Hwang, Young-Hak Kim, Mi-Young Nam, Seung-Beom Hong, Won-Kap Yun¹,
Chan Hyeok Kwon², Jung-A Do², Moo Hyeog Im³, Young Deuk Lee⁴ and Myoung-Gun Choung*

Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea, ¹Gyeongbuk Institute for Marine Bioindustry, Gyeongbuk 767-813, Korea, ²National Institute of Food and Drug Evaluation, Seoul 122-704, Korea, ³Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-754, Korea, ⁴Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

Abstract

Fomesafen is a selective herbicide, and used to control annual and perennial broad-leaf grass on soybean and fruit fields in USA and China, but not introduced in Korea yet. So, MRL (Maximum Residue Level), and analytical method of fomesafen were not establishment in Korea. Therefore, this experiment was conducted to establish a determination method for fomesafen residue in crops using HPLC-UVD/MS. Fomesafen residue was extracted with acetone from representative samples of five raw products which comprised hulled rice, soybean, apple, green pepper, and Chinese cabbage. The extract was diluted with saline water, and dichloromethane partition was followed to recover fomesafen from the aqueous phase. Florisil column chromatography was additionally employed for final clean up of the extract. The fomesafen was quantitated by HPLC with UVD, using a Shiseido CAPCELL-PAK UG C₁₈ column. The crops were fortified with fomesafen at 3 levels per crop. Mean recovery ratio were ranged from 87.5% for a 0.4 ppm in hulled rice to 102.5% for a 0.4 ppm in apple. The coefficients of variation were ranged from 0.6% for a 2.0 ppm in hulled rice to 7.7% for a 0.04 ppm in green pepper. Quantitative limit of fomesafen was 0.04 mg/kg in representative 5 crop samples. A LC/MS with selected-ion monitoring was also provided to confirm the suspected residue. Therefore, this analytical method was reproducible and sensitive enough to determine the residue of fomesafen in agricultural commodities.

Key words fomesafen, HPLC-UVD/MS, residue, agricultural commodities

서 론

현대 농업에 있어 병해충 및 잡초를 방제하기 위한 농약의

사용량이 매년 증가함에 따라 농산물 중 잔류농약에 의한 만성 독성학적 위해 유발 가능성이 지속적으로 제기되어 왔으며, 이에 따라 농산물의 안전성 확보가 커다란 사회적 문제로 대두되고 있다(박 등, 2003).

최근 Free Trade Agreement(FTA) 체결로 인해 국내에서

*연락처 : Tel. +82-33-570-6491, Fax. +82-33-570-6499
E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr

생산된 농산물에 함유된 농약뿐만 아니라, 국내에 수입되는 외국산 농산물에 함유된 농약에 대한 국민적 관심도 고조되고 있는 실정이다. 또한 국내에 허가되어 있지 않거나 분석법이 확립되어 있지 않은 농약의 경우 수입 농산물에 특정 농약 성분이 잔류하고 있어도 수입식품 잔류농약 검사기관에서는 해당 농약성분의 분석법 미비로 인해 검출이 불가능 할 수 있으므로, 국내 미사용 농약이지만 외국에서 사용빈도가 높은 농약에 대해서는 신규 분석체계 확립을 통한 수입식품의 안정성 확보가 범국민적으로 중요한 요인이 될 것이다.

Fomesafen[5-(2-chloro-*a,a,a*-trifluoro-*p*-tolylxy)-*N*-methylsulfonyl-2-nitrobenzamide]은 diphenyl ether 계열의 선택성 제초제로 상품명은 Fomesafen, Soyafen, Fomesafen 2 SL 혹은 Reflex 등이며, protoporphyrinogen oxidase inhibitor(Protox)로 작용하여 콩, 완두, 과수, 담배, 땅콩 등의 일년생 광엽 잡초를 제거하는데 널리 사용되고(Harris 등, 1991; Laganà 등, 2000), 포인세티아(*poinsettia*)와 같은 대극과 잡초에 특별히 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Trezzi 등, 2009). Fomesafen은 잎과 뿌리를 통해 식물체내로 흡수되며, 체관부로의 이동은 매우 제한적이다. 콩 발아에서는 광엽 잡초를 제거할 수 있는 효율적 제초제로 파종 전이나 후에 사용 하며, 빠른 속도로 잎에 흡수되어 잡초의 광합성 계를 파괴하고, 잎을 노랗게 녹여 시들게 한다. 처리 후 4~6시간만 지나면 강우에 의해서도 효과가 감소되지 않고, 만약 뿌리로 흡수 되었을 때에도 잡초를 죽이며, 작물체인 콩에 흡수될 경우 체내에서 빠르게 분해되는 특성을 나타낸다(US/EPA, 2007).

Fomesafen의 물리화학적 특성을 살펴보면 *n*-octanol/water 분배계수(log Pow, pH 1)는 2.9로 중간극성을 나타내며, 산해리상수(pKa)는 2.7(25°C)로 산성이며, 녹는점은 220~221°C 이고, 분자량은 438.76(C₁₅H₁₀ClF₃N₂O₆S)으로 수용성 염류 형태의 무색 결정체이다(Fig. 1). 다양한 유기용매에 잘 녹으며(acetone 300 g, cyclohexane 150 g, dichloromethane 10 g, *n*-hexane 0.5 g, xylene 1.9 g/L), 물에 대한 용해도는 pH에 따라 달라지는데 20°C 조건에서 pH가 2미만일 경우 10 g/L 수준의 용해도를 나타낸다. 토성에 따라 차이는 있으나 63~

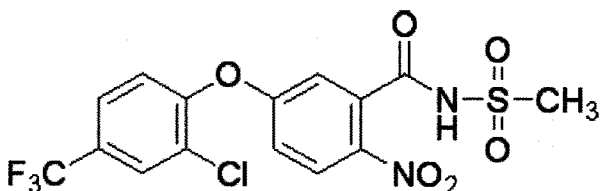


Fig. 1. Chemical structure of fomesafen.

527일로 토양에 축적되는 정도가 크며(US/EPA, 2007), 식물에 대해 제초활성은 우수하지만 고등동물에 대한 독성은 약한 것으로 알려져 있는데, 쥐에서 반수치사량을 나타내는 급성 경구독성은 암컷에서 1,600 mg/kg, 수컷에서는 1,250~2,000 mg/kg을 나타내고, 눈이나 피부 독성의 반수치사량은 1,000 mg/kg 이상이다. 사람의 피부에 노출되면 만발성 피부 포르피린증(PCT, Porphyria Cutanea Tarda)이 가장 흔히 나타나는 증상이다(HSDB, 1998).

한편 fomesafen은 증기압이 0.004 mPa 미만으로 비휘발성의 특성을 나타내며, 분자구조 내에 -NH기를 함유하고 있으므로 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)를 이용한 분석이 적용된 바 있으며(Bolygo 등, 1991), Laganà 등(2000)에 의해 HPLC-MS/MS를 이용한 분석이 보고된 바 있으나, 선행 연구결과들은 분석대상이 지하수 등 물에 대한 농약의 잔류성 및 오염도를 평가하기 위해 수행되어진 결과들이며, 실제 농산물을 대상으로 대상농약의 분석조건 확립 및 회수율 등이 검토된 결과는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내 미사용 농약이지만 중국, 미국 등 외국에서 사용빈도가 높은 fomesafen에 대해 정확성 및 정밀성이 확보된 농산물 적용 가능 신규 분석체계를 확립하여 국내 잔류농약 검사의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

본 연구에 사용된 fomesafen의 분석용 표준품은 순도 98% 이상의 분석용 표준품을 Sigma-Aldrich(USA)로부터 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.

농산물 시료

Fomesafen은 국내 미사용 농약이며, 국내에는 식품 잔류

허용기준이 설정되어 있지 않으므로 본 연구의 분석대상 농산물로 곡류는 현미, 두류는 콩, 채소류는 고추 및 배추, 과일류 중 사과를 대표시료로 선정하였다. 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 fomesafen의 분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1200 series(USA)를 사용하였고, 컬럼은 Shiseido CAPCELL-PAK UG C₁₈(4.6×250mm, 5 μm)을 사용하였고, 기타 분석 조건은 Table 1과 같다. 한편 LC/MS분석은 Agilent 6110 Quardropole LC/MS를 사용하였고, 분석 조건 중 일부는 HPLC 분석과 달리하여 분석을 실시하였으며, 자세한 분석 조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 1. HPLC operating conditions of fomesafen

HPLC system	Agilent 1200 HPLC system
Column	Shiseido CAPCELL-PAK UG C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm, Japan)
Column temp.	35°C
Mobile phase	Deionized water(pH 3.2, adjust in phosphoric acid) / acetonitrile(45/55, v/v)
Flow ratio	1.0 mL/min
Detection	UV 290 nm
Injection vol.	20 μL

Table 2. LC/MS operating conditions of fomesafen

LC/MS system	Agilent 6110 Quadrupole LC/MS
Column	Shiseido CAPCELL-PAK UG C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm, Japan)
Column temp.	35°C
Mobile phase	10 mM ammonium acetate/acetonitrile (45/55, v/v)
Flow rate	0.6 mL/min
Sample size	5 μL
Ionization	ESI negative-ion mode
Gas temp.	350°C
Drying gas	N ₂ , 12.0 mL/min
Capillary voltage	4.0 kV
Mass range(m/z)	200~600

기기상의 정량한계 측정

Fomesafen 표준용액 0.05~0.5 mg/kg을 20 μL씩 HPLC에 주입하여 크로마토그램의 signal/noise의 비를 구하여 기기상의 정량한계를 계산하였다.

분석기기의 재현성(Reproducibility) 검증

Fomesafen 표준용액의 농도를 1 mg/kg로 조절하고 HPLC에 10번 주입하여 크로마토그램 상의 retention time(Rt.) 및 peak area의 변이를 비교 검토하여 분석기기의 재현성을 평가하였다.

표준검량선 작성

Fomesafen의 농도별 표준용액은 stock solution을 0.1~20 mg/L의 농도가 되도록 희석하고, 20 μL를 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

분배용매별 분배효율 검증

Acetone 150 mL에 2 mg/L 농도의 fomesafen 표준용액 1 mL을 첨가하고 포화식염수 50 mL와 증류수 450 mL를 첨가한 뒤 분액여두에 옮겨 각 분배용매(*n*-hexane, ethyl ether, dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 및 dichloromethane)로 추출하였다. 각 분배 추출액을 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하였고, 40°C 이하에서 감압 농축하였다. 농축 잔류물은 증류수(인산으로 pH를 3.2로 조절) : acetonitrile(45/55, v/v) 10 mL로 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 우수한 분배용매로 결정된 dichloromethane 50 mL (× 2회)로 분배된 추출액을 무수 sodium sulfate 20 g에 통과시켜 수분을 제거하고 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 증류수(인산으로 pH를 3.2로 조절) : acetonitrile (45/55, v/v) 10 mL로 재용해하여 HPLC로 분석하였고, *n*-hexane/acetonitrile 분배 회수율 회수율을 계산하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피 정제 조건의 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 dichloromethane 50 mL를 가하여 상단에 소량의 dichloromethane이 남을 정도로 유출시켜 활성화시킨 후 methanol/dichloromethane 혼합용액 (5/95, v/v)에 용해된 2 mg/L 농도의 표준용액 10 mL를 가한 후 약 3 mL/min의 유속으로 유출시켰다. 충전제 표면이 노출되기 직전 methanol/dichloromethane 혼합용액 (5/95, v/v) 100 mL를 가하여 pre-washing 후 dichloromethane/n-hexane 혼합용액, dichloromethane 및 dichloromethane/methanol 혼합용액의 조성별로 각각 50 mL씩 3회 용리시켰으며, 각 혼합용액의 조성별 용리액을 농축시킨 후 증류수(인산으로 pH를 3.2로 조절) : acetonitrile(45/55, v/v) 10 mL로 재정용 하였다. 이 용액 20 µL를 HPLC로 분석하여 용리액의 조성별 fomesafen의 회수율을 검토하였다.

분석법의 정량한계 설정

분석법의 정량한계는 HPLC를 이용하여 표준용액을 주입 분석 하였을 때 산출된 기기상의 정량한계에 해당하는 농도를 실제 시료에 처리하고 희석배율을 고려하여 아래의 공식에 의하여 계산하였다.

$$LOQ (mg/kg) = \frac{[기기\ 정량한계 \times HPLC\ 주입전\ 최종시료용액량(mL)]}{[HPLC\ 주입량(\mu L) \times 시료량 (g)]}$$

대표작물 중 fomesafen 회수율의 측정

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

결과 및 고찰

HPLC 분석조건 확립

Fomesafen의 최적 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 메탄올에 용해한 2 mg/L의 표준품을 on-line HPLC/DAD를 이용하여 200~400 nm 범위에서 최대흡수파장 (λ_{max})을 검

토하였다. 그 결과 210 nm 이하에서 가장 높은 흡광력을 나타내었고, 다음으로 흡광력이 발생하는 파장은 292 nm 부근으로 조사되었다(Fig 2). 210 nm 이하 파장 영역에서는 용매에 의한 노이즈 현상이 심할 것으로 판단되므로, 210 nm 다음으로 흡광력이 발생하는 파장영역인 290 nm로 검출파장을 설정하였다.

분석용 HPLC 칼럼은 C₁₈계열의 Shiseido CAPCELL-PAK UG C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 µm)을 이용하였고, 이동상 중 유기용매인 acetonitrile의 농도를 달리하여 머무름 시간 및 peak의 이론단수 등을 검토한 결과 증류수(인산으로 pH 3.2로 조절)/acetonitrile (45/55, v/v)의 isocratic 조건이 머무름 시간과 분리도 양상에서 가장 적합한 양상을 나타내었으며(Fig 3), 머무름시간 8.5분대에 fomesafen의 분리 용출이 가능한 것을 확인하였다.

기기상의 정량한계 및 분석 재현성 평가

검출한계는 기기분석 시 크로마토그램에서 peak로 검출할 수 있는 한계농도를 의미하는 것으로 크로마토그램 상에서 S/N(signal/noise)비가 3이상을 나타내는 성분의 농도를 의

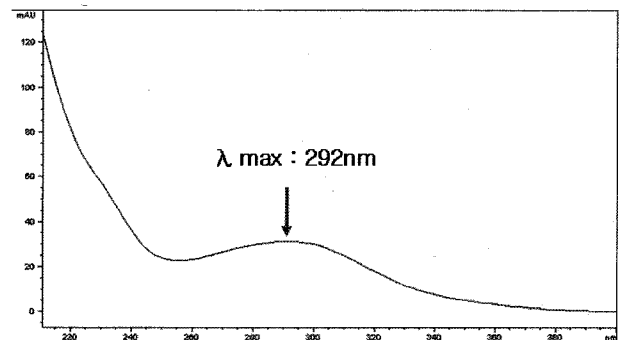


Fig. 2. UV absorption spectrum of fomesafen in on-line HPLC/DAD.

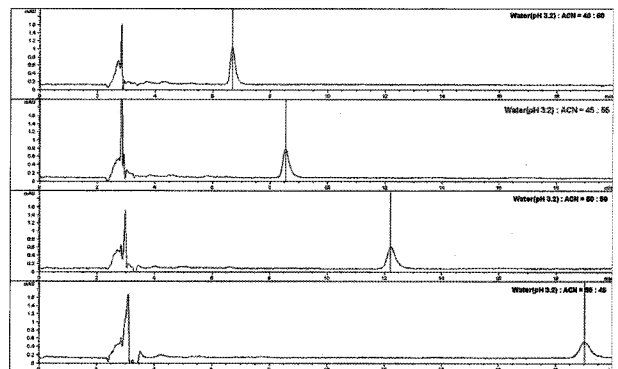


Fig. 3. Chromatographic behavior of fomesafen in different HPLC mobile phase.

미한다. 한편 정량한계는 크로마토그램의 해석 시 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계농도로써, 크로마토그램 상에서 검출된 peak의 S/N의 비가 10 이상(LOD의 3배 이상)을 나타내는 성분의 농도를 의미한다(Fong 등, 1999; Miller, 2005).

Table 1의 HPLC 조건에서 다양한 농도의 fomesafen 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과 기기상의 정량한계(S/N \geq 10)는 2 ng 수준이었다. 한편 분석 기기의 안정성 평가를 위해 재현성 평가를 실시한 결과 1 mg/kg 농도의 표준품을 10번 반복 주입 분석하여 retention time(Rt.) 및 peak area의 변이계수(CV, %)를 조사하였고, 조사된 peak의 측정변수 모두 최대 1.27% 미만으로 극히 높은 분석 재현성을 나타내어 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 3).

검량선의 직선성

Fomesafen의 농도별 표준용액(0.1~20 mg/L) 20 μ L를 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 $y=19.225x + 1.194$ ($R^2=0.999^{**}$)로 직선성이 우수하였다(Fig 4).

분배용매별 분배효율 검증

농산물 시료로부터 fomesafen 성분을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용하였다. Acetone은 US/FDA법이나 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 fomesafen 성분 외에 추출 혼입된 농산물 유래 불순물을 세척하기 위한 조정제 분배법으로 *n*-hexane, 중화인민공화국의 fomesafen 분석 표준시행령(2003)에서 사용된 ethyl ether, dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 및 dichloromethane을 분배용매로 이용하여 최적의 분배법을 확립하고자 하였다. 분석대상 농약인 fomesafen이 비교적 중간극성을 나타내는 점을 감안하여 수용성 유기용매 추출액을 포화식염수/증류수로 희석한 후 직접 비극성 용매인 *n*-hexane이나 ethyl ether, dichloromethane/*n*-hexane 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 fomesafen 성분의 회수율은 0%로 전혀 회수되지 않았으며, 중화인민공화국의 fomesafen 분석 표준시행령(2003)에 제시된 ethyl ether 용액 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 약 37% 수준, dichloromethane/*n*-hexane 혼합액

Table 3. Reproducibility of HPLC peak area and retention time (Rt.) for fomesafen

Rep.	Rt.	Peak area
1	8.55	177.90
2	8.47	175.50
3	8.56	179.30
4	8.54	176.50
5	8.51	174.20
6	8.47	173.50
7	8.51	179.70
8	8.44	178.60
9	8.42	178.40
10	8.41	174.70
Min.	8.41	173.50
Max.	8.56	179.70
Mean	8.49	176.83
SD	0.06	2.25
CV (%)	0.65	1.27

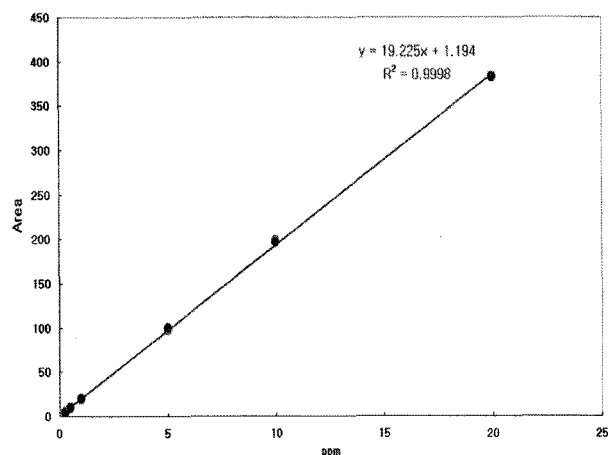


Fig. 4. Calibration curve of fomesafen standard solution using HPLC(0.1~20 ppm, triplicate analysis).

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

Compound	Recovery ratio ¹⁾ (%)			
	Partition I ²⁾	Partition II	Partition III	Partition IV
Fomesafen	0	37 \pm 1	75 \pm 2	96 \pm 1

¹⁾Mean values of triplicate samples

²⁾Partition mixture : 150 mL acetone + 50 mL saturated NaCl + 450 mL distilled water.

I, 100 mL *n*-hexane, II, 50 mL ethyl ether (x 2 times), III, 100 mL dichloromethane/*n*-hexane (80/20, v/v), IV, 50 mL dichloromethane (x 2 times)

(80/20, v/v) 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 75% 수준, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 약 96%로 검토된 용매계 중 가장 우수한 양상을 나타내어 분획용매 IV를 액-액 분배조건에 의한 fomesafen 성분의 분배용매로 선정하였다.

Dichloromethane을 이용한 액-액 분배과정에 의하여 시료 중에 포함된 상당부분의 극성 방해물질은 제거되었으리라 판단되지만, dichloromethane 분배 시 *n*-hexane 혹은 dichloromethane/*n*-hexane 혼합액에 비하여 불순물이 많이 추출될 것이기 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 함유 되어 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 fomesafen의 회수율이 97% 이상을 나타내었고, 3회의 분배를 수행하여도 회수율이 크게 향상되지 않는 양상을 나타내었으므로, 유지 등 비극성 간섭물질의 제거를 위한 *n*-hexane/

acetonitrile 분배법은 분획조건으로 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 흡착 크로마토그래피 정제조건 검토

농산물에 적용한 fomesafen 분석 시 상기 액-액 분배과정을 통해 일부 불순물이 제거되었을 것으로 판단되나, 농산물에 따라 시료로부터 유래한 다양한 기타 불순물이 존재할 것이므로 추가정제가 필요할 것으로 판단되어 흡착 크로마토그래피에 의한 추가 정제법을 검토하였다. 흡착 크로마토그래피는 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 방법으로, 흡착제로는 silica gel, Florisil 및 alumina가 많이 사용되어진다. 이 중 Florisil은 색소와 지방의 제거가 뛰어나 미국의 FDA (1999)나 AOAC(2000) 등에서 가장 많이 사용하는 방법이다. 본 연구에서도 fomesafen의 극성을 고려하여 Florisil을 흡착제로 선정 하였으며, 용매의 극성 조절을 위해 dichloromethane/*n*-hexane 혼합용액, dichloromethane, dichloromethane/methanol 혼합용액 등의 용매체계를 사용하여 최적의 정제방법을 검토하였다(Table 6).

Florisil 흡착크로마토그래피용 용매의 다양한 극성 조절을 이용하여 fomesafen의 회수율을 검토한 결과 dichloromethane/methanol(95/5, v/v) 용매 100 mL로 pre-washing 한 후, dichloromethane/methanol(87/13, v/v)의 혼합용매 150 mL로 용출할 경우 fomesafen 성분이 96%의 회수율을 나타내는 것을 확인할 수 있어 검토된 용매체계 중 가장 우수한 양상을 나타내어 Florisil 흡착 크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거법으로 확립하였다.

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

Compound	Recovery ratio (%) ¹⁾	
	Partition I ²⁾	Partition II
Fomesafen	97	97

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 of fomesafen on Florisil dry column

Elution solvent (v/v)	Recovery ratio (%) ¹⁾			Total
	0 - 50 mL	51 - 100 mL	101 - 150 mL	
50 : 50 (CH ₂ Cl ₂ : <i>n</i> -hexane)	0	0	0	0
100 (CH ₂ Cl ₂)	0	0	0	0
95 : 5 (CH ₂ Cl ₂ : MeOH)	0	0	0	0
90 : 10 ²⁾ (CH ₂ Cl ₂ : MeOH)	16	41	27	84
87 : 13 ²⁾ (CH ₂ Cl ₂ : MeOH)	36	54	6	96

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

²⁾Pre-washed 100 mL of dichloromethane/methanol(95/5, v/v).

분석정량한계

분석정량한계는 정량한계, 시료량 및 분석조각 중의 희석배율 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 실험에 이용된 fomesafen의 경우 식품별 MRL이 설정되어 있지 않지만, 각 대표 농산물별 분석정량한계는 모두 0.04 mg/kg으로 계산되어 잔류분석법 기준에 적합하였다.

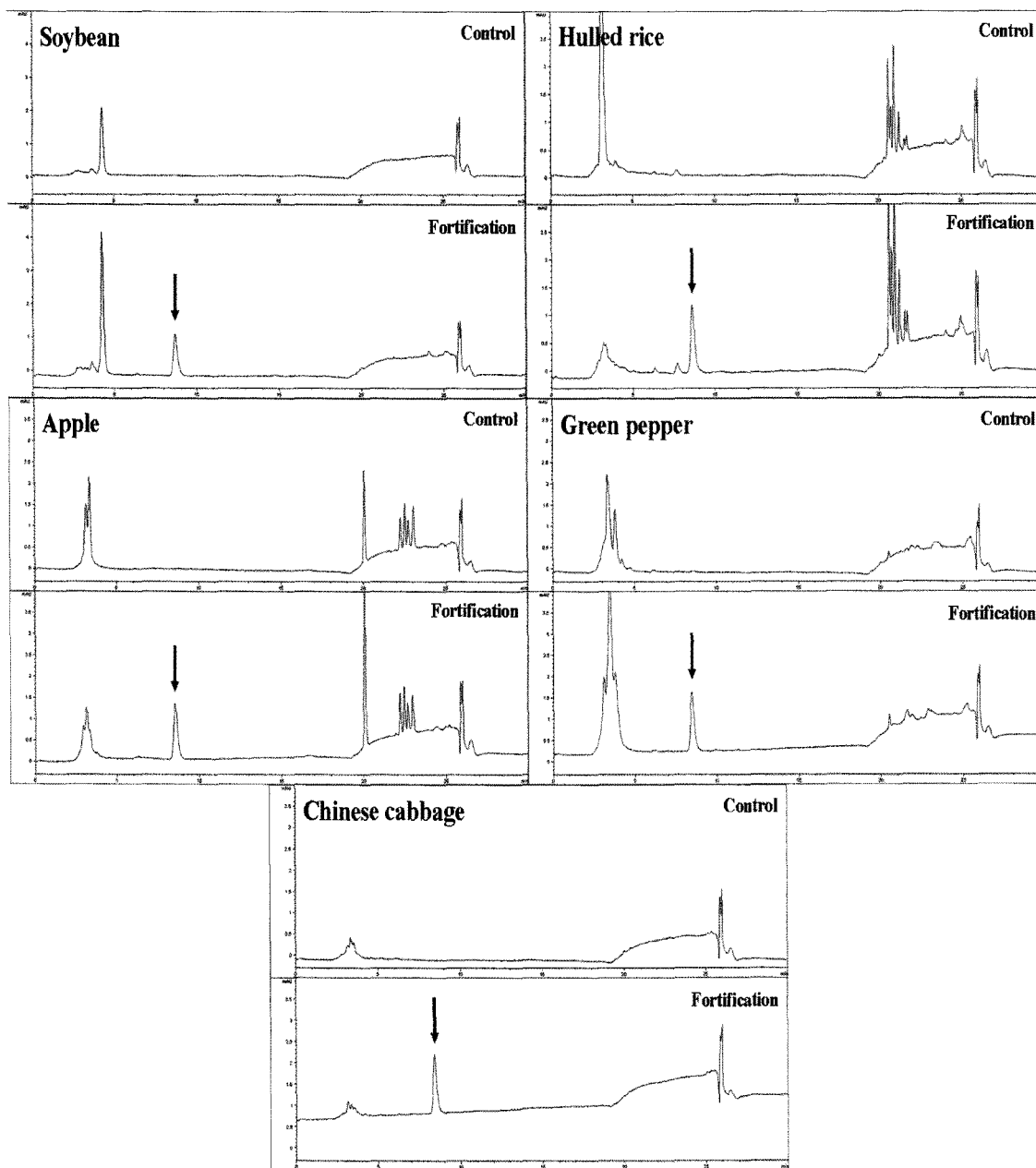


Fig. 5. HPLC chromatograms of fomesafen in different agricultural commodity extracts(fortification concentration: ten-fold of LOQ).

농산물 적용 시 fomesafen의 회수율

마쇄한 각각의 농산물 무처리 시료에 fomesafen 표준용액을 LOQ, LOQ의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가하고, 상기 검토된 전체적 분석방법으로 대표 농산물별 3회 반복하여 분석한 결과(Fig. 5), LOQ수준에서는 88.4~99.0%, LOQ 10배 수준에서는 87.5~102.5%, LOQ 50배 수준에서는 87.5~99.6%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성도 양호하여(CV < 7.7%) 처리수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70~120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하였다(Table 7). 따라서 이상 결과에서 확립된 fomesafen

분석법은 국내·외 농산물의 잔류 농약분석에 충분히 적용이 가능함을 알 수 있다.

LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

한편, 개발된 분석법의 신뢰성을 증대하기 위하여 LC/MS에 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). Fomesafen의 이온화를 돕기 위하여 HPLC 분석에 이용된 이동상 용매 중 증류수에 10

Table 7. Recovery ratio of fomesafen in different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%) ¹⁾	CV (%)	LOQ (mg/kg)
Soybean	0.04	94.6 ± 5.0	5.3	0.04
	0.4	95.2 ± 1.3	1.4	
	2.0	96.7 ± 3.8	4.0	
Hulled rice	0.04	88.4 ± 4.2	4.7	0.04
	0.4	87.5 ± 3.1	3.5	
	2.0	87.5 ± 0.5	0.6	
Apple	0.04	95.2 ± 1.2	1.3	0.04
	0.4	102.5 ± 0.8	0.8	
	2.0	95.5 ± 4.2	4.4	
Green pepper	0.04	95.9 ± 7.4	7.7	0.04
	0.4	95.2 ± 2.7	2.8	
	2.0	99.6 ± 1.5	1.5	
Chinese cabbage	0.04	99.0 ± 2.0	2.0	0.04
	0.4	98.3 ± 1.3	1.4	
	2.0	97.8 ± 0.8	0.8	

¹⁾Mean values of triplicate samples with standard deviations.

mM ammonium acetate를 첨가하여 분석을 실시하였고, ESI negative-ion mode에서 높은 감도를 나타내었으며, total-ion chromatogram으로 Fig. 6 및 7과 같은 mass spectrum을 얻을 수 있었다. Fig. 8은 본 실험에 사용된 농산물 시료 중 현미를 대상으로 fomesafen의 잔류분을 재확인한 selected-ion monitoring(SIM) chromatogram이다. 본 실험에서 사용된 모든 농산물의 무처리 시료에서는 대상 농약성분의 peak가 전혀 관찰되지 않았으며, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 정확하게 fomesafen 잔류분만을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC-UVD를 이용한 정량법과 더불어 fomesafen의 잔류분의 추가적 정성분석법으로도 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

결론

HPLC-UVD/MS 분석법을 이용하여 농산물 시료에서 diphenyl ether계 선택성 제초제인 fomesafen의 잔류 분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 acetone을 가하여 추출된 fomesafen의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 Florisil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였

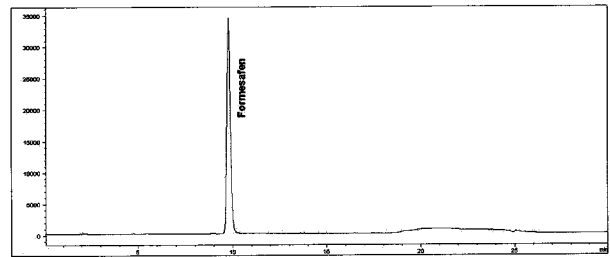


Fig. 6. Total-ion chromatogram(TIC) of fomesafen in LC/MS.

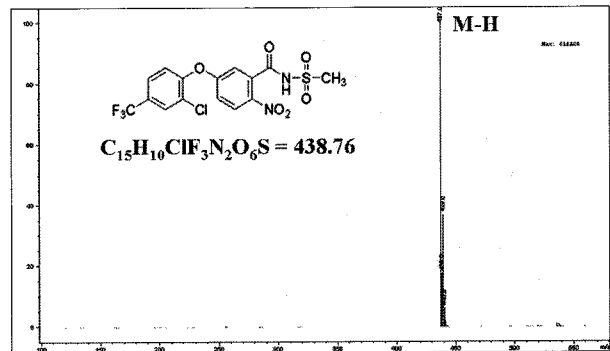


Fig. 7. Typical mass spectrum of fomesafen.

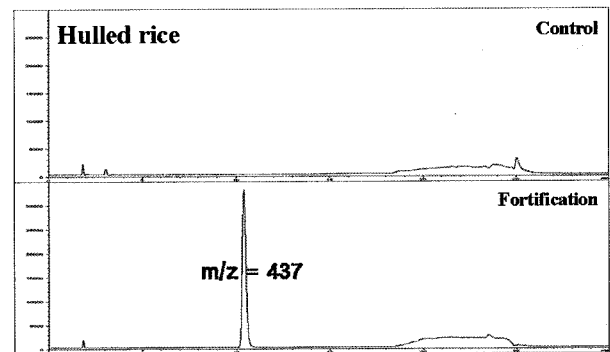


Fig. 8. SIM chromatogram of fomesafen in hulled rice (fortification concentration: ten-fold of LOQ).

다. C₁₈ 컬럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 현미, 콩, 사과, 배추 및 고추를 포함한 5종의 대표 농산물 중 fomesafen의 정량한계(LOQ)는 0.04 mg/kg이었다. 5종의 대표 농산물에 대한 회수율은 87.5~102.5%였으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계없이 10%미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석 기준이내를 만족하였다. 본 연구에서 확립된 diphenyl ether계 제초제인 fomesafen의 잔류 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인 과정의 결과를 종합해 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.
- Bolygo, E., and N. C. Atreya (1991) Solid-phase extraction for multi-residue analysis of some triazole pyrimidine pesticides in water. *Fresenius's Journal of Analytical Chemistry* 339(6): 423~430.
- 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.
- Harris, J. R., B. J. Gossett, T R. Murphy, and J. E. Toler (1991) Response of broad leaf weeds and soybeans to the diphenyl ether herbicides. *J. Prod. Agric.* 4:407~411.
- Hazardous Substances Data Bank (1998) TOXNET profile from Hazardous Substances Database, No. 6660, Fomesafen.
- 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.
- Laganà, A., G. Fago, A. Marino, V. M. Penazzi (2000) Liquid chromatography mass spectrometry tandem for multiresidue determination of selected post-emergence herbicides after soil column extraction. *Analytica Chimica Acta* 415:41~56.
- Lee, J., H. Park, Y. Keum, C. Kwon, Y. Lee, and J. Kim (2008) Dissipation pattern of Boscalid in cucumber under green house condition. *Korean Journal of Pesticide Science* 12: 67~73.
- Miller, J. M. (2005) *Chromatography : concepts and contrasts* (2nd), Wiley Interscience, p. 286~287, USA.
- Standardization administration of the people's republic of China (2003) GB/T 5009. 130.
- Trezza, M. M., R. A. Vidal, N. D. Kruse, R. P. Silva, M. S. Gustmann, and E. Franchin (2009) Fomesafen absorption site as a mechanism of resistance in an *Euphorbia heterophylla* biotype resistant to PROTOX inhibitors. *Planta Daninha* 27(1):139~148.
- United States Environmental Protection Agency (2007) Registration review ecological risk assessment problem formulation for fomesafen. Washington D.C., 20460.
- US FDA (1999) 'Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multi residue Methods (3rd ed.)', US Food and Drug Administration, USA.
- 박청진, 이영득 (2003) 살균제 boscalod의 포도와 딸기 중 잔류특성. *생명과학연구* 2(2):9~16.
- 식품의약품안전청 (2009) 식품공전.
- 이영득 (2009) 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서, 식품의약품 안전청.

HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 fomesafen의 분석

이수진 · 황영선 · 김영학 · 남미영 · 홍승범 · 윤원갑¹ · 권찬혁² · 도정아² · 임무혁³ · 이영득⁴ · 정명근*강원대학교 생자자원개발학과, ¹경북해양바이오산업연구원, ²식품의약품안전평가원 화학물질과³식품의약품안전청 식품기준과, ⁴대구대학교 생명환경학부

요 약 광엽 제초제로 사용되는 fomesafen은 미국 및 중국 등에서 두류 및 과수의 광엽 제초제로 사용되고 있으나, 국내에서는 미사용 농약이며, 잔류허용기준 및 분석법이 확립되어 있지 않다. 최근 FTA 등으로 외국에서 수입되는 농산물 중 fomesafen에 대한 안전성 검토가 필요하나, 국내 식품공전 상에는 fomesafen의 분석법이 확립되어 있지 않다. 본 연구는 HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 중 fomesafen의 잔류 분석법을 확립하고자 하였으며, 대상 농산물은 현미, 콩, 사과, 배추 및 고추를 선정하였다. 농산물 시료에 acetone을 가하여 추출된 fomesafen 성분을 dichloromethane 액-액 분배법과 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 HPLC-UVD/MS 분석대상 시료로 하였다. Fomesafen의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건을 확립하였으며, 정량한계(LOQ)는 0.04 mg/kg 이었다. 각 대표 농산물에 대해 정량한계, 정량한계의 10 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과 모든 처리농도에서 87.5~102.5% 수준을 나타내었으며, 반복 간 변이계수(CV)는 최대 7.7%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70~120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 만족한 결과를 도출하였으며, LC/MS SIM을 이용하여 실제 농산물 시료에 적용하여 재확인 하였다. 이상의 결과로 신규 fomesafen의 HPLC-UVD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용가능할 것이다.

색인어 fomesafen, HPLC-UVD/MS, 잔류분, 농산물