

## HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 ametryn의 분석

이수진 · 김영학 · 송이슬 · 정명근\*

강원대학교 생약자원개발학과

(2011년 5월 26일 접수, 2011년 6월 9일 수리)

### Determination of Ametryn Residue in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS

Su-Jin Lee, Young-Hak Kim, Lee-Seul Song and Myoung-Gun Choung\*

Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea

#### Abstract

Ametryn is used in USA, China, and Japan, but not introduced in Korea yet. So, MRL (Maximum Residue Level), and analytical method of ametryn were not establishment in Korea. Therefore, this experiment was conducted to establish a determination method for ametryn residue in crops using HPLC-UVD/MS. Ametryn 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 ametryn from the aqueous phase. Florisil column chromatography was additionally employed for final clean up of the extract. The ametryn was quantitated by HPLC with UVD, using a Tosoh ODS 120T (4.6 × 250 mm) column. The crops were fortified with ametryn at 2 levels per crop. Mean recovery ratio were ranged from 83.7% for a 0.2 mg/kg in soybean to 91.1% for a 1.0 mg/kg in hulled rice. The coefficients of variation were ranged from 1.2% for a 1.0 mg/kg in hulled rice to 3.6% for a 1.0 mg/kg in soybean. Quantitative limit of ametryn was 0.02 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 ametryne in agricultural commodities.

**Key words** Amaetryn, HPLC-UVD/MS, Crop analysis, Residue

#### 서 론

농약은 현대 농업에 있어 필수불가결한 농업자재로서 농산물의 생산성 제고 및 품질 향상에 크게 기여하여 오늘날 풍요로운 먹을거리의 공급이 가능하도록 하였을 뿐 아니라, 농산물의 생력화를 통해 노동력과 농업생산비 절감에 중요한 역할을 함으로써 농업인의 삶 향상에 큰 공헌을 하였다. 이러한 장점에도 불구하고 농약은 생물을 살멸하려는 화합물로서

정도의 차이는 있으나 독성을 가지고 있으므로 사용하는 농업인 또는 제조공정에 종사하는 사람의 건강을 해칠 우려가 있으며 적절하게 사용하지 않을 경우 작물의 약해는 물론 환경오염을 유발시킬 가능성이 있다. 또한 농산물에 일정량 이상 잔류될 경우 건강에 심각한 영향을 초래하므로 농산물을 포함한 식품 중 잔류농약 문제는 사회적으로 중요한 이슈가 되어왔다(장 등, 2010).

최근 Free Trade Agreement(FTA) 체결로 인해 국내에서 생산된 농산물에 함유된 농약뿐만 아니라, 국내에 수입되는 외국산 농산물에 함유된 농약에 대한 국민적 관심도 고조되

\*연락처 : Tel. +82-33-540-3321, Fax. +82-33-540-3329

E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr

고 있는 실정이다. 또한 국내에 등록되어 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 미등록 농약이지만 외국에서 사용빈도가 높은 농약에 대해서는 신규 분석체계 확립을 통한 수입식품의 안정성 확보가 범국민적으로 중요한 요인이 될 것이다(이 등, 2010).

본 연구에서 잔류분석법을 확립하고자 한 대상 성분은 triazine계 제초제인 ametryn이며 국내 미등록 농약이지만 미국, 일본, 중국 등에서는 광엽 제초제로 사용되고 있는 농약이다. Triazine계 제초제는 1950년대부터 광엽잡초의 방제에 주로 사용되어왔고, 그 중 atrazine은 옥수수, 수수, 사탕수수의 재배 전에 보편적으로 사용되는 반면 ametryn, simazine 및 metribuzin 등은 사탕수수, 과일, 감자, 바나나, 포도, 오렌지, 파인애플 등 폭넓은 작물의 광엽잡초의 방제에 사용되고 있으며, 미국의 경우 옥수수 등을 포함한 작물의 MRL은 0.25~0.5 mg/kg 수준이며, 일본의 경우 옥수수, 사과 등 작물의 MRL은 0.05~0.4 mg/kg 수준으로 보고되고 있다(Dale 등, 2010).

Ametryn[2-(ethylamino)-4-(isopropylamino)-6-(methylthio)-s-triazine]의 화학식은  $C_9H_{17}N_5S$ 로 분자량은 227.33이며, 광합성 억제에 의해 살초작용이 나타난다. 흰색의 분말로 녹는점은 84~85°C, 끓는점은 345°C, 밀도는 20°C에서 1.19 g/cm<sup>3</sup>, 증기압은 25°C에서  $2.74 \times 10^{-6}$  mm Hg, 분배계수(log Pow)는 2.39, 물에 대한 용해도는 20°C에서 185 mg/100 mL이며, 유기용매 중 dichloromethane에는 61.4 g/100 mL, acetone에는 56.9 g/100 mL, methanol에는 51.6 g/100 mL, toluene에는 46.0 g/100 mL, n-octanol에는 24.2 g/100 mL, n-hexane에는 1.4 g/100 mL를 나타내는 중간극성의 화합물이다(Lowell, 1979).

물고기에 대한 반수치사농도는 3.2 mg/kg, 청둥오리와 메추라기 같은 포유류가 아닌 동물들에 대한 반수치사량은 23,000 mg/kg 및 30,000 mg/kg으로 포유류나 물고기에 대하여 저독성이나 갑각류나 연체동물에 대하여는 높은 독성을 나타낸다(Farré, 2002). Rat에 경구투여 시 반수치사량은 1,100 mg/kg, 피부에 대한 반수치사량은 3,170 mg/kg 이상이며, rabbit의 피부에 대한 자극은 미약하며, guinea pig에 대한 감작성 시험에서는 무반응으로 조사된바 있다(IUCLID, 2000).

한편 ametryn의 분석은 분자구조 내에 -NH기를 함유하고 있으므로 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석된 바 있고(Lucio 등, 2004; Glauca, 2000A

& 2000B), Tadeo 등(1996) 및 John 등(1996)은 GC(Gas Chromatography)를 이용하여 ametryn을 분석한바 있으나, 선행 연구결과들은 분석대상이 토양 혹은 지하수에 대한 잔류성 및 오염도를 평가하기 위해 이루어진 실험의 결과들이며, 실제 농산물을 대상으로 한 분석조건 확립 및 회수율 등이 검토된 결과는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내 미등록 농약이지만 미국, 중국, 일본 등 국외에서 광엽잡초의 제초제로 사용되는 ametryn에 대해 정확성 및 정밀성이 확보된 농산물 적용 가능한 신규 분석체계를 확립하여 국내 수입식품 검역 및 재배 작물의 잔류농약 검사의 기초 자료를 제공하고자 본 연구를 수행 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기구

Ametryn의 분석용 표준품은 순도 98% 이상의 분석용 표준품을 Sigma-Aldrich(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 표준품의 stock solution은 methanol에 500 mg/L의 농도로 조제하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 필요시 마다 stock solution을 소정의 농도로 희석하여 사용하였다. Florisil<sup>®</sup>(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. 감압농축기는 Eyela NE-1000SW(Japan)를 사용하였고, 농산물 시료는 호모제나이저(IKA, Ultra-Turrax T-25, USA)를 이용하여 마쇄, 균질화 및 추출하였다.

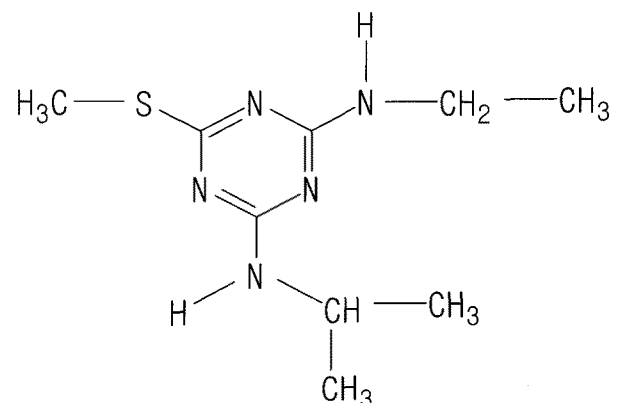


Fig. 1. Chemical structure of ametryn.

## 농산물 시료

본 연구의 분석대상 농산물로 곡류는 현미, 두류는 콩, 채소류는 고추 및 배추, 과일류 중 사과를 대표작물로 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

Ametryn의 기기분석은 분석의 재현성을 극대화하기 위한 조건으로 수행하였다. 즉, Table 1에 나타낸 바와 같이 HPLC는 Agilent 1200 series(USA)를 사용하였고, 칼럼은 Tosoh ODS 120T(4.6 × 250 mm)을 사용하였으며, 기타 분석조건은 Table 1과 같다. 한편 LC/MS분석은 Agilent 6110 Quadruple LC/MS를 사용하였고, 분석 조건 중 일부는 HPLC 분석과 달리하여 분석을 실시하였으며, 자세한 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

**Table 1.** HPLC operating conditions of ametryn

HPLC system	Agilent 1200 HPLC system
Column	Tosoh ODS 120T (4.6 × 250 mm)
Column temp.	35°C
Mobile phase	60% acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Detection	UV 220 nm
Injection vol.	20 µL

**Table 2.** LC/MS operating conditions of ametryn

LC/MS system	Agilent 6110 Quadruple LC/MS
Column	Tosoh ODS 120T (4.6 × 250 mm)
Column temp.	35°C
Mobile phase	65% acetonitrile contained 0.1% formate
Flow rate	1.0 mL/min
Sample size	10 µL
Ionization	ESI positive-ion mode
Gas temp.	350°C
Drying gas	N <sub>2</sub> , 12.0 mL/min
Capillary voltage	4.0 kV
Mass range (m/z)	200~600

## 분석기기의 재현성 검정

Ametryn 표준용액의 농도를 0.5 mg/kg로 조절하고 HPLC에 10번 주입하여 크로마토그램 상의 retention time(*t<sub>r</sub>*) 및 peak area의 변이를 비교 검토하여 분석기기의 재현성을 평가하였다.

## 분배용매별 분배효율 검증

Acetone 150 mL에 ametryn 표준용액 1 mL를 첨가하고, 포화식염수 50 mL와 증류수 450 mL를 첨가한 뒤 분액여두에 옮겨 각 분배용매로 *n*-hexane 100 mL, dichloromethane/*n*-hexane(20/80, v/v) 100 mL, dichloromethane/*n*-hexane(80/20, v/v) 100 mL, dichloromethane 50 mL(× 2회)로 처리를 달리하여 각각 추출하였다. 각 분배 추출액을 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하였고, 40°C 이하에서 감압농축하였다. 농축된 잔류물은 10 mL 60% acetonitrile에 재용해하여 HPLC로 분석하였으며, 분배용매별 3반복으로 실험을 수행하여 회수율을 계산하였다.

한편 현미 및 콩과 같이 비극성인 지용성 물질이 다량 함유되어 있는 농산물에서는 비극성 유지성분의 제거를 위해 추가적 액-액 분배과정의 효율을 검토하였으며, 분배용매별 효율 검증에서 가장 우수한 분배용매로 결정된 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 1~3회 분배 추출한 후 40°C 이하에서 감압농축 하였으며, 농축된 잔류물은 10 mL 60% acetonitrile에 재용해하여 HPLC로 분석하였고, *n*-hexane/acetonitrile 분배 회수율을 계산하였다.

## Florisol 흡착 크로마토그래피 정제 조건의 검토

130°C에서 하룻밤 동안 가열하여 탈수시킨 활성 florisol 10 g을 내경 1.5 cm, 길이 40 cm의 유리 칼럼에 건식 충전한 후, 3 g의 무수 sodium sulfate를 위에 첨가하였다(이하 florisol 칼럼). 충전된 florisol 칼럼에 *n*-hexane 50 mL를 가하여 상단에 소량의 *n*-hexane이 남을 정도로 유출시켜 활성화시킨 후 dichloromethane에 용해된 표준용액 10 mL를 가하고, *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액의 조성별로 각각 50 mL씩 3회 용리시켰으며, 각 조성별 혼합용액의 용리액을 농축시킨 후 60% acetonitrile 10 mL로 재정용 하였다. 이 용액 20 µL를 HPLC로 분석하여 용리액의 조성별 ametryn 회수율을 검토하였다.

**표준검량선 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)**

Ametryn의 농도별 표준용액은 stock solution을 0.05~1 mg/L의 농도가 되도록 각각 희석하고, 20 µL를 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다. 분석법의 정량한계는 무농약 농산물 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 후, 분석기기의 정량한계와 시료량 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상, 아래의 식에 의하여 산출하였다.

$$LOQ(mg/kg) = [기기\ 정량한계(ng)/주입량(\mu L)] \times [시료용액(mL)]/시료량(g)$$

**분석법의 대표 농산물에 대한 ametryn의 회수율 검정**

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

**결과 및 고찰**

**HPLC 분석조건 확립**

Ametryn의 최적 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 메탄올에 용해한 표준품을 이용하여 최대흡수파장(λ<sub>max</sub>)을 검토하였다. 그 결과 222 nm 부근에서 가장 높은 흡광력을 나타내었고, 다음으로 흡광력이 발생하는 파장은 264 nm 부근으로 조사되었다(Fig. 2). 따라서 가장 높은 흡광력이 발생하는 파장영역인 220 nm를 ametryn의 검출파장으로 설정하였다.

분석용 HPLC 칼럼은 C<sub>18</sub> 계열의 Tosoh ODS 120T(4.6 × 250 mm)를 이용하였고, 이동상으로 여러 종류의 용매계를 검토한 결과 60% acetonitrile의 조건에서 양호한 분리 양

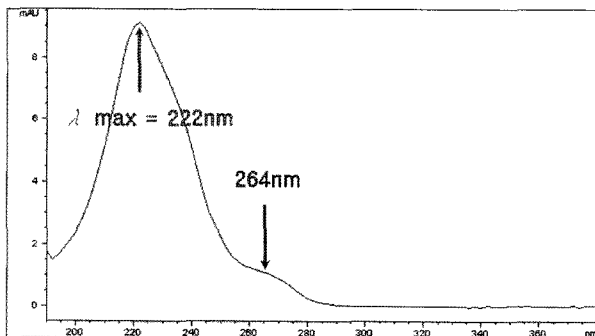


Fig. 2. UV absorption spectrum of ametryn.

상을 나타내었다(Fig. 3).

**분석기기의 검출한계, 정량한계 설정 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 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 ametryn 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과 정량한계(S/N≥10)는 0.05 mg/kg수준이었다. 한편 분석 기기의 안정성 평가를 위해 분석재현성 평가를 실시한 결과 0.5 mg/kg 농도의 표준품을 10회 반복 주입 분석하여 머무름시간(t<sub>r</sub>), 피크면적(peak area) 및 높이(peak height)의 변이계수(CV, %)를 조사하였고, 조사된 피크의 측정변수 모두 최대 1.6% 미만으로 극히 높은 분석 재현성을 나타내어, 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고, 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 3).

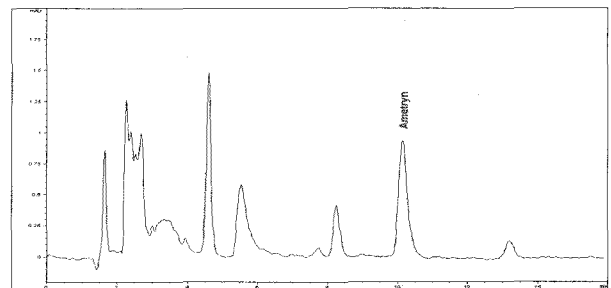


Fig. 3. Chromatogram of ametryn standard solution (0.05 mg/L in methanol).

Table 3. Reproducibility of HPLC peak area and retention time (t<sub>r</sub>) for ametryn

Parameter	t <sub>r</sub>	Area	Height
Min.	10.35	166.90	9.40
Max.	10.63	172.20	9.80
Mean	10.43	170.74	9.67
SD	0.1	1.5	0.2
CV (%)	1.0	0.9	1.6

**검량선의 직선성**

Ametryn의 농도별 표준용액(0.05~2 mg/L)을 조제하고, 각 20 µL를 상기 Table 1의 조건인 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 표준검량선의 회귀방정식은  $Y = 174.84x - 1.2585(R^2 = 0.9997^{**})$ 로 직선성이 우수하였다(Fig. 4).

**시료 추출 및 분배과정의 확립**

농산물 시료로부터 ametryn 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 추출액으로부터 ametryn 성분 외에 함께 추출되는 농산물 유래 방해물질을 1차적으로 제거하기 위한 조정제법

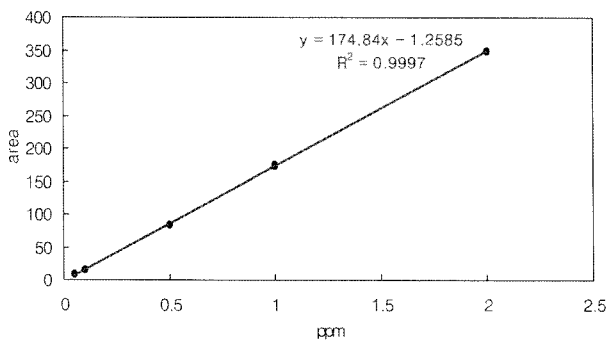


Fig. 4. Calibration curve of ametryn standard solution using HPLC (0.05~2 mg/L, triplicate analysis).

으로 액-액 분배법을 사용하였다. 즉, 수용성 유기용매 추출액을 다량의 포화식염수/증류수로 희석한 후 직접 비극성 용매로 분배 추출하는 방법을 사용하였는데, 이는 US FDA법이나 AOAC법에서 중간~비극성 농약 성분에 대하여 보편적으로 사용되며(AOAC, 2000; Lee 등, 2008), 번거로운 추출액의 농축 과정을 생략할 수 있는 장점이 있다.

분배 용매로 *n*-hexane, dichloromethane/*n*-hexane 혼합액, dichloromethane 4종을 공시, 대상성분의 분배효율을 조사한 결과는 Table 4에 나타내었다. 대상성분의 액-액 분배 조건에 따른 분배효율을 조사한 결과 *n*-hexane 용액 100 mL로 분획하였을 때 ametryn의 회수율은 68% 수준이었으며, dichloromethane/*n*-hexane (20:80, v/v)용액 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 85.3% 수준을, dichloromethane/*n*-hexane(80:20, v/v)용액 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 88%, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 99.6%를 나타내어 분획용매 IV을 액-액 분배조건에 의한 ametryn 분배용매로 선정하였다.

Dichloromethane을 이용한 액-액 분배과정에 의하여 시료 중에 포함된 상당량의 극성 및 기타 방해물질이 제거될 것으로 기대되나, 유지 성분은 dichloromethane 층으로 대상 성분과 함께 분배되기 때문에 제거되지 않는다. 이러한 유지 성분은 기기분석 시 치명적 간섭 또는 분리용 column의 급격한 분리능 저하를 초래하므로 반드시 제거하여야 할 간섭물질이다. 대상시료 중 현미와 콩은 지방함량이 각각 2.7~2.9% 및 20% 수준 함유되어 있는 유지시료이므로 이러한 유지 성분의 제거를 위하여 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하

Table 4. Efficiency of liquid-liquid partition of crude extract by four different solvents for ametryn

Compound	Recovery ratio <sup>1)</sup> (%)			
	Partition I <sup>2)</sup>	Partition II	Partition III	Partition IV
Ametryn	68.0	85.3	88.0	99.6

<sup>1)</sup> Mean values of triplicate samples.

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

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

Table 5. Efficiency of liquid-liquid partition with *n*-hexane/acetonitrile for ametryn

Compound	Recovery ratio (%) <sup>1)</sup>		
	Partition I <sup>2)</sup>	Partition II	Partition III
Ametryn	92.0	97.2	97.4

<sup>1)</sup> Mean values of triplicate samples

<sup>2)</sup> Partition mixture : 40ml *n*-hexane satd. with ACN

I, 40 ml ACN satd. with *n*-hexane (× 1). II, 40 ml ACN stad. with *n*-hexane (× 2). III, 40 ml ACN satd. with *n*-hexane (× 3).

였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000).

Table 5에 나타난 바와 같이 미리 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile로 1회 분배를 수행하였을 때 ametryn의 회수율이 92.0%를 나타내었고, 2회의 경우 97.2%, 3회의 경우 97.4%를 나타내어 2회 이상의 분배에서는 회수율이 크게 향상되지 않는 양상을 나타내었으므로 유지 등 비극성 간섭물질의 제거를 위한 *n*-hexane/acetonitrile 분배법은 분획조건 II인 2회로 설정하였다. 한편 유지 함량이 0.2~0.4%로 비유지 시료로 분류되는 배추, 사과 및 고추에서는 제거되는 불순물의 양이 매우 적고 크로마토그램 상에서 그 정제 효과 또한 미미하였으므로 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 생략할 수 있었다.

### Florisil 흡착 크로마토그래피의 최적화

액-액 분배 및 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 거친 추출액은 색소 등 여전히 상당한 간섭물질이 존재하였으므로 기기분석에 앞서 추가적 정제과정이 필요하였다. 흡착 크로마토그래피는 이온성을 띠지 않는 ametryn과 같은 중성 화합물의 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 방법이며, 흡착제로는 silica gel, florisil 및 alumina가 많이 사용되고 있는데, 이중 florisil은 색소와 유지의 제거가 뛰어나 가장 보편적으로 사용되는 흡착제이다(US FDA, 1999; AOAC, 2000).

본 연구에서도 florisil을 흡착제로 선정 하였으며, 분석대상 성분인 ametryn의 극성을 고려하여 *n*-hexane/ethyl acetate의 혼합용매를 이용한 최적의 용출체계를 확립하고자 하였다(Table 6). Florisil 흡착크로마토그래피용 용매의 다양한 극성 조절을 이용하여 ametryn의 회수율을 검토한 결과 *n*-hexane/ethyl acetate(85/15, v/v) 용매 150 mL로 용출할 경우 99.3%의 회수율이 나타나는 것을 확인할 수 있어 검토된 용매체계

중 가장 우수한 양상을 나타내어 florisil 흡착 크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거법으로 확립하였으며, 흡착제 1 g 당 10 mL의 용출용매를 사용하는 표준적 흡착 크로마토그래피 용출체계와도 비교적 잘 부합하였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000; 이, 2011).

### 분석정량한계 및 농산물 적용 시 ametryn의 회수율

본 연구에서 확립한 시료 추출 및 정제, 그리고 기기분석 과정을 무농약 농산물 시료에 적용한 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 모든 무농약 농산물의 최종 시료용액에서 대상농약과 동일한 머무름시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였다. 따라서 분석기기의 정량한계와 시료량, 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 분석법의 정량한계를 산출할 수 있었다. 산출된 ametryn의 정량한계는 0.02 mg/kg으로 계산되어 국제기준인 Codex(Codex Alimentarius Commission, 2003) 및 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(이, 2011)에서 권장하는 잔류농약 분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 허용기준의 1/2 이하의 정량한계 기준에 적합하였다.

각각의 농산물 무처리 시료에 ametryn 표준용액을 정량한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가하고, 상기 확립된 분석방법에 의하여 대표 농산물에 3반복으로 회수율을 조사한 분석한 결과는 Table 7과 같다. 정량한계 10배 수준에서는 81.1~90.4%, 정량한계 50배 수준에서는 86.9~91.1%의 양호한 회수율을 보였고, 재현성도 양호하여 분석오차는 3.6% 미만으로 관찰되었다. 따라서 처리수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70~120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하였다. 이상의 결과에서 본 연구에서 확립된 ametryn 분석법은 국내·외 농산물의 잔류농약 분석 및 검사에 충분히 적용 가능함을 알 수 있었다.

Table 6. Elution profile of ametryn on florisil dry column

Elution solvent (v/v)	Recovery ratio (%) <sup>1)</sup>			
	0 - 50 mL	51 - 100 mL	101 - 150 mL	Total
90 : 10 <sup>2)</sup> ( <i>n</i> -hexane : EtoAC)	0.0	40.0	44.4	84.4
85 : 15 <sup>2)</sup> ( <i>n</i> -hexane : EtoAC)	18.8	77.1	3.4	99.3
80 : 20 <sup>2)</sup> ( <i>n</i> -hexane : EtoAC)	80.2	14.6	0.6	95.4
75 : 25 <sup>2)</sup> ( <i>n</i> -hexane : EtoAC)	89.9	3.7	0.7	94.4

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

<sup>2)</sup> Pre-washed 50 mL of *n*-hexane.

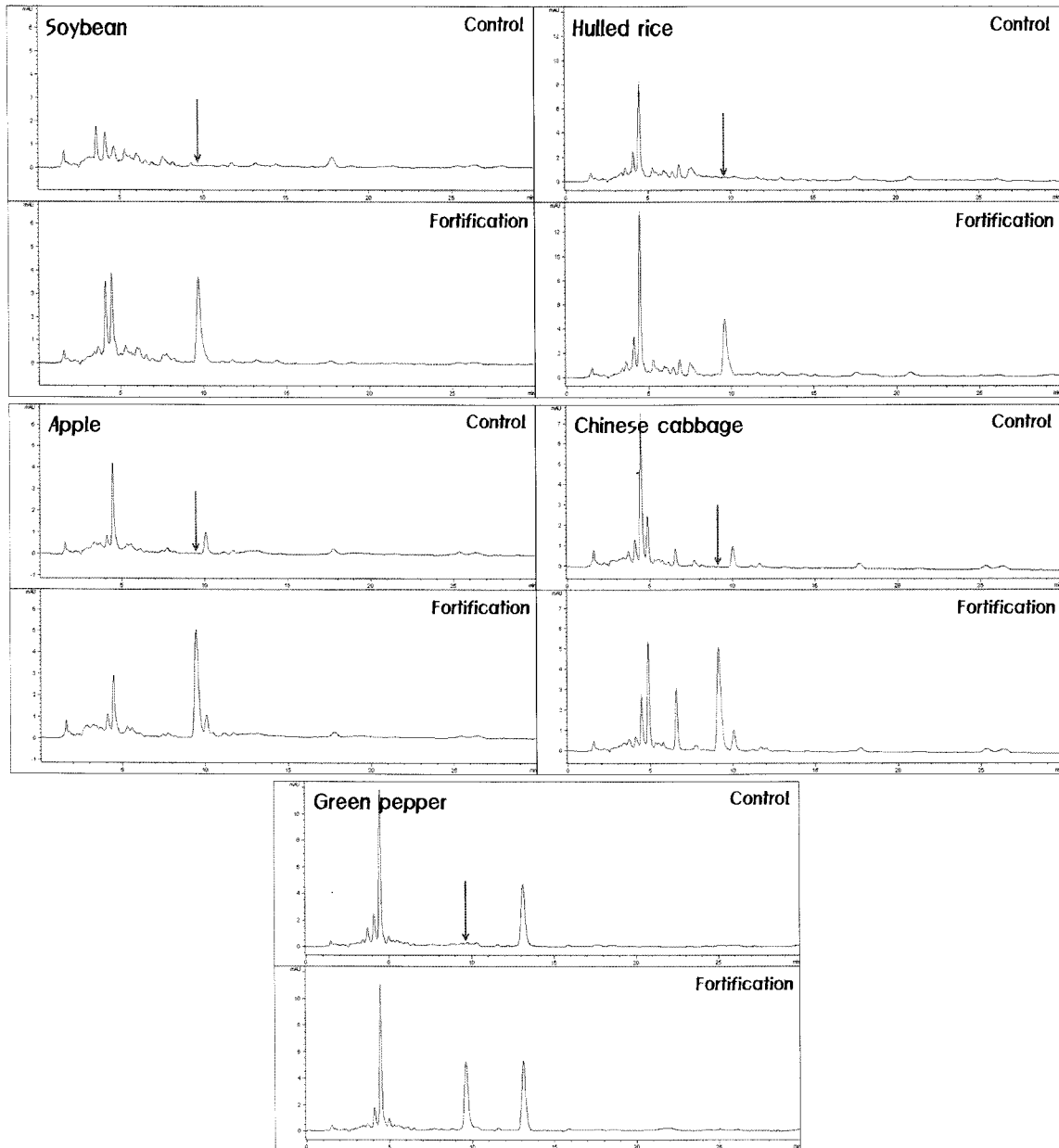


Fig. 5. HPLC chromatograms of various agricultural commodity extracts (fortified concentration: ten-fold of LOQ).

Table 7. Recovery ratio of ametryn in various crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%) <sup>1)</sup>	CV (%)	LOQ (mg/kg)
Soybean	0.2	83.7 ± 2.7	3.2	0.02
	1.0	86.9 ± 3.1	3.6	
Hulled rice	0.2	81.1 ± 1.6	1.4	0.02
	1.0	91.1 ± 1.1	1.2	
Apple	0.2	86.1 ± 1.7	2.0	0.02
	1.0	87.5 ± 1.5	1.7	
Green pepper	0.2	85.9 ± 1.7	1.7	0.02
	1.0	90.8 ± 2.2	2.4	
Chinese cabbage	0.2	90.4 ± 3.0	3.3	0.02
	1.0	90.5 ± 1.1	1.3	

<sup>1)</sup> Mean values of triplicate samples with standard deviations.

### LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

한편, 개발된 분석법의 정성적 신뢰성을 확보하기 위하여 LC/MS에 의한 재확인 과정을 추가로 확립하였다. LC/MS 분석 시 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다(Kwon 등, 2008). Ametryn의 이온화를 돕기 위해 이동상에 0.1% formic acid를 첨가하여 분석을 실시하였고, ESI positive-ion mode에서 높은 감도를 나타내었으며, TIC(total-ion chromatogram)는 Fig. 6에, 대상성분의 mass spectrum은 Fig. 7에 나타내었다.

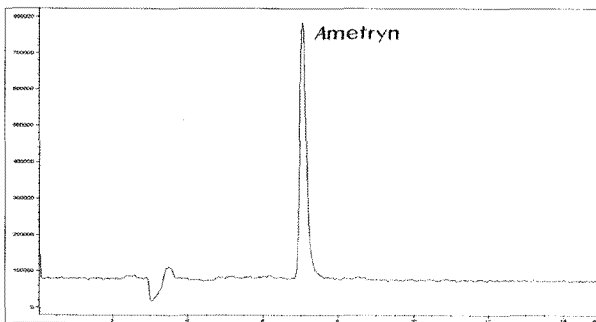


Fig. 6. Total-ion chromatogram (TIC) of ametryn.

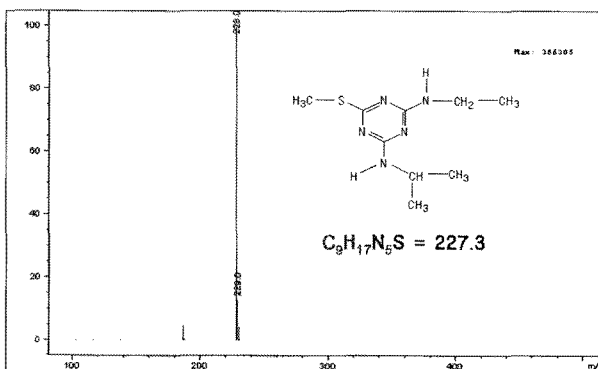


Fig. 7. Mass spectrum of ametryn.

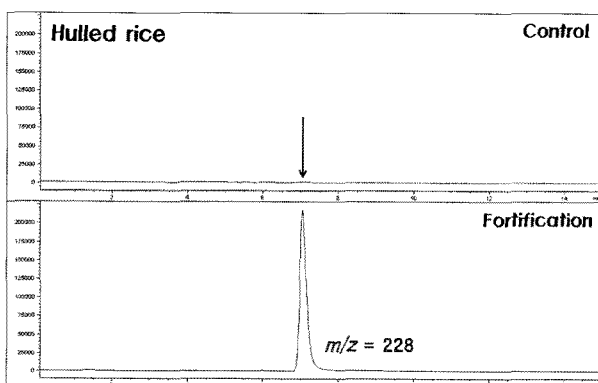


Fig. 8. SIM chromatogram of ametryn in hulled rice matrix.

Fig. 8은 본 실험에 사용된 농산물 시료 중 현미를 대상으로 ametryn의 잔류분을 재확인한 SIM(selected-ion monitoring) chromatogram이다. 본 실험에서 사용된 모든 농산물의 무처리 시료에서 대상 농약성분의 peak가 전혀 관찰되지 않았으며, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 정확하게 ametryn 잔류분만을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC-UVD를 이용한 정량법과 더불어 ametryn의 잔류분의 추가적 정성 분석법으로도 완벽하게 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

### 결론

HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 시료에서 triazine계 제초제인 ametryn의 잔류 분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 acetone을 가하여 추출된 ametryn의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 florasil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 분석 대상 시료로 하였다. C<sub>18</sub> 칼럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 대표 농산물 중 ametryn의 분석정량 한계(LOQ)는 0.02 mg/kg이었다. 전체 농산물에 대한 회수율은 81.1~91.1%였으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계 없이 10%미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석 기준이내를 만족하였다. 본 연구에서 확립된 triazine계 제초제 ametryn의 잔류분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인과정 및 회수율 검증의 결과를 총괄해 볼 때 분석과정의 편이성 및 신뢰성이 확보된 공정분석법으로 사용이 가능할 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.

Codex Alimentarius Commission (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.

Dale, L. S., L. J. Krutz, W. B. Henry, B. D. Hanson, M. D. Poteet, and C. R. Rainbolt (2010) Sugarcane soils exhibit enhanced atrazine degradation and cross adaptation to other s-triazines. *Journal American Society of Sugar Cane Technologists* 30:1~10

Farré, M. J. Fernandez, M. Paez, L. Granada, L. Barba, H. M.



- Gutierrez, C. Pulgrarin, and D. Barceló (2002) Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. *Anal. Bioanal. Chem.* 373:704~709
- 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.
- Glauca, M. F., I. C. Pinto, and S. F. Jardim (2000A) Mobile phase optimization for the separation of some herbicide samples using HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23(9):1353~1363
- Glauca, M. F., I. C. Pinto, and S. F. Jardim (2000B) Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. *Journal of Chromatography A* 869:463~469
- International Uniform Chemical Information Database Dataset (IUCLID) (2000) European Commission - European Chemicals Bureau.
- John, R. D., G. Wade, and I. J. Barnabas (1996) Determination of triazine herbicides in environmental samples. *Journal of Chromatography A.* 733:295~335
- 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., 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.
- Lee, S. J., Y. S. Hwang, Y. H. Kim, M. Y. Nam, S. B. Hong, W. K. Yun, C. H. Kwon, J. A. Do, M. H. Im, Y. D. Lee, and M. G. Choung (2010) Determination of fomesafen residue in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. *Korean J. of Pesticide Sci.* 14(2):100~108
- Lowell, A. Kleper (1979) Effects of certain herbicides and their combinations of nitrate and nitrite reduction. *Plant Physiology* 64:273~275.
- Lucio, F. C. M., C. H. Collins, and I. C. S. F. Jardim (2004) New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grapes. *Journal of Chromatography A* 1032:51~58.
- Miller, J. M. (2005) *Chromatography : concepts and contrasts* (2nd), Wiley Interscience, p. 286~287, USA.
- Tadeo, J. L., C. S. Brunete, A. I. García-Valcarcel, L. Martínez, and R. A. Pérez (1996) Determination of cereal herbicide residue in environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 754:347~365.
- US FDA (1999) *Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multi residue Methods* (3rd ed.), US Food and Drug Administration, USA.
- 식품의약품안전청 (2009) 식품공전.
- 이영득 (2011) 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서, 식품의약품 안전청.
- 장미라, 문현경, 김태량, 육동현, 김정현, 박석기 (2010) 서울지역 유통 채소류 섭취에 따른 잔류 농약의 위해성 평가. *한국영양학회지* 43(4):404~412.

## HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 ametryn의 분석

이수진 · 김영학 · 송이슬 · 정명근\*

강원대학교 생약자원개발학과

**요 약** 국내 미등록 농약인 triazine계 제초제인 ametryn에 대해 HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 시료의 잔류 분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 acetone을 가하여 추출된 ametryn의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 florisil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다. C<sub>18</sub> 컬럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 대표 농산물 중 ametryn의 분석정량한계(LOQ)는 0.02 mg/kg이었다. 전체 농산물에 대한 회수율은 81.1~91.1%였으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계없이 10%미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석 기준이내를 만족하였다. 본 연구에서 확립한 triazine계 제초제인 ametryn의 잔류분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인과정 및 회수율 검증의 결과를 총괄해 볼 때 분석과정의 편이성 및 신뢰성이 확보된 공정분석 방법으로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

**색인어** ametryn, HPLC-UVD/MS, 작물분석, 잔류분