

HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 bentazone의 분석법 확립

김영학 · 이수진 · 송이슬 · 황영선 · 이영득¹ · 정명근*

강원대학교 생약자원개발학과, ¹대구대학교 생명환경학부

(2011년 6월 8일 접수, 2011년 6월 17일 수리)

Analytical Method of Bentazone Residue in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS

Young-Hak Kim, Su-Jin Lee, Lee-Seul Song, Young-Sun Hwang, Young Deuk Lee¹ and Myoung-Gun Choung*

Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea, ¹Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

Abstract

Bentazone is benzothiadiazole group herbicide, and used to foliage treatment. This herbicide have already been widely used for cereals and vegetables planting in worldwide. This experiment was conducted to establish a determination method for bentazone residue in crops using HPLC-UVD/MS. Bentazone residue was extracted with acetone (adjusted pH 1 with phosphoric acid) 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 bentazone from the aqueous phase. Florisil column chromatography was additionally employed for final clean up of the extract. The bentazone was quantitated by HPLC with UVD, using a YMC ODS AM 303 (4.6 × 250 mm) column. The crops were fortified with bentazone at 3 levels per crop. Mean recovery ratio were ranged from 82.0% for a 0.2 mg/kg in apple to 97.9% for a 0.02 mg/kg in Chinese cabbage. The coefficients of variation were ranged from 0.5% for a 0.02 mg/kg in soybean to 9.7% for a 0.02 mg/kg in Chinese cabbage. Quantitative limit of bentazone was 0.02 mg/kg in representative five 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 bentazone in agricultural commodities.

Key words bentazone, HPLC-UVD/MS, crop analysis, residue analysis

서 론

Bentazone[3-isopropyl-1*H*-2,1,3-benzothiadiazin-4(3*H*)-one 2,2-dioxide]은 독일의 BASF사에서 개발한 benzothiadiazole 계의 선택적 접촉 제초제로서 두류 및 벼 재배 시 광엽잡초의 방제에 사용하는 발아 후 처리제이며(Abernathy 등, 1973), 농약으로의 최초 등록은 1972년에 이루어졌다. Bentazone의 다른

이름은 Basagran, Bendioxide, Bentazon, Bas 351-H, Leader 및 Pledge라고도 불리며, 화학식은 C₁₀H₁₂N₂O₃S=240.3 이고, 순수한 bentazone은 약간 갈색을 나타내지만 무색이고, 냄새가 없는 고형 결정체이다.

Bentazone은 벼 재배 시 발생하는 참방동사니(Franklin 등, 2010)와 콩(Connelly 등, 1988), 고추(Aurora 등, 1984), 옥수수 및 땅콩 밭에서 광엽잡초의 선택적 제초에 대한 후기 발생 제초제로 사용되고, 올챙이고랭이(박 등, 2005), 물옥잠(박 등, 2004), 올방개(황 등, 2006)와 같은 잡초방제에 효과적이며, 광

*연락처 : Tel. +82-33-540-3321, Fax. +82-33-540-3329
E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr

합성의 Hill 반응을 저해하고(정 등, 2000; Bethlenfalvay 등, 1979), 잎에 처리한지 4~8시간 정도에 육안으로 판별이 가능한 처리효과가 나타나고, 국내에서는 단제 또는 합제로 수도 일년생 및 다년생 잡초, 보리와 옥수수의 광엽잡초 방제약제로 현재까지 널리 사용되고 있다(Korea Crop Protection Council, 2005).

Bentazone은 주로 잎에서 흡수되고(Zabkiewicz 등, 2003), 이행성이 작으나 뿌리에서도 흡수되며, 주로 목질부로 이행한다. 물에 대한 용해도는 20°C에서 1L 당 500 mg 수준이며, 다른 용매에 대한 용해도는 아세톤, 에탄올, 에칠아세테이트, 벤젠, 시클로헥산 등에 녹으며, 용점은 137~139°C이고, 산해리상수(pK_a)는 3.3, *n*-octanol/water 분배계수(Log Pow)는 -0.46을 나타내는 약산성, 극성 화합물이며, 화학구조는 Fig. 1과 같다.

쥐에서 반수치사량을 나타내는 급성 경구독성은 1,100 mg/kg, 급성경피 독성은 2,500 mg/kg 이상으로 저독성이지만, 사람이 실수로 마셨을 경우 구토, 설사, 위경련을 동반한 심장마비로 사망할 수 있다(Müller 등, 2003).

국내 식품공전 잔류농약분석법 4.1.4.4(식품의약품안전청, 2009) 및 선행연구(Vink 등, 1996)에서 bentazone 분석 시 diazomethane에 의한 methylation에 의해 methyl ester로의 유도체화 과정을 거친 후 GLC-NPD로 분석하는 방법이 제시되어 있으나, 이 방법은 시료 추출, 농축과정 및 유도체화 과정에 과도한 시간 및 노력이 소요되고, 분석자의 건강 위해성이 문제가 되는 다양한 유독성 용매가 사용되는 단점이 있다. 한편, Alexander 등(1992)과 노 등(2007)에 의해 액-액 분배 및 SPE 정제 후 HPLC를 이용한 bentazone의 분석법이 보고된 바 있으나, 선행 연구결과들은 분석대상이 지하수 등 물 혹은 식물체 처리 부위에 대한 농약의 잔류성 및 오염도를 평가하기 위해 수행되어진 결과들이다.

따라서 본 연구에서는 bentazone의 현행 식품공전상의 분석법보다 편이성, 정확성 및 정밀성이 확보된 농산물에 적용 가능한 효율적인 분석방법을 확립하여 국내 농산물 잔류농약 검사의 분석효율 향상 및 수입 농산물의 잔류농약 분석에 활용 가능한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

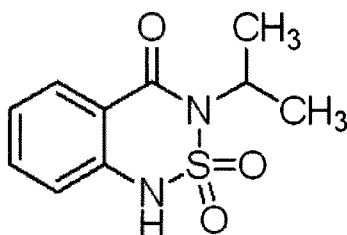


Fig. 1. Chemical structure of bentazone.

재료 및 방법

시약 및 기구

Bentazone의 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[®](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 HPLC 용을 J. T. Baker(USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 유기용매 및 무기시약은 시약특급 또는 잔류분석용을 사용하였다. 감압농축기는 Eyela NE-1000SW(Japan)를 사용하였고, 농산물 시료는 호모게나이저(IKA, Ultra-Turrax T-25, USA)를 이용하여 마쇄, 균질화 및 추출하였다.

농산물 시료

식품의 농약 잔류허용기준(식품의약품안전청, 2009)에 bentazone을 대상성분으로 등록되어 있는 농산물 42종과 Codex Alimentarius Commission에서 정한 농산물 부류별 대표시료 분류표를 참조하여(Codex Alimentarius Commission, 2003), 곡류에서는 현미, 두류 및 유지류에서는 콩, 채소류에서 고추 및 배추, 과실류에서는 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 확인 후 사용하였다.

HPLC-UVD/MS 기기분석 조건

농산물 중 bentazone의 기기분석은 분석의 재현성을 극대화하기 위한 조건으로 수행하였다. 즉, Table 1에 나타낸 바와 같이 HPLC는 Agilent 1200 series(USA)를 사용하였고, 칼럼은 역상 C₁₈ 칼럼인 YMC ODS AM 303(4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, Waters, USA)을 사용하였고, 기타 분석 조건은 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 bentazone

HPLC system	Agilent 1200 HPLC system
Column	YMC ODS AM 303 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m, Waters, USA)
Column temp.	35 $^{\circ}$ C
Mobile phase	20 mM phosphate (pH 3) : ACN (60:40, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Detection	UV 220 nm
Injection Volume	20 μ L

Table 2. LC/MS operating conditions of bentazone

LC/MS system	Agilent 6110 Quadruple LC/MS
Column	YMC ODS AM 303 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m, Waters, USA)
Column temp.	35 $^{\circ}$ C
Mobile phase	10 mM ammonium acetate : acetonitrile (60/40, v/v)
Flow rate	0.6 mL/min
Sample size	5 μ L
Ionization	ESI negative-ion mode
Gas temp.	350 $^{\circ}$ C
Drying gas	N ₂ , 12.0 mL/min
Capillary voltage	3.5 kV
Mass range (m/z)	200~600

분석기기의 재현성 검증

Bentazone 표준용액의 농도를 0.5 mg/kg로 조절하고 HPLC에 10번 주입하여 크로마토그램 상의 retention time(t_r) 및 peak area 등의 변이를 비교 검토하여 분석기기의 재현성을 평가하였다.

분배용매별 분배효율 검증

Bentazone은 산성조건에서 유기용매로의 전용이 효율적인 예비실험의 결과를 바탕으로 pH가 1로 조절된 150 mL의 acetone에 bentazone 표준용액 1 mL를 첨가하고, 포화식염수 50 mL와 증류수 450 mL를 첨가한 뒤 분액여두에 옮겨 각 분배용매로 *n*-hexane 100 mL, dichloromethane/*n*-hexane (80/20, v/v) 100 mL, dichloromethane 50 mL(× 2회)로 처리를 달리하여 각각 추출하였다. 각 분배 추출액은 무수 sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하였고, 40 $^{\circ}$ C 이하에서 감압농축 하였다. 농축된 잔류물은 acetonitrile 4 mL를 가하여 잘 녹이고, 인산으로 pH를 3으로 조절한 20 mM phosphate buffer 6 mL를 첨가하여 재용해한 후 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 $^{\circ}$ C 이하에서 감압농축한 후, acetonitrile이 포화된 *n*-hexane 40 mL를 첨가하고, *n*-hexane이 포화된 acetonitrile 40 mL씩 2~3회 분배 추출한 후 40 $^{\circ}$ C 이하에서 감압농축 하였으며, 농축된 잔류물은 acetonitrile 4 mL를 가하여 잘 녹이고, 인산으로 pH를 3으로 조절한 20 mM phosphate buffer 6 mL를 첨가하여 재용해한 후 HPLC로 분석하였고, *n*-hexane/acetonitrile 분배 회수율을 계산하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건의 검토

130 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 가열하여 탈수시킨 활성 florisil 10 g을 내경 1.5 cm, 길이 40 cm의 유리 칼럼에 건식 충전한 후, 3 g의 무수 sodium sulfate를 위에 첨가하였다(이하 florisil 칼럼). 충전된 florisil 칼럼에 *n*-hexane 50 mL를 가하여 상단에 소량의 *n*-hexane이 남을 정도로 유출시켜 활성화시킨 후 dichloromethane 10 mL에 녹인 검체용액을 가한 후 약 3 mL/min의 유속으로 유출시켰다. 충전제 표면이 노출되기 직전 dichloromethane/acetone 혼합용액(90/10, v/v) 100 mL를 가하여 pre-washing 후 dichloromethane/acetone 혼합용

액의 조성별로 각각 50 mL씩 3회 용리시켰으며, 각 조성별 혼합용액의 조성별 용리액을 농축시킨 후 건조물에 acetonitrile 4 mL를 가하여 잘 녹이고, 인산으로 pH를 3으로 조절한 20 mM phosphate buffer 6 mL를 첨가하여 재용해한 후 이 용액 20 μ L를 HPLC로 분석하여 용리액의 조성별 bentazone의 회수율을 검토하였다.

표준검량선 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

Bentazone의 농도별 표준용액은 stock solution을 0.025~5 mg/L의 농도가 되도록 각각 희석하고, 20 μ L를 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.

$$\text{LOQ}(\text{mg/kg}) = \left[\frac{\text{기기 정량한계}(\text{ng})}{\text{주입량}(\mu\text{L})} \right] \times \left[\frac{\text{시료용액}(\text{mL})}{\text{시료량}(\text{g})} \right]$$

분석법의 대표 농산물에 대한 bentazone의 회수율 검증

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

결과 및 고찰

HPLC 분석조건 확립

Bentazone의 최적 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 메탄올에 용해한 표준품을 이용하여 최대흡수파장(λ_{max})을 검

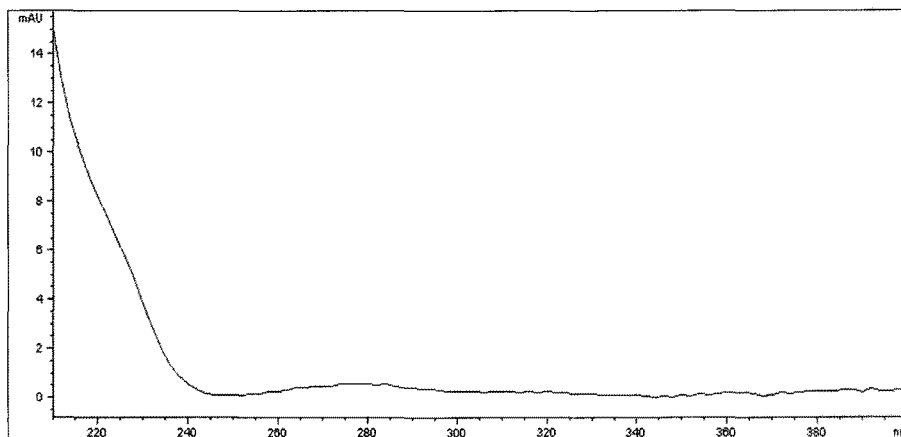


Fig. 2. UV absorption spectrum of bentazone.

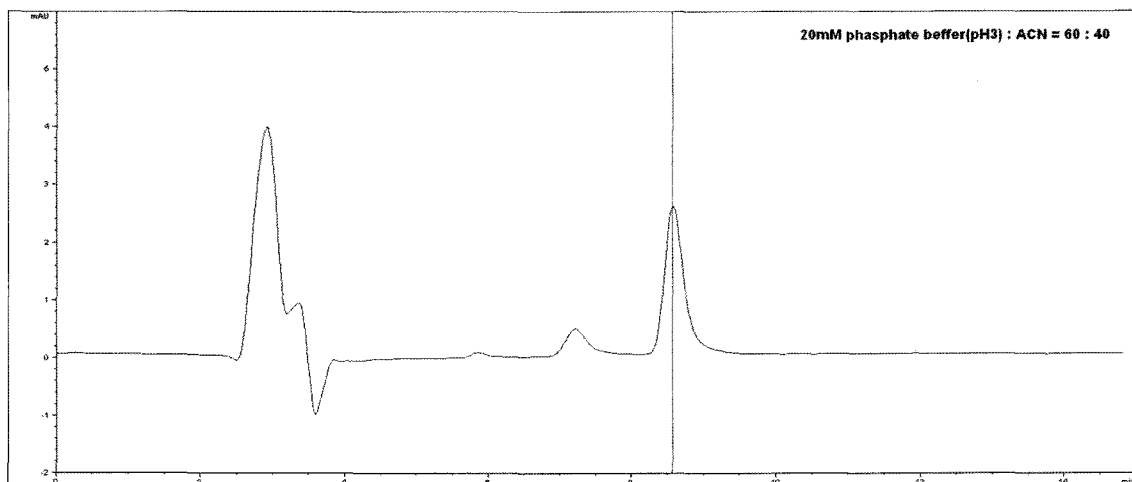


Fig. 3. HPLC chromatogram of bentazone standard (0.1 mg/L in methanol).

또한 결과 210 nm 이하에서 가장 높은 흡광력을 나타내었다 (Fig. 2). 210 nm이하의 파장 영역에서는 용매에 의한 노이즈 현상이 심할 것으로 판단되므로 220 nm로 검출파장을 설정하였다.

분석용 HPLC 칼럼은 C₁₈ 계열의 YMC ODS AM 303 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μ m, Waters, USA)을 이용하였고, 이동상으로 여러 종류의 용매계를 검토한 결과 산성 완충용액인 phosphate buffer를 사용하여 이온화 억제와 칼럼의 머무름에 대한 완충작용이 유도되는 20 mM phosphate(pH 3) : ACN (60:40, v/v) 조건이 가장 양호한 분리 양상을 나타내었다(Fig. 3).

분석기기의 검출한계, 정량한계 설정 및 분석 재현성 평가

분석기기의 검출한계는 기기분석 시 크로마토그램에서 peak로 검출할 수 있는 한계농도를 의미하는 것으로 크로마토그램 상에서 S/N(signal/noise)비가 3이상을 나타내는 성분의 농도를 의미한다. 한편 분석기기의 정량한계는 크로마토그램의 해석 시 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계농도로서, 크로

마토그램 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 bentazone 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과 정량한계(S/N \geq 10)는 0.05 mg/kg 수준이었다. 한편 분석 기기의 안정성 평가를 위해 분석재현성 평가를 실시한 결과 0.5 mg/kg 농도의 표준품을 10회 반복 주입 분석하여 머무름시간(t_r), 피크면적(peak area) 및 높이(peak height) 등의 변이계수(CV, %)를 조사하였고, 조사된 피크의 측정변수 모두 최대 3.3% 미만으로 극히 높은 분석 재현성을 나타내어, 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고, 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다(Table 3).

검량선의 직선성

Bentazone의 농도별 표준용액(0.025~5 mg/L)을 조제하고, 각 20 μ L를 상기 Table 1의 조건인 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 표준검량선의 회귀방정식은 $Y = 91.881x - 0.8547$ ($R^2=0.9995$)로 직선성이 우수하였다(Fig. 4).

Table 3. Reproducibility of HPLC peak area and retention time (t_r) for bentazone

Parameter	t _r (min.)	Area (mAU)	Height (mAU)	Width (min.)
Min.	8.56	46.20	2.40	0.28
Max.	8.87	48.50	2.60	0.30
Mean	8.70	46.93	2.50	0.29
SD	0.14	0.69	0.08	0.01
CV (%)	1.7	1.5	3.3	2.9

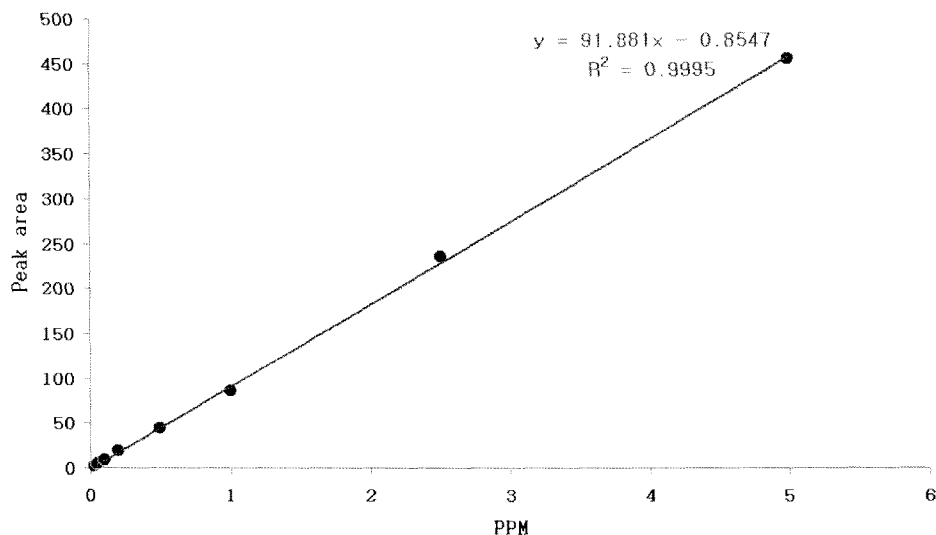


Fig. 4. Calibration curve of bentazone standard solution using HPLC (0.025~5 mg/L, triplicate analysis).

시료 추출 및 분배과정의 확립

농산물 시료로부터 bentazone을 추출하기 위한 용매로는 인산용액으로 pH를 1로 조절한 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 bentazone 성분 외에 함께 추출되는 농산물 유래 방해물질을 1차적으로 제거하기 위한 조정제법으로 액-액 분배법을 사용하였다. 즉, 수용성 유기용매 추출액을 다량의 포화식염수/중류수로 희석한 후 직접 비극성 용매로 분배 추출하는 방법을 사용하였는데, 이는 US FDA법이나 AOAC법에서 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 3종을 공시, 대상성분의 액-액 분배 조건에 따른 분배효율을 조사한 결과 *n*-hexane 용액 100 mL로 분획하였을 때 bentazone의 회수율은 21% 수준이었으며, dichloromethane/*n*-hexane(80:20, v/v)용액 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 102% 수준을, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 회수율은 105%를 나타내어 분획용매 III을 액-액 분배조건에 의한 bentazone 분배 용매로 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 간섭물

질이다. 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 추가하였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000).

Table 5에 나타낸 바와 같이 미리 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile로 2회 분배를 수행하였을 때 bentazone의 전량 회수가 가능하였고, 3회의 분배를 수행하여도 회수율이 크게 변하지 않는 양상을 나타내었으므로, 유지 등 비극성 간섭물질의 제거를 위한 *n*-hexane/acetonitrile 분배법은 분획조건 I로 분배하는 것으로 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 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 추가적 정제방법이며, 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 bentazone의 극성을 고려하여 florisil을 흡착제로 선정 하였으며, 용매의 극성 조절을 위해 dichloromethane/*n*-hexane, dichloromethane/ethyl acetate 및 dichloromethane/acetone 등의 혼합용매를 이용한 최적의 용출체계를 확립하고자 하였다(Table 6).

Florisil 흡착크로마토그래피용 용매의 다양한 극성 조절을 이용하여 bentazone의 회수율을 검토한 결과 dichloromethane/*n*-hexane 및 dichloromethane/ethyl acetate 혼합용매계에서

Table 4. Efficiency of liquid-liquid partition of crude extract by three different solvents for bentazone

Compound	Recovery ratio (%) ¹⁾		
	Partition I ²⁾	Partition II	Partition III
Bentazone	20.9 ± 0.9	101.8 ± 1.2	105.4 ± 1.9

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 dichloromethane/*n*-hexane (80/20, v/v). III, 50 mL dichloromethane (× 2 times).

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

Compound	Recovery ratio (%) ¹⁾	
	Partition I ²⁾	Partition II
Bentazone	102	103

¹⁾ Mean values of triplicate samples.
²⁾ 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 bentazone on florisil dry column

Elution solvent (v/v)	Recovery ratio (%) ¹⁾			
	0~50 mL	51~100 mL	101~150 mL	Total
50 : 50 (CH ₂ Cl ₂ : n-hexane)	0	0	0	0
100 (CH ₂ Cl ₂)	0	0	0	0
90 : 10 (CH ₂ Cl ₂ : EtoAc)	0	0	0	0
80 : 20 (CH ₂ Cl ₂ : EtoAc)	0	0	0	0
70 : 30 (CH ₂ Cl ₂ : EtoAc)	0	0	0	0
60 : 40 (CH ₂ Cl ₂ : EtoAc)	0	0	0	0
50 : 50 (CH ₂ Cl ₂ : EtoAc)	0.7	1.0	1.1	2.8
95 : 5 (CH ₂ Cl ₂ : ((CH ₃) ₂ CO)	0	0	0	0
90 : 10 (CH ₂ Cl ₂ : ((CH ₃) ₂ CO)	0	0	0	0
80 : 20 ²⁾ (CH ₂ Cl ₂ : ((CH ₃) ₂ CO)	1.8	7.0	12.4	21.2
70 : 30 ²⁾ (CH ₂ Cl ₂ : ((CH ₃) ₂ CO)	24.4	12.4	9.2	45.9
65 : 35 ²⁾ (CH ₂ Cl ₂ : ((CH ₃) ₂ CO)	41.9	33.0	10.0	84.9
60 : 40 ²⁾ (CH ₂ Cl ₂ : ((CH ₃) ₂ CO)	69.5	21.6	4.4	95.5

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

²⁾ Pre-washed 100 mL of dichloromethan/acetone (90/10, v/v).

는 bentazone이 거의 용출되지 않는 양상을 확인할 수 있었으며, dichloromethane/acetone(90/10, v/v) 용매 100 mL로 pre-washing 한 후, dichloromethane/acetone(60/40, v/v)의 혼합용매 150 mL로 용출할 경우 bentazone 성분이 약 96%의 회수율을 나타내는 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 bentazone의 회수율

본 연구에서 확립한 시료추출 및 정제, 그리고 기기분석 과정을 무농약 농산물 시료에 적용한 결과, Fig. 5에 나타낸 바

와 같이 모든 무농약 농산물의 최종 시료용액에서 대상농약과 동일한 머무름시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였다. 따라서 분석기기의 정량한계(LOQ)와 시료량, 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 분석법의 정량한계를 산출할 수 있었다. 산출된 bentazone의 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 bentazone 표준용액을 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가하고, 상기 확립된 분석방법에 의하여 대표 농산물에 3반복으로 회수율을 조사한 분석한 결과는 Table 7과 같다. 정량한계 수준에서

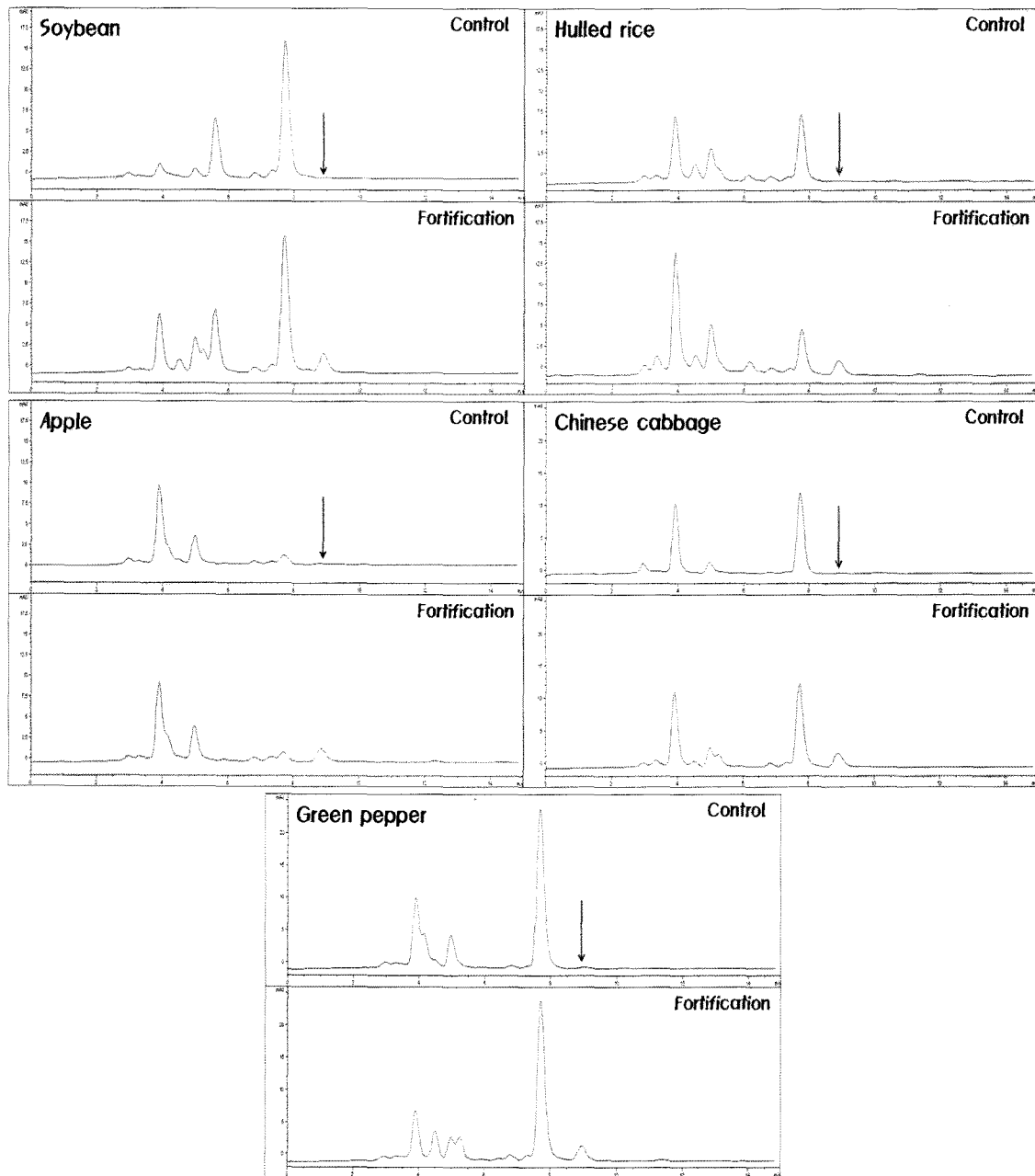


Fig. 5. HPLC chromatograms of various agricultural commodity extracts (fortified concentration: ten-fold of LOQ).

는 83.0~97.9%, 정량한계 10배 수준에서는 82.0~90.6%, 정량한계 50배 수준에서는 83.3~94.9%의 양호한 회수율을 보였고, 재현성도 양호하여 분석오차는 최대 9.7% 미만으로 관찰되었다. 따라서 처리수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70~120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하였다. 이상의 결과에서 본 연구에서 확립된 bentazone 분석법은 국내·외 농산물의 잔류 농약분석 및 검사에 충분히 적용이 가능함을 알 수 있었다.

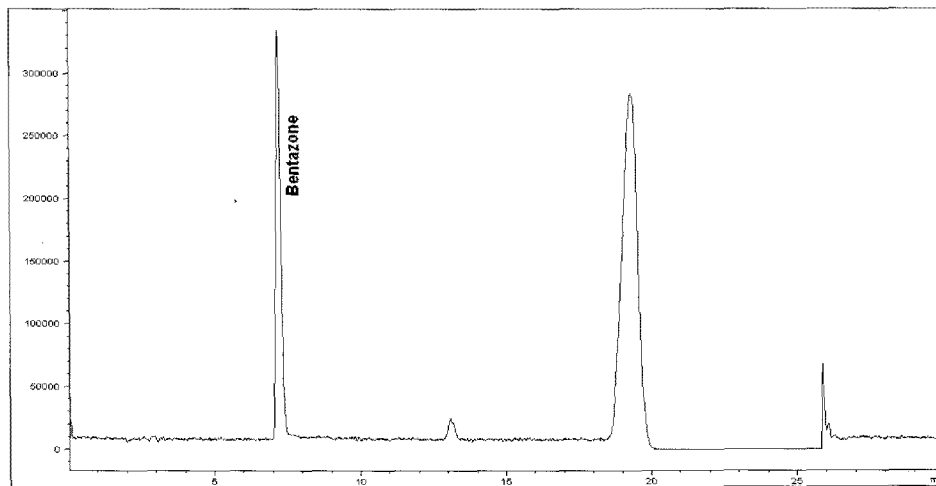
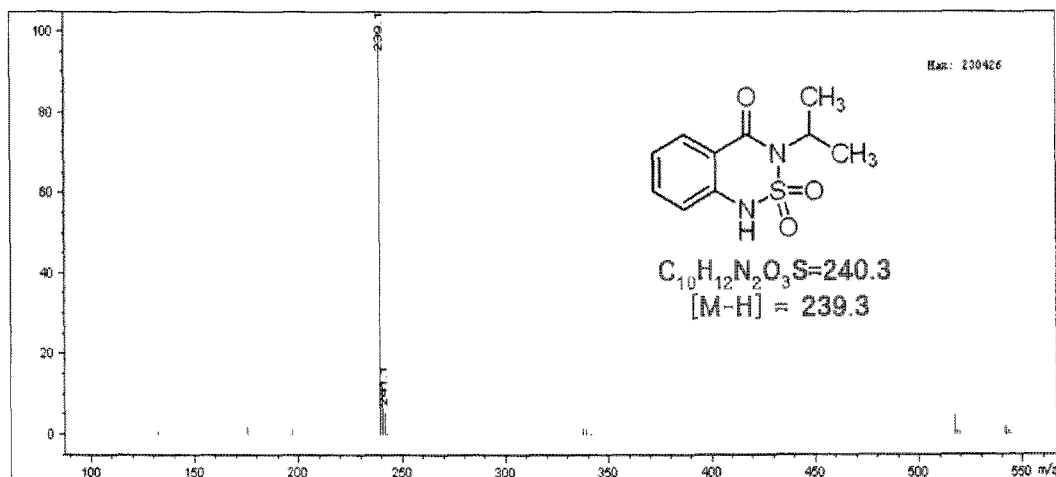
LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

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 정성 확인이 가능하다는 장점이 있다(Kwon 등, 2008). Bentazone의 이온화를 돕기 위하여 HPLC 분석에 이용된 이동상 용매 중 증류수에 10 mM ammonium acetate를 첨가하여 분석을 실시하였고, ESI negative-ion mode에서 높은 감도를 나타

Table 7. Recovery ratio of bentazone in various crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%) ¹⁾	CV (%)	LOQ (mg/kg)
Soybean	0.02	89.9 ± 0.4	0.5	0.02
	0.2	88.6 ± 2.8	3.2	
	1.0	94.9 ± 1.1	1.1	
Hulled rice	0.02	92.6 ± 2.1	2.3	0.02
	0.2	90.6 ± 4.7	5.2	
	1.0	83.3 ± 2.8	3.4	
Apple	0.02	83.2 ± 1.2	1.5	0.02
	0.2	82.0 ± 1.9	2.3	
	1.0	84.4 ± 0.7	0.8	
Green pepper	0.02	83.0 ± 1.0	1.3	0.02
	0.2	86.2 ± 1.4	1.6	
	1.0	83.7 ± 2.2	2.7	
Chinese cabbage	0.02	97.9 ± 9.5	9.7	0.02
	0.2	90.2 ± 0.8	0.9	
	1.0	94.6 ± 1.7	1.8	

¹⁾ Mean values of triplicate samples with standard deviations.

**Fig. 6.** Total-ion chromatogram (TIC) of bentazone standard.**Fig. 7.** Mass spectrum of bentazone.

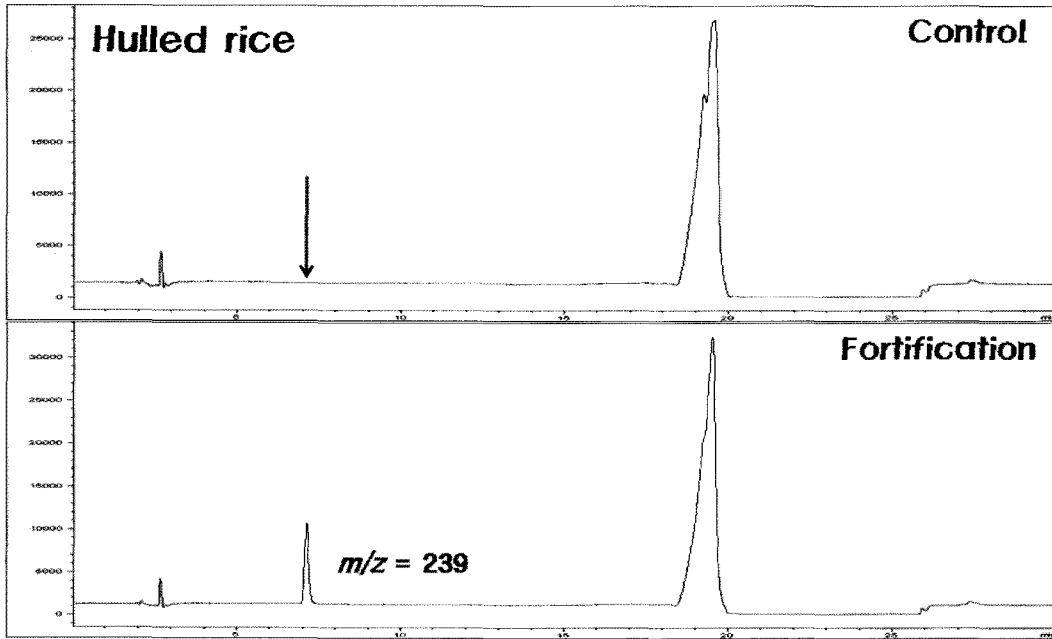


Fig. 8. SIM chromatogram of bentazone in hulled rice matrix.

내었으며, TIC(total-ion chromatogram)는 Fig. 6에, 대상성분의 mass spectrum은 Fig. 7에 나타내었다.

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

결론

HPLC-UVD/MS 분석법을 이용하여 농산물 시료에서 benzothiadiazole계 선택적 접촉 제초제인 bentazone의 잔류 분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 인산용액으로 pH를 1로 조절한 acetone을 가하여 추출한 bentazone의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 florisil 흡착 크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다. C₁₈ 칼럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 현미, 콩, 사과, 배추 및 고추를 포함한 5종의 대표 농산물 중 bentazone의 분석정량 한계(LOQ)는 0.02 mg/kg이었다. 전체 농산물에 대한 회수

율은 82.0~94.9%였으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계 없이 10%미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석 기준이내를 만족하였다. 본 연구에서 확립된 bentazone의 잔류 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인과정 및 회수율 검증의 결과를 종합해 볼 때 분석과정의 편이성 및 신뢰성이 확보된 공정분석법으로 사용이 가능 할 것으로 판단된다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Abernathy, J. R., and L. M. Wax (1973) Bentazone mobility and adsorption in twelve Illinois soils. *Weed Science* 21(3):224~227.

Alexander, J. J. D. H. E. Arabi, K. P. Hupe, U. A. T. Brinkman (1992) Electrophoretic sample pre-treatment techniques coupled on-line with column liquid chromatography. *Analyst* 117: 1355~1359.

AOAC (2000) 'Pesticide and industrial chemical residues, In Official method of analysis', 17th ed., pp. 1~88, AOAC International, Arlington, VA, USA.

Aurora, M. B., T. J. Manaco, and C. M. Peele (1984) Bentazone selectivity in hot pepper (*Capsicum chinense*) and sweet pepper (*Capsicum annuum*). *Weed Science* 32:243~246.

Bethlenfalvay, G. J., R. F. Norris, and D. A. Phillips (1979)

- Effect of bentazone, a Hill reaction inhibitor, on symbiotic nitrogen-fixing capability and apparent photosynthesis. *Plant Physiol.* 63:213~215.
- Codex Alimentarius Commission (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.
- Connelly, J. A., M., D. Johnson, J. W. Gronwald, and D. L. Wyse (1988) Bentazone metabolism in tolerant and susceptible soybean (*Glycine max*) genotypes. *Weed Science* 36: 417~423.
- 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.
- Franklin R. K., L. H. Shen, and O. H. Ahmed (2010) Incorporation of bentazone with *Exserohilum rostratum* for controlling *Cyperus iria*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5(2):210~214.
- 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., 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.
- Müller, I. B., H. W. Petersen, S. S., Johansen, and P. Theiade (2003) Fetal overdose of the herbicide bentazone. *Forensic Science International* 135:235~236.
- US FDA (1999) 'Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multi residue Methods (3rd ed.), US Food and Drug Administration, USA.
- Vink, M. and van der poll, J. M. (1996) Gas chromatographic determination of acid herbicide in surface water samples with electron-capture detection and mass spectrometric confirmation, *J. Chromato. A* 733:361~366.
- Zabkiewicz, J. A., and W. A. Forster (2003) Development of silple model for agrichemical uptake into plant foliage. *New Zealand Plant Protection* 56:61~65.
- 노석초, 황철환, 유기용, 한성수 (2007) pH조절 분배추출에 의한 식물체 중 methoxyfenozide와 bentazone의 HPLC 분석. *환경농학회지* 26(3):246~253.
- 박태선, 문병철, 조정래, 김창석, 김무성, 김길웅 (2004) Sulfonyurea계 제초제 저항성 물옥잠의 조기진단과 방제. *농약과학회지* 8(1):63~70.
- 박태선, 강동균, 김길웅 (2005) Sulfonyurea계 제초제 저항성 올챙이꼬랭이(*Scirpus juncoides* Roxb.)의 제초제 반응과 방제. *농약과학회지* 9(3):250~261.
- 식품의약품안전청 (2009) *식품공전*.
- 이영득 (2011) *식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서*, 식품의약품안전청.
- 정영호, 김장익, 김정환, 이영득, 임치환, 허장현 (2000) *최신 농약학*. p. 236
- 황기환, 김도순, 이종남, 구석진 (2006) Flucetosulfuron+pyrazo-sulfuronethyl 합제의 다년생 사초과 및 sulfonylurea계 저항성 잡초 방제효과. *농약과학회지* 10(4):320~328.

HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 bentazone의 분석법 확립

김영학 · 이수진 · 송이슬 · 황영선 · 이영득¹ · 정명근*

강원대학교 생약자원개발학과, ¹대구대학교 생명환경학부

요 약 HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 중 benzothiadiazole계 선택적 접촉 제초제인 bentazone의 잔류분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 인산용액으로 pH를 1로 조절한 acetone을 가하여 추출하였고, bentazone의 잔류분은 dichloromethane 액-액 분배법과 florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다. Bentazone의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건을 확립하였고, C₁₈ 칼럼을 이용한 HPLC 분석 시 불순물의 간섭은 없었으며, 대표 농산물 중 bentazone의 분석정량한계(LOQ)는 0.02 mg/kg 이었다. 전체 농산물에 대해 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과 모든 처리 농도에서 82.0~97.9% 수준을 나타내었으며, 농산물 시료 및 처리수준에 관계없이 10%미만의 분석오차를 나타내어 잔류분석 기준이내를 만족하였다. 본 연구에서 확립한 benzothiadiazole계 제초제인 bentazone의 잔류분석법은 검출 한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인과정 및 회수율 검증의 결과를 종합해 볼 때 분석과정의 편이성 및 신뢰성이 확보된 공정분석법으로 사용이 가능 할 것으로 판단된다.

색인어 bentazone, HPLC-UVD/MS, 작물분석, 잔류분 분석