Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2018;37(1):57-65. Korean
Published online 2018 March 30. https://doi.org/10.5338/KJEA.2018.37.1.05

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

주요 농산물 중 Bezenesulfonamide계 살균제 Flusulfamide의 잔류 분석법

안경근[1], 김기쁨[1], 황영선[2], 강인규[3], 이영득[4], 정명근[1*]

[1]강원대학교 생약자원개발학과, [2]텍사스주립대학교 생물학과,
[3]경북대학교 원예과학과, [4]대구대학교 생명환경학부

Analytical Method for Flusulfamide as Benzenesulfonamide Fungicide, Residues in Major Agricultural Commodities

Kyung-Geun Ahn[1], Gi-Ppeum Kim[1], Young-Sun Hwang[2], In-Kyu Kang[3], Young Deuk Lee[4] and Myoung-Gun Choung[1*] ([1]Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea, [2]Department of Biology, University of Texas-Arlington, Arlington, TX 76019, USA, [3]Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea, [4]Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea)

Received: 31 January 2018 / Revised: 22 March 2018 / Accepted: 26 March 2018

ORCID
Myoung-Gun Choung
http://orcid.org/0000-0002-4391-5513

Abstract

BACKGROUND: An analytical method was developed using HPLC-UVD/MS to precisely determine the residue of flusulfamide, a benzenesulfonamide fungicide used to inhibit spore germination.
METHODS AND RESULTS: Flusulfamide residue was extracted with acetone from representative samples of five raw products which comprised apple, green pepper, Kimchi cabbage, hulled rice, and soybean. The extract was diluted with large volume of saline water and directly partitioned into dichloromethane to remove polar co-extractives in the aqueous phase. For the hulled rice and soybean samples, *n*-hexane/acetonitrile partition was additionally employed to remove non-polar lipids. The extract was finally purified by optimized Florisil column chromatography. On an octadecylsilyl column in HPLC, flusulfamide was successfully separated from co-extractives of sample, and sensitively quantitated by ultraviolet absorption at 280 nm with no interference. Accuracy and precision of the proposed method was validated by the recovery experiment on every crop sample fortified with flusulfamide at 3 concentration levels per crop in each triplication.
CONCLUSION: Mean recoveries ranged from 82.3 to 98.2% in five representative agricultural commodities. The coefficients of variation were all less than 10%, irrespective of sample types and fortification levels. Limit of quantitation (LOQ) of flusulfamide was 0.02 mg/kg as verified by the recovery experiment. A confirmatory method using LC/MS with selected-ion monitoring technique was also provided to clearly identify the suspected residue.

Key words: Flusulfamide, HPLC-UVD/MS, Residue

*Corresponding author: Myoung-Gun Choung
Phone: +82-33-540-3321; Fax: +82-33-540-3329;
E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr

서 론

Flusulfamide (2',4-dichloro-α,α,α-trifluoro-4'-nitro-m-toluenesulfonanilide; Fig. 1)는 1992년 일본에서 최초 등록된 benzenesulfonamide계 살균제이며(Kramer *et al.*, 2011), 주로 균류의 포자 발아를 억제하여 살균 효과를 나타내고, 배추 무사마귀병, 모잘록병, 리족토니아병 및 푸사리움병을 방제하기 위해 토양처리제로도 사용된다(Kidd and

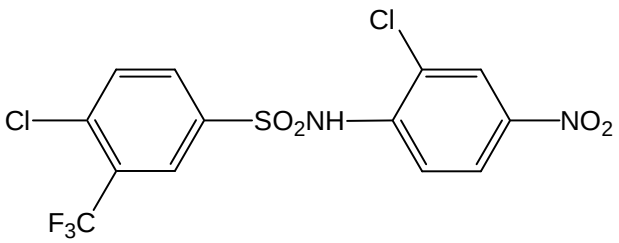

Fig. 1. Chemical structure of flusulfamide.

David, 1991; Tanaka *et al.*, 1999).

국내에서는 주로 배추와 갓의 뿌리 혹병 및 밑둥 썩음병의 방제에 사용되며(Korea Crop Protection Association, 2015), 배추와 엇갈이배추의 농약잔류허용기준(Maximum Residue Limits; MRL)은 0.05 mg/kg로 설정되어 있다(Ministry of Food and Drug Safety, 2014).

Flusulfamide의 물리화학적 특성을 살펴보면 *n*-octanol/water 분배계수 (Log Pow)는 2.8로 중간 극성인 화합물이고, 녹는점은 170-172.5℃이며, 분자량은 415.17 ($C_{13}H_7Cl_2F_3N_2O_4S$)로 황색의 분말 형태이다(Kramer *et al.*, 2011). 다양한 유기용매에 잘 녹으며 (acetone 314.0 g, chloroform 17.0 g, ethyl acetate 125.0 g, methanol 24.0 g, tetrahydrofuran 592.0 g/L), 물에 대한 용해도는 극히 낮아 2.9 mg/L에 불과하다(Kramer *et al.*, 2011).

Benzenesulfonamide계 살균제인 flusulfamide의 잔류분석은 GC/MS (Gas chromatograph-mass spectrometry) 및 GC-ECD/MS (Gas chromatograph-electron capture detector/mass spectrometry)를 이용한 분석법이 보고된 바 있으나(Chou *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2009), 다성분 분석 및 SPE (Solid phase extraction) 정제과정의 적용으로 인해 재현성과 정제도 등이 불량할 우려가 있다. 또한, HPLC-UVD (High performance liquid chromatograph-ultra violet detector) 혹은 LC-MS (Liquid chromatograph-mass spectrometry)를 이용해 분석한 결과도 있으나(Yoshii *et al.*, 2000; Kitayama *et al.*, 2002), 선행 연구결과는 검출파장의 최적화가 이루어지지 않았거나, LC-MS를 이용한 다성분 분석법으로 용매구배법을 적용하여 분석한 결과로 특정 개별성분의 정량적 재현성이 불량할 수 있다. 아울러, 실제 농산물을 대상으로 대상농약의 분석조건 확립 및 회수율 등이 체계적으로 검토된 결과는 극히 제한적인 실정이다.

따라서 본 연구에는 benzenesulfonamide계 살균제인 flusulfamide를 대상으로 다양한 농산물에 적용 가능하며, 정확성 및 정밀성이 확보된 신규 분석체계를 확립하여 국내 잔류농약 검사의 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

본 연구에 사용된 flusulfamide의 분석용 표준품은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany)로부터 순도 97.0% 이상인 것을 구입하여 사용하였다. 표준품을 methanol에 용해하여 1,000 mg/L의 농도가 되도록 조제한 stock solution을 -20℃의 냉동고에 보관하면서 필요 시 acetonitrile로 희석하여 사용하였다. J. T. Baker (USA)사에서 구입한 Florisil (60-100 mesh)은 130℃에서 하루 이상 가열하여 활성화한 후 사용하였다. 초순수의 경우 J. T. Baker (USA)에서 HPLC용을 구입하여 사용하였으며, acetone, *n*-hexane, dichloromethane, methanol 및 acetonitrile는 잔류분석용을, 기타 유기용매 및 시약은 시약특급 혹은 잔류분석용을 사용하였다. 감압농축기는 Eyela NE-1000SW (Japan)를 이용하였고, 시료의 균질화는 고속 호모게나이져 (IKA, Ultra-Turrax T-25, USA)를 사용하였다.

농산물 시료

국내 농약 잔류허용기준(Ministry of Food and Drug Safety, 2014) 중 flusulfamide의 사용이 등록 되어있는 농산물, 식품 소비량 및 Codex의 잔류분석법 대상 대표 농산물군(Codex, 2003) 등을 종합적으로 고려하여 과일류는 사과, 채소류는 배추 및 고추, 곡류는 현미, 두류에서는 콩을 대표 농산물로 선정하였다(Lee *et al.*, 2010). 유기농으로 인증된 사과, 배추, 고추, 현미 및 콩의 무농약 시료를 지역의 대형마트에서 구입하여 식품공전 상의 검체 처리방법(Ministry of Food and Drug Safety, 2012)에 따라 전처리 후 사용하였다. 대조 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인하였다.

HPLC-UVD/MS 기기분석 조건

Flusulfamide는 분자구조 내에 sulfonamide기를 포함하고 있어 휘발성이 낮고 고온에서의 열분해 가능성이 있으므

Table 1. HPLC-UVD operating parameters for the analysis of flusulfamide

Instrument	Agilent 1200 HPLC system
Detector	Ultra violet detector (UVD)
Column	YMC-Pack Pro C_{18} RS (4.6×250 mm, 5 μm)
Column temp.	40℃
Mobile phase	Acetonitrile/0.5% formic acid-water (80/20, v/v)
Flow rate	0.8 mL/min
Wavelength	UV 280 nm
Sample size	20 μL

Table 2. LC/MS operating parameters for the confirmation of flusulfamide

Instrument	Agilent 6110 Quadrupole LC/MS
Column	YMC-Pack Pro C_{18} RS (2.0×150 mm, 3 μm)
Column temp.	40℃
Mobile phase	Acetonitrile/0.5% formic acid-water (80/20, v/v)
Flow rate	0.8 mL/min
Sample size	10 μL
Ionization	Electrospray ionization (ESI), negative-ion mode
Drying gas	N_2, 10.0 L/min
Gas temp.	350℃
Capillary voltage	3.0 kV
Mass range (*m/z*)	200~600

로 GLC (Gas-Liquid Chromatography) 분석이 곤란하여 HPLC를 이용하고자 하였으며, 분자구조 내 sulfonamide기와 conjugation system이 있음을 고려할 때 비교적 장파장의 자외흡광이 예상되므로 검출기는 자외흡광검출기 (ultra violet detector; UVD)를 이용하였다. HPLC는 UVD를 장착한 Agilent (USA) 1200 series를 이용하였고, 분리용 column은 YMC-Pack Pro C_{18} RS (4.6×250 mm, 5 μm)를 사용하였다. 잔류분의 재확인을 위한 LC/MS (Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry) 분석에는 Agilent (USA) 6110 Quadrupole LC/MS를 사용하였으며, 각각의 자세한 분석조건은 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

표준검량선 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

Flusulfamide의 stock solution을 재희석하여 0.05-10 mg/L의 농도가 되도록 working solution을 조제하고, 각 20 μL씩 HPLC에 주입하여 분석된 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다. 또한, 분석기기의 재현성(reproducibility)을 검증하기 위해 0.5 mg/L 수준의 flusulfamide 표준용액을 HPLC에 15회 연속 주입 후 크로마토그램에서의 retention time (Rt.)과 peak area의 변이를 비교, 평가하였다.

분석정량한계는 무농약의 농산물 시료로부터 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 뒤, 분석기기의 정량한계 및 시료량, 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 아래의 계산식에 의해 산출하였고(Ahn *et al.*, 2014), 동일 수준으로 flusulfamide를 처리하여 회수율을 검토하였다.

정량한계(mg/kg)=[기기 정량한계(ng)/주입량(μL)] × [시료용액(mL)/시료량(g)]

시료의 추출 및 분배

25 g의 각 농산물 시료에 acetone 100 mL를 가하고 (콩 및 현미시료의 경우 추출 30분 전 미리 20 mL의 증류수를 가하여 습윤화 함) 호모게나이저를 이용하여 2분 동안 고속마쇄(12,000 rpm) 추출하였다. 추출물은 여과지(Toyo No. 6, Japan)를 장착한 Büchner funnel 에서 여과하고, 시료와 호모게나이저 컵을 acetone 40 mL로 다시 세척하여 앞서의 여과액과 합쳤다. 합한 추출액을 1 L 용량의 분액 깔때기에 옮겨 담고 포화식염수 50 mL 및 증류수 450 mL를 첨가한 후 액-액 분배법의 분배용매로는 *n*-hexane, 2종의 *n*-hexane/dichloromethane 혼합액 및 dichloromethane의 4종을 공시하여 대상 성분에 대한 분배효율을 검토하였고, 액-액 분배조건에 의한 대상 성분의 분배효율을 확인한 결과 최종적으로 가장 우수한 것으로 확인된 dichloromethane으로 50 mL씩 2회 분배 추출하였다. 합친 dichloromethane 추출액을 무수 황산나트륨에 통과시켜 탈수한 후 40℃에서 감압 농축 및 건고하였다. 현미 및 콩을 제외한 시료의 잔류물은 *n*-hexane/dichloromethane (90/10, v/v) 10 mL에 재용해하여 Florisil 흡착 크로마토그래피에 직접 공시하였다. 한편 고 유지 시료로 평가되는 현미 및 콩 시료의 경우 잔류물을 미리 acetonitrile을 포화시킨 *n*-hexane 40 mL에 재용해하여 250 mL 용량의 분액여두에 옮기고 미리 *n*-hexane을 포화시킨 acetonitrile 40 mL씩으로 2회 분배 추출하였다. 합친 acetonitrile 추출액을 40℃에서 감압 농축, 건고하고 잔류물을 *n*-hexane/dichloromethane (90/10, v/v) 10 mL에 재용해하여 Florisil 흡착 크로마토그래피에 공시하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피

잔류농약 분석 시 정제과정에 가장 많이 이용되는 방법으로는 흡착크로마토그래피법을 들 수 있으며, 본 연구에서는 Florisil을 흡착제로 선택하였고, 활성화시킨 Florisil 10 g을 40×1.5 cm의 칼럼에 건식 충전하고, 그 위에 3 g의 무수 황산나트륨을 첨가한 후 용매의 극성 조절을 위해 *n*-hexane/acetone의 용매체계를 이용하여 Florisil 흡착 크로마토그래피의 조건을 최적화 하였다. 즉, 다양한 용매의 극성조절 시험결과에 의해 최적으로 평가된 결과는 *n*-hexane 50 mL를 가하여 칼럼을 세척한 후 *n*-hexane/dichloromethane (90/10, v/v) 10 mL에 녹인 시료 용액을 가하고 약 3 mL/min의 유속으로 흘려버리고, 충전제의 표면이 노출되기 전 다시 *n*-hexane/acetone (75/25, v/v) 100 mL를 첨가하여 용출시켜 폐기하고, 다시 *n*-hexane/acetone (60/40, v/v) 150

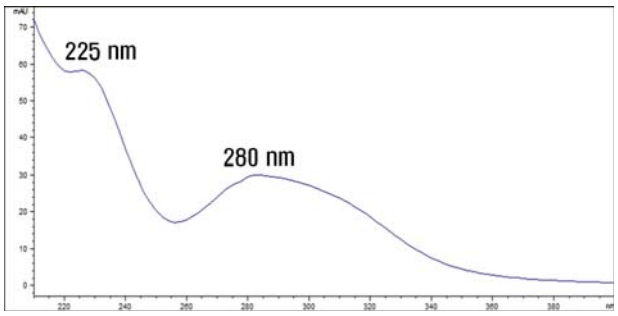

Fig. 2. UV absorption spectrum of flusulfamide.

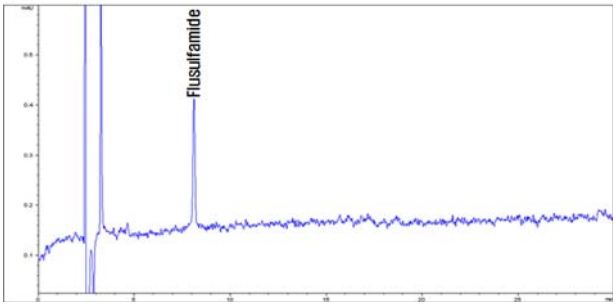

Fig. 3. Chromatogram of flusulfamide standard solution (20 μL of 0.05 mg/L in acetonitrile).

mL로 용출시켜 flusulfamide 성분을 회수하는 방법이었다. Flusulfamide가 용출된 분획은 40℃에서 감압 농축하고 잔류물을 acetonitrile 10 mL에 재용해하여 HPLC 분석의 시료로 사용 하였다.

Flusulfamide의 회수율 검증

본 연구에서 확립한 flusulfamide의 잔류분석법에 대한 신뢰성 및 효율의 검증을 위해 실제 농산물 시료를 이용한 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 마쇄한 25 g의 각 대표 농산물 무농약 시료에 대한 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배에 해당하는 flusulfamide 표준용액을 각각 3반복으로 처리 후 상기의 분석과정을 수행하여 회수율과 분석오차를 측정하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건의 확립

Flusulfamide의 최적 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 acetonitrile에 용해한 5 mg/L의 표준용액을 on-line HPLC/DAD를 이용하여 190-400 nm 범위에서 최대흡수파장(λ max)을 조사하였다. 흡수파장은 225 nm 및 280 nm에서 관찰되었으며(Fig. 2), flusulfamide의 흡수파장 중 225 nm는 흡광계수가 가장 높아 분석 감도는 높게 관찰되나, 시료 중 함께 추출되는 메트릭스 성분의 흡광 및 용매의 자외선 흡광(UV cut-off) 등 이 예상되므로 상대적으로 시료 추출물 및 이동상 용매에 의한 간섭 정도가 낮아 flusulfamide 분석의 선택성이 우수한 225 nm 대비 장파장인 280 nm를 검출파장으로 설정하였다.

HPLC 분석의 분리용 column은 C_{18}계열의 YMC-Pack Pro C_{18} RS (4.6×250 mm, 5 ㎛)를 이용하였다. 이동상 중 acetonitrile의 농도를 달리하여 머무름시간 및 peak의 이론단수 등을 검토한 결과, acetonitrile/0.5% formic acid-water (80/20, v/v) 혼합용액의 등용매용리(isocratic) 조건에서 머무름 시간과 분리도 측면에서 가장 적합한 양상을 나타내었으며(Fig. 3), 이때 flusulfamide의 머무름시간은 8.3분이었다. 분리능 및 감도를 향상시키기 위해 용매구배법(gradient elution)을 사용할 수 있으나, 이 경우 분석시간이 지연될 수 있고, 머무름시간의 재현성이 isocratic 조건에 비해 상대적으로 열등할 수 있다. 따라서 본 분석법 개발의 목적이 단시간 내에 효율적 분석이 수행 가능한 일상적 공정 분석용이므로 분석법의 재현성 및 안정성 측면에서 보다 유리한 isocratic 조건을 선정하였다.

분석기기의 정량한계 설정을 위해 상기에서 확립한 HPLC 분석조건(Table 1)으로 flusulfamide 표준용액을 분석한 후 S/N 비를 산출한 결과, 기기상의 정량한계(S/N≥10)는 1 ng 이었다. 한편, 기기분석 시의 안정성 및 재현성을 평가하기 위해 0.5 mg/L의 표준용액을 15번 연속 주입, 분석하여 머무름시간(retention time) 및 peak 면적(peak area)의 변이계수(CV, %)를 확인하여 분석기기의 재현성을 평가한 결과, 두 크로마토그래피 척도 모두에서 최대 0.88%의 오차를 나타내어 기기분석 시 재현성 있고 안정적인 분석이 가능함을 확인하였다(Table 3).

한편, 농도별로 조제한 flusulfamide의 표준용액 (0.05-10 mg/L)을 각각 20 μL씩 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 y=38.4885×-0.1730 (R^2=0.999**)로 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 4). 즉, flusulfamide는 기

Table 3. Reproducibility of peak area and retention time of flusulfamide using HPLC-UVD

Parameter	Retention time (min)	Peak Area (mAU)
Minimum	8.235	19.8
Maximum	8.392	20.3
Mean	8.307	20.1
SD	0.05	0.18
CV (%)	0.59	0.88

*Abbreviations : SD, standard deviation; CV, coefficient of variance.

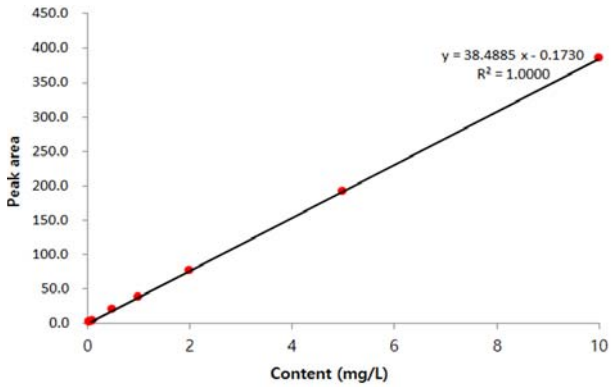

Fig. 4. Calibration curve of flusulfamide in HPLC.

기 정량한계 수준인 1 ng에서부터 그 200배인 200 ng까지의 표준검량선에 대한 회귀계수가 R^2=0.999** 이상으로 정량의 직선성이 우수하였으므로, 광범위한 범위의 농도에서 시료 내 잔류량을 비례적으로 산출하는 것이 가능하였다.

시료 추출 및 분배과정의 확립

농산물 시료 중 flusulfamide 성분은 acetone을 이용하여 추출하였다. Acetone은 비극성 및 중간극성 농약의 추출에 흔히 사용되는 표준적인 용매로써 이미 수많은 연구자들에 의해 농약 추출에 대한 효율성 및 재현성이 인정된 바 있다.

농산물의 추출액에서 대상 성분 외에 추가적으로 함께 추출되는 방해물질을 제거하기 위한 1차적 조정제법으로는 액-액 분배법을 적용하였다. 즉, 수용성의 유기용매 추출액에 다량의 증류수/포화식염수를 첨가하여 희석한 후 직접 비극성 유기용매로 분배 및 추출하는 방법을 사용하였는데, 이는 US FDA법이나 AOAC법에서 중간-비극성 농약 성분에 보편적으로 사용되는 방법이며, 추출액을 농축하는 번거로운 과정을 생략할 수 있는 장점이 있다(AOAC, 2000; Lee *et al.*, 2008).

액-액 분배법의 분배용매로는 *n*-hexane, 2종의 *n*-hexane/dichloromethane 혼합액 및 dichloromethane의 4종을 공시하여(Lee *et al.*, 2011), 대상 성분에 대한 분배효율을 검토하였다(Table 4). 액-액 분배조건에 의한 대상 성분의 분배효율을 확인한 결과, 100 mL의 *n*-hexane으로 분획하였을 때 flusulfamide의 회수율은 33.2% 수준으로 극히 낮았으며, 100 mL의 *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v)으로 분획하였을 때의 회수율은 88.7%, 100 mL의 *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v)으로 분획하였을 때는 95.9%, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때는 98.1%를 나타내었다. 즉, 분배용매의 극성 강도를 높임에 따라 대상농약의 회수율이 현저히 높아지는 양상을 확인하였으며, 가장 우수한 회수율을 나타낸 dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하는 조건(분배용매 Ⅳ)을 flusulfamide 분배용매로 선정하였다.

Dichloromethane 용액을 이용한 액-액 분배과정을 통해 추출 시료 내 포함되어 있는 상당량의 비극성 혹은 극성물질 및 기타 방해물질이 제거되었으리라 예상은 되지만, 유지성분은 dichloromethane 층으로 대상성분과 함께 분배되므로 제거되지 않는다. 추출시료에 존재하는 유지성분은 HPLC 분석 시 분리용 column의 분리능 저하, 기준선의 심각한 변화(baseline shift and drift) 및 압력 상승 등 을 초래하므로 반드시 제거해야 할 간섭물질 중 하나일 것이다. 본 연구의 대상 농산물 중 현미와 콩은 유지성분이 각각 1-3% 및 20% 수준 포함하고 있는 시료이므로 이런 유지성분의 제거를 위해 *n*-hexane/acetonitrile 액-액 분배법을 추가하였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000). Table 5에 나타낸 것과 같이 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile을 이용하여 2회 분배하였을 시 flusulfamide가 98.8% 수준으로 회수 가능하였으므로, 유지성분 및 비극성 간섭물질을 제거하기 위한 *n*-hexane/acetonitrile 분배법은 분배조건 Ⅰ로 설정하였다. 한편, 대상 시료 중 유지성분의 함량이 0.1-0.4%로 비유지 시료에 해당하는 사과, 고추 및 배추에서는 정제의 효과가 미미하였으므

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

Compound	Recovery (%)[1]			
	Partition I[2]	Partition II	Partition III	Partition IV
Flusulfamide	33.2 ± 3.0	88.7 ± 1.1	95.9 ± 0.2	98.1 ± 0.1

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

Table 5. Efficiency of *n*-hexane/acetonitrile partition for flusulfamide

Compound	Recovery (%)[1]	
	Partition I[2]	Partition II
Flusulfamide	98.9±0.5	99.6±0.4

[1] Mean values of triplicate samples.
[2] Partition mixture : 40 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile.
I, 40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (×2 times), II, 40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (×3 times).

Table 6. Elution profile of flusulfamide on Florisil column chromatography

Elution solvent (v/v)	Recovery (%)[1]			
	0-50 mL	51-100 mL	101-150 mL	Total
75 : 25[2]	0.0	0.0	0.0	0.0
70 : 30[3]	1.4	4.4	7.0	12.8
65 : 35[3]	9.3	29.0	43.0	81.3
60 : 40[3]	39.2	53.2	2.6	95.0

[1] 10 g of activated Florisil (60-100 mesh) was packed with solvent.
[2] *n*-Hexane/acetone (v/v).
[3] Pre-washed with 100 mL of [2] solvent system, and then eluted *n*-hexane/acetone (v/v).

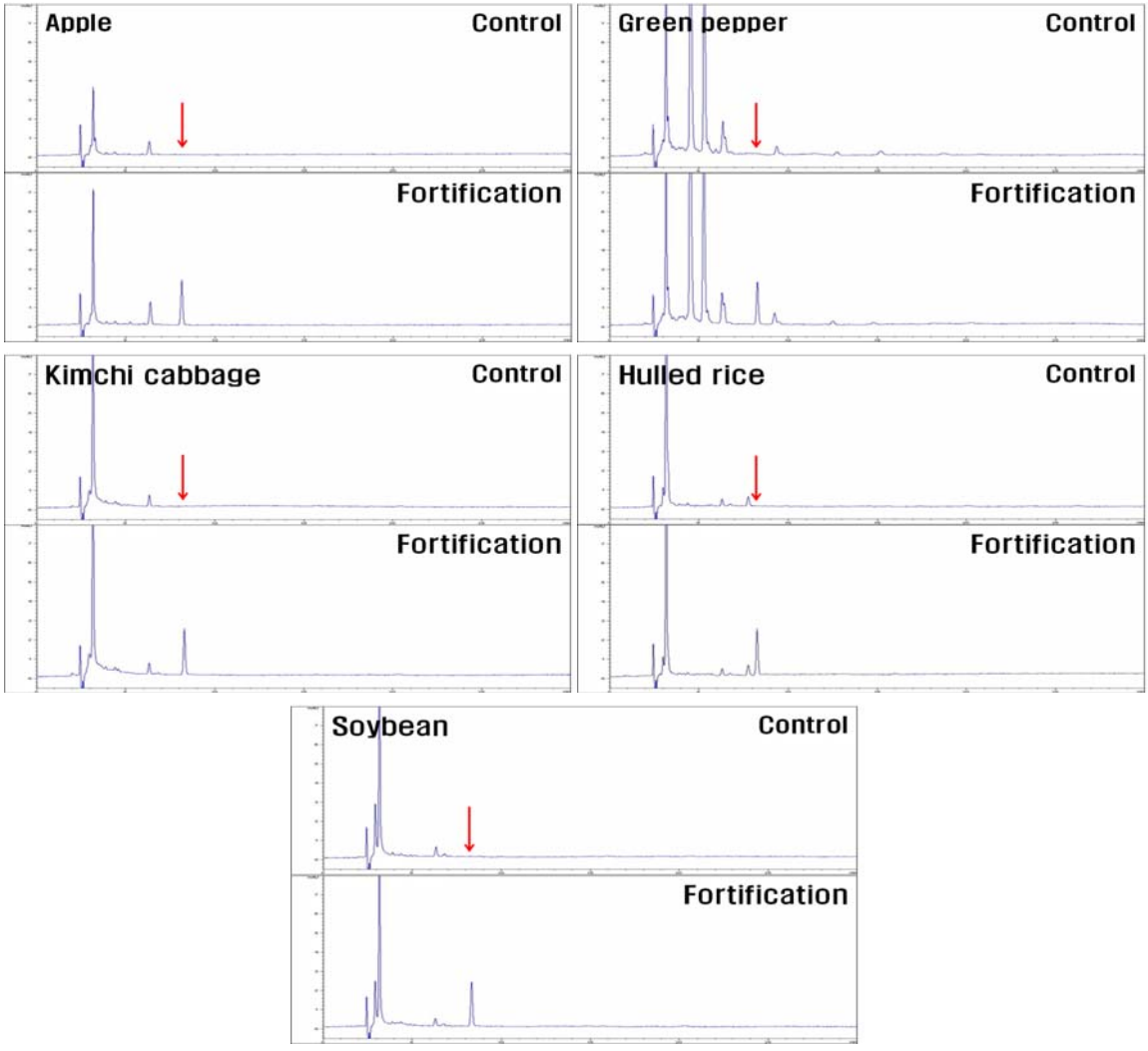

Fig. 5. HPLC chromatograms of typical agricultural commodity extracts for the analysis of flusulfamide.

로 *n*-hexane/acetonitrile 액-액 분배과정을 생략하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건의 최적화

농산물에 포함된 flusulfamide의 잔류분석 시 상기의 액-액 분배과정과 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정으로 인해 대부분의 불순물 및 비극성 간섭물질이 제거되었으리라 판단되지만 각각의 농산물 시료에 따라 유래되는 상이한 기타 불순물들이 존재하므로, 추가적 정제과정이 필요하다고 판단되어 흡착크로마토그래피에 의한 정제법을 추가 검토하였다. 본 연구에서는 Florisil을 흡착제로 선택하였고, 용매의 극성 조절을 위해 *n*-hexane/acetone의 용매체계를 이용하여 최적화하였다(Table 6). 극성을 다양하게 조절한 Florisil 흡착크로

Table 7. Recoveries of flusulfamide with different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery (%)[1)]	CV (%)	LOQ (mg/kg)
Apple	0.02	91.4±3.0	3.3	0.02
	0.2	91.2±1.0	1.1	
	1	91.1±0.9	0.9	
Kimchi cabbage	0.02	90.5±4.8	5.3	0.02
	0.2	93.0±1.0	1.1	
	1	92.7±0.8	0.8	
Green pepper	0.02	82.3±0.0	0.0	0.02
	0.2	88.4±1.8	2.0	
	1	93.5±0.9	1.0	
Hulled rice	0.02	91.4±6.0	6.5	0.02
	0.2	93.9±2.7	2.8	
	1	95.3±1.4	1.4	
Soybean	0.02	98.2±6.1	6.2	0.02
	0.2	89.2±0.8	0.9	
	1	92.6±1.5	1.6	

[1)] Mean values of triplicate samples with standard deviations.

마토그래피용 용매체계를 이용하여 flusulfamide의 회수율을 검토한 결과, *n*-hexane/acetone (75/25, v/v) 100 mL로 pre-washing한 후, *n*-hexane/acetone (60/40, v/v) 150 mL로 용출할 경우 flusulfamide 성분의 회수율이 95.0%로 검토된 용매체계 중 가장 우수한 회수율을 나타내었다. 따라서 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거를 위한 추가적인 정제법은 상기의 방법과 같이 적용하였다.

농산물 시료 중 flusulfamide의 분석 정량한계 및 회수율

Fig. 5는 본 연구에서 확립한 시료의 추출, 정제 및 기기분석 과정을 무농약 농산물 대표 시료에 적용한 결과이다. 최종 무농약 농산물 시료용액에서 대상농약 성분과 동일한 머무름 시간대에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였으며, 분석기기의 정량한계 (LOQ)와 시료량 및 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 본 분석법의 정량한계를 산출하였다.

본 연구에서 산출된 flusulfamide의 정량한계는 0.02 mg/kg이었으며, 국제기준인 Codex(Codex Alimentarius Commission, 2003)와 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(Lee, 2017)에서 제안하는 잔류농약 분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 허용기준의 1/2 이하의 정량한계 기준을 만족하였다.

각 농산물의 무처리 시료에 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배의 flusulfamide 표준용액을 인위 첨가하고, 상기에서 확립한 분석방법에 따라 대표 농산물을 3반복으로 분석하여 회수율을 검토한 결과, 정량한계 수준에서는 82.3-98.2%, 정량한계 10배 수준에서는 88.4-93.9%, 정량한계 50배 수준에서는 91.1-95.3%의 양호한 회수율을 확인하였고, 재현성 역시 양호하여 분석오차는 최대 6.5%로 조사되었다. 따라서, 대상 성분의 처리농도와 농산물 시료의 종류에 관계없이 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하는 결과를 도출하였다(Table 7).

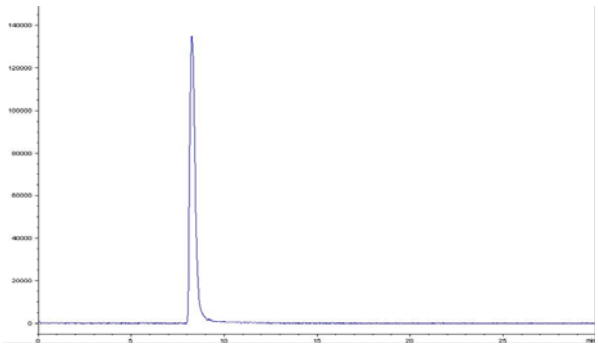

Fig. 6. Total-ion chromatogram (TIC) of flusulfamide in LC/MS.

이상의 결과를 종합적으로 볼 때, 본 연구에서 확립된 flusulfamide 분석법은 국내 외 농산물의 잔류농약 분석 및 검사에 활용 가능함을 확인하였다.

LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

본 연구에서 검토된 flusulfamide 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해 LC/MS에 의한 재확인 과정을 추가 검토하였다. LC/MS 분석 시 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다(Kwon *et al.*, 2008).

본 연구에서 Flusulfamide의 HPLC/UVD 분석에 이용

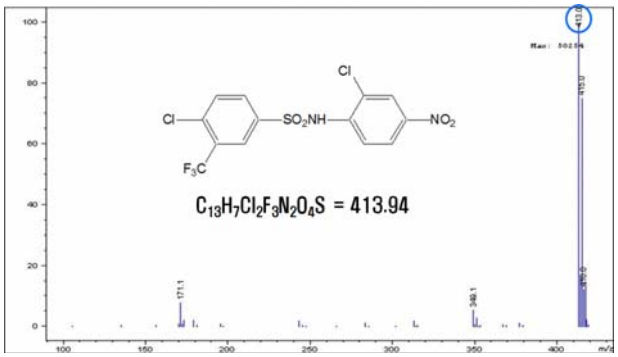

Fig. 7. ESI (-) mass spectrum of flusulfamide.

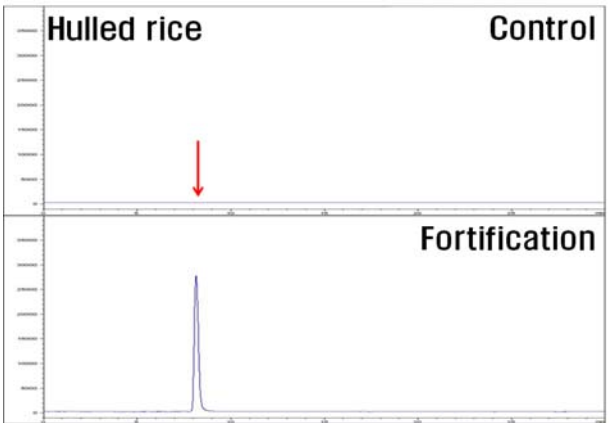

Fig. 8. SIM chromatogram of hulled rice extract for the confirmation of flusulfamide.

한 이동상 용매인 acetonitrile/0.5% formic acid-water 혼합용매에는 이미 formic acid가 함유되어 있어 LC/MS에서도 동일한 이동상 용매를 이용하여도 이온화가 잘 이루어져 추가적인 이온화 증진 방법이 필요치 않았으므로, HPLC/UVD 분석에 적용한 이동상 용매 조건을 LC/MS에도 동일하게 적용하였다. Fig. 6과 7에 나타낸 TIC (total-ion chromatogram) 및 mass spectrum으로부터 flusulfamide는 ESI (electrospray ionization) negative ion 조건에서 용이하게 $[M-H]^-$인 *m/z* 413.0을 형성함을 알 수 있었다. 본 연구의 결과에서 flusulfamide의 $[M-H]^-$ peak가 base peak로 나타나므로 selected-ion monitoring (SIM)용 ion으로는 $[M-H]^-$인 *m/z* 413.0 ion만을 이용하여도 충분한 정성적 확인이 가능하였다(McLafferty and Turecek, 1993; Ardrey, 2003).

Fig. 8은 본 실험에 사용된 대표적 농산물 시료 중 flusulfamide의 잔류분을 재확인한 SIM (selected-ion monitoring) chromatogram이며, 본 실험에서 사용된 모든 대표 농산물의 무처리 시료에서 대상 농약성분의 peak가 전혀 관찰되지 않았고, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 정확하게 flusulfamide의 잔류분만을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 검토된 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC/UVD를 이용한 정량법과 더불어 flusulfamide 잔류분의 추가적 정성분석법으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 benzenesulfonamide계 살균제 flusulfamide의 잔류 분석법을 확립하였다. 대표 농산물은 사과, 고추, 배추, 현미 및 콩을 적용하였고, acetone에 의해 추출된 flusulfamide 성분을 dichloromethane 액-액 분배법과 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 HPLC-UVD/MS의 분석시료로 사용하였다. Flusulfamide의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC-UVD 분석 조건을 검토하였으며, 정량한계(LOQ)는 0.02 mg/kg 이었다. 각 대표 농산물에 대해 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과, 모든 처리농도에서 82.3-98.2% 수준의 회수율을 나타내었고, 반복간 변이계수(CV)는 최대 6.5%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 만족한 결과를 도출하였고, LC/MS/SIM을 이용하여 실제 농산물 시료에 적용하여 재확인 하였다. 이상의 결과로 신규 flusulfamide의 HPLC-UVD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용 가능할 것이다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea (Project No. 16162MFDS020), and 2017 Research Grant from Kangwon National University, Republic of Korea (No. 620170121).

References

Ahn, K. G., Kim, G. H., Kim, G. P., Kim, M. J., Hwang, Y. S., Hong, S. B., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2014). Determination of amisulbrom residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS, Korean Journal of Pesticide Science, 18(4), 321-329.

Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, pp. 98-122, West Sussex, UK.

Chou, C. P., Lee, M. Y., Li, H. P., Wong, S. S., & Li, G. C. (2004). Flusulfamide residue detection in Chinese kale and cabbage, Journal of Food and Drug Analysis, 12(2), 140-145.

Kidd, H., & David, R. J. (1991). *The Agrochemical Handbook*, 3rd ed. Cambridge, U.K.

Kitayama, K., Nagayama, T., Takano, I., Kobayashi, M.,

Tomizawa, S., Tamura, Y., Tateishi, Y., Kimura, N., & Saito, K. (2002). Study on clean-up for determination of flusulfamide in agricultural products, The Tokyo Metropolitan Research Laboratoty of Public Heath, 53, 83-86.

Kramer, W., Schimer, U., Jeschke, P., & Witschel, M. (2011). Modern crop protection compounds, p. 873, 2nd ed. WILEY-VCH, Hong Kong.

Kwon, C. H., Chang, M. I., Im, M. H., Choi, H., Jung, D. I., Lee, S. C., Yu, J. Y., Lee, Y. D., Lee, J. O., & Hong, M. K. (2008). Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. Analytical Science and Technology, 21(6), 518-525.

Lee, J. H., Park, H. W., Keum, Y. S., Kwon, C. H., Lee, Y. D., & Kim, J. H. (2008). Dissipation pattern of boscalid in cucumber under greenhouse condition, Korean Journal of Pesticide Science, 12(1), 67-73.

Lee, S. J., Hwang, Y. S., Kim, Y. H., Kwon, C. H., Do, J. A., Im, M. H., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2010). Determination of captan, folpet, captafol and chlorothanonil residues in agricultural commodities using GC-ECD/MS, Korean Journal of environment for Agricultural, 29(2), 165-175.

Lee, S. J., Kim, Y. H., Song, L. S., & Choung, M. G. (2011). Determination of ametryn residue in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS, Korean Journal of Pesticide Science, 15(2), 125-133.

Lee, Y. D. (2017). Pesticide analytical residues manual in food code, p. 79. Ministry of Food and Drug Safety, Seoul, Korea.

McLafferty, F. W., & Turecek, F. (1993). Interpretation of mass spectra, pp. 19-50, 4th ed. Sausalito, CA, USA.

Park, S. Y., Jung, J. K., Kang, J. M., Kim, S. H., Yang, J. Y., Kang, S. A., Chun, H. K., & Park, K. Y. (2009). Monitoring of 160 kinds of pesticide residues in commercial baechu (Chinese) cabbage throughout the year, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 38(7), 970-975.

Tanaka, S., Kochi, S. I., Kunita, H., Ito, S. I., & Kameya-Iwaki, M. (1999). Biological mode of action of the fungicide, flusulfamide, against Plasmodiophora brassicae (clubroot), European Journal of Plant Pathology, 105(6), 577-584.

Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Ishimitsu, S., & Tonogai, Y. (2000). Determination of bentazone, inabenfide and flusulfamide in agricultural products by HPLC and confirmation by LC/MS, National Institute of Health Science, 41(4), 268-273.