

Research Article



CrossMark

Open Access

고단백질 함유 대두와 완두 중 Propineb 잔류분석을 위한 제단백 효과

함헌주¹, 최정윤², 허장현^{2*}

¹강원대학교 친환경농산물안전성센터, ²강원대학교 농업생명과학대학 환경융합학부

Improvement of Analytical Method for Propineb Residues in *Glycine max* (L.) Merrill and *Pisum sativum* L. using Deproteinization Process

Hun Ju Ham¹, Jeong Yoon Choi² and Jang Hyun Hur^{2*} (¹Environment Friendly Agricultural Products Safety Center, Chuncheon 24341, Korea, ²Department of Biological Environment, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea)

Received: 27 August 2022/ Revised: 16 September 2022/ Accepted: 20 September 2022

Copyright © 2022 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Hun Ju Ham

<https://orcid.org/0000-0001-9816-019X>

Jeong Yoon Choi

<https://orcid.org/0000-0002-7931-6408>

Jang Hyun Hur

<https://orcid.org/0000-0003-2592-7147>

Abstract

BACKGROUND: Dithiocarbamate fungicide propineb can be analyzed quantitatively by derivatization reaction followed by HPLC/UVD, which has high reproducibility and stability. However, the presence of high protein in soybeans and peas affects the derivatization process resulting in extremely low recoveries. Therefore, this study was conducted to improve the analytical method for analysis of propineb in soybeans and peas by applying a deproteinization process using chloroform-gel method.

METHODS AND RESULTS: The deproteinization process was carried out up to 6 times for soybeans and 5 times for peas using 50 mL chloroform. After 4 times of deproteinization process followed by a derivatization reaction with methyl iodide, the recovery yields of propineb in both pulses were >90%. However, the recovery yield tended to decrease when the deproteinization process was performed more than 5 times. The method limit of quantification (LOQ) was 0.04 mg/L. The recovery conducted in triplicate at 10 times and 50 times of the LOQ ranged from 87.2 to 95.0 % with a coefficient of variation <10%.

CONCLUSION(S): This study confirmed that 4 times of deproteinization process using the chloroform-gel method was effective when derivatizing and analyzing dithiocarbamate fungicides in pulses with high protein content. However, depending on the initial protein content present in the pulses, there was a difference in the recovery: the lower the protein content, the higher the recovery rate of propineb. It is expected that the method proposed in this study could be applied to remove high content of protein as analytical interference substance from agricultural samples.

Key words: Deproteinization, Dithiocarbamate, Propineb, Protein, Pulses

서론

Dithiocarbamate계 살균제는 광범위한 병해에 예방적 효과가 있는 비침투성 유기살균제로 다양한 작물에 사용되고 있으며, 대부분 분자 내 금속원자를 함유하는 특징을 가지고 있다[1, 2]. 이러한 화학구조는 균체 내의 미량 원소를 불활성 화시키거나 효소에 함유하는 금속을 제거하여 병원균을 방제하는 것으로 알려져 있다[3]. 대표적인 dithiocarbamate계 살균제는 propineb, mancozeb, zineb, maneb, ziram, thiram 등이 상용화되어 있다[4, 5]. 이 중 금속원자인 Zn

* Corresponding author: Jang Hyun Hur
Phone: +82-33-257-6441; Fax: +82-33-259-5563;
E-mail: jhhur@kangwon.ac.kr

(아연)을 함유하고 있는 propineb는 안전한 인체독성과 함께 생산비용도 낮아 채소류와 과일류 등의 탄저병에 대한 예방적 방제를 위하여 널리 사용되고 있다[1-2, 6].

현재 propineb를 포함하는 dithiocarbamate계 살균제의 잔류분석법으로는 CS₂ gas 포집방법과 methyl iodide (CH₃I)를 이용한 유도체화 방법이 보고되고 있다[6-8]. 가장 기본적인 CS₂ 분석법은 SnCl₂/HCl시약을 가한 후 기류를 통과시키면 100°C 이상에서 분해되어 발생하는 CS₂ 가스를 발색시약에 포집하여 흡광도를 측정하는 정량법이다[5]. 이와 같은 CS₂ 총량을 포집하는 분석법은 단일 농약에 대한 성분별 정성 및 함량을 알 수 없고, 천연의 CS₂ 또는 유사 기체의 간섭으로 재현성이 떨어지는 단점이 있다[3, 4]. 이러한 단점을 보완하고자 최근에는 약알칼리성 EDTA-2Na 수용액을 이용하여 propineb를 추출한 후, methyl iodide로 유도체화 반응(methylation)을 거쳐 HPLC/UV로 분석하는 정량법이 개발되었다[9, 10]. 이 분석법은 propineb를 EDTA-2Na 작용으로 수용액에 용해하여 methyl iodide로 methylation 시킨 후 유기용매 층으로 전이하여 정량하는 유도체화 방법이다[11]. Methyl iodide (CH₃I)를 이용한 유도체화 분석법은 성분별로 유도체를 형성할 수 있어서 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS를 사용하여 정량 분석이 가능하고 재현성과 안전성이 높은 것으로 보고되고 있다[9, 12].

한편 이러한 유도체화 분석법을 적용할 때 고단백질을 함유한 두류 시료의 경우 propineb를 포함한 dithiocarbamate계 화합물의 회수율이 상당히 낮아 분석에 어려움이 보고되고 있다[7, 13-14]. 특히 propineb를 추출하기 위해 사용한 약알칼리성인 EDTA-2Na 수용액을 사용하였을 때, 두류에 함유된 과량의 단백질이 함께 추출되면서 propineb의 잔류분석 과정 중 필수적인 분석성분의 유도체화를 방해하는 것으로 추정되었다[13, 14]. 이는 두류 단백질이 pH 9에서 높은 용해도를 나타내어 대두와 완두에 함유된 단백질이 약알칼리성인 EDTA-2Na 수용액에 용해되면서 유도체화 과정 중 methyl iodide의 친핵성 치환반응(S_N2반응)을 방해하였을 것으로 판단된다[15].

본 연구에서는 두류 중 고함량의 단백질을 사전에 제거하기 위하여 유기용매인 chloroform에 의하여 변성된 단백질을 용해도가 다른 용액을 이용하여 분리 제거하는 액체-액체 추출법인 chloroform-gel method을 시도하였다[16]. 단백질이 용해된 EDTA-2Na 수용액에 chloroform을 첨가하였을 때, 소수성과 친수성을 나타내는 단백질은 소수성을 중심으로 chloroform에 용해되어 단백질이 변성되고 침전반응이 일어나는 원리를 응용하는 것이다[17]. 이러한 과정을 반복적으로 수행할 경우, 두류에 함유된 단백질이 단계적으로 제거됨으로써 methylation 반응 중 간섭영향이 줄어들어 propineb를 정량적으로 유도체화할 수 있는 것으로 판단되었다[1].

본 연구에서는 고단백 함유 두류 중 대두와 완두에 대한 propineb의 잔류분석 방법 개선을 목적으로 methylation 반응 직전에 제단백 과정을 적용하여 분석법의 효율성 및

propineb의 회수율 개선효과를 확인하고자 하였다. 본 연구를 통하여 확립된 제단백 과정을 적용한 propineb 분석법을 단백질 고함유 농산물 및 dithiocarbamate계열 농약들의 분석법 개발에 적용하여 신뢰성 있는 농산물 안전관리에 기여할 것으로 판단된다.

재료 및 방법

시약, 재료 및 기구

본 연구에 사용된 propineb의 분석용 표준품은 Sigma Aldrich 사(USA)에서 순도 68.5%인 것을 구입하여 사용하였다. 추출에 사용된 ethylenediaminetetraacetic acid-disodium (EDTA-2Na)은 Dae Jung 사(Korea), NaOH는 일본의 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Japan), L-cysteine, 1,2-propanediol은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Japan)로부터 구입하여 사용하였다. Methyl iodide는 Kanto Chemical Co., Inc. (Japan)으로부터 구입하여 사용하였으며, tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBAH)는 Sigma Aldrich 사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. Sodium sulfate anhydrous, sodium chloride anhydrous는 Dae Jung 사(Korea)로부터 구입하여 사용하였으며, amyl alcohol은 Junsei Chemical Co., Ltd. (Japan)에서 GR급을 구입하여 사용하였다. *n*-Hexane, methanol, dichloromethane, chloroform, hydrochloric acid, water는 Merck 사(Germany)에서 GR급을 구입하여 사용하였다. 전처리 시 진탕기는 Lab. Companion IS-971R (Jeio Tech, Korea)과 BV1010 (Benchmark Scientific, USA)를 사용하여 진탕하였으며, 감압유거를 위해 농축기는 Eyela NE-1001 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)를 사용하였고, 원심분리기는 Allegra X-15R (Beckman Coulter Life Sciences, USA)를 사용하였다. 본 연구에 사용한 propineb의 물리화학적 특성은 Table 1과 같다[18].

농산물 시료

시료는 고단백질인 대두(100 g 당, 36.2%)와 완두(100 g 당, 24.4%)를 선정하였다[20, 21]. 대두는 시중에서 판매되는 무농약 농산물을 구입하였으며, 완두는 농가에서 직접 수확한 무처리 시료를 사용하였다. 시료는 마쇄 후 각각 5 g씩 칭량하여 PE (Polyethylene) tube에 넣어 -20°C 이하에 냉동보관하여 분석 시 사용하였다.

표준검량선

Propineb 표준용액은 propineb 일정량을 L-cysteine 0.5 g와 0.25 M ethylenediaminetetraacetic acid-disodium (EDTA-2Na) 수용액(0.45 M NaOH 함유, pH 9.5-9.6)에 녹여 100 mg/L이 되도록 하여 stock solution을 조제하였다. 제조한 용매는 동일한 용매로 희석하여 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 제조한 이후 유도체화하여 20 µL씩 HPLC/UV로 주입, 분석하여

Table 1. Physicochemical properties and chemical structure of propineb

Propineb	
Chemical structure	
IUPAC name	Polymeric zinc 1,2-propylenebis(dithiocarbamate)
Mol. wt.	289.8
V.p. (mPa)	1.6×10^{-7} mPa (20°C)
$K_{ow} \log P$	-0.26 (propylenethiourea, main metabolite) (20°C)
Solubility	In water 0.01 g/L (20°C). In toluene, hexane, dichloromethane <0.1 g/L in DMF + DMSO >200 g/L.
Stability	Stable when Dry Decomposed by moisture in acidic and alkaline media; DT ₅₀ at 22°C, 1d. (pH 4.0), 1d. (pH 7.0), 2-5d. (pH 9.0)

얻은 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다.

분석기기

Propineb 분석은 diode array detector가 장착된 HPLC system (Dionex ultimate 3000, USA)을 이용하였으며, column은 Shiseido C₁₈ (4.6 mm I.D.×250 mm, 5.0 μm, Japan)을 사용하였다(Table 2). 잔류분 재확인용으로 분석기기는 HPLC DIONEX Ultimate 3000 (Thermo Science, USA)와 질량분석기인 TSQ Quantum ultra (Thermo Science, USA)를 사용하였다(Table 2, 3).

추출 및 유도체화

시료(대두, 완두) 5 g에 증류수 20 mL를 가하여 20분간 습윤화하였다. 이후 0.25 M ethylenediaminetetraacetic

acid-disodium (EDTA-2Na) 수용액(0.45 M NaOH 함유, pH 9.5-9.6) 80 mL에 L-cysteine 0.5 g 및 sodium chloride를 넣고 shaker를 사용하여 2,500 rpm으로 10분간 진탕-추출하였다. 추출액에 chloroform 50 mL, amyl alcohol 10 mL를 첨가하여 2,500 rpm으로 10분간 진탕한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 제단백(deproteinization)을 진행하였다. 필요 시 상기 제단백 과정을 1회~6회 까지 반복하였다(Fig. 1). 이후 상등액 10 mL를 취하여 0.41 M tetrabutylammonium hydrogen sulfate 수용액 1 mL와 1 N HCl 을 첨가하여 pH 7.5로 신속 조절한 후 유도체화 시료로 사용하였다. 용액이 담겨 있는 분액여두에 sodium chloride 5 g을 넣고 0.05 M methyl iodide가 함유된 *n*-hexane:dichloromethane (2:8, v/v) 혼합용액 30 mL를 넣어 3회 유도체화(methylation)을 진행하였으며, sodium

Table 2. HPLC/UVD operating conditions for propineb

Instrument	DIONEX Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific (USA)					
Detector	Diod array detector					
Wave length	272 nm					
Column	Shiseido C ₁₈ (4.6 mm i.d.×250 mm×5.0 μm)					
Mobil phase	Soybean			Pea		
	Min	Acetonitrile	Water	Min	Acetonitrile	Water
	0.0	20	80	0.0	15	85
	15.5	95	5	15.5	80	20
	18.0	95	5	18.0	80	20
	20.0	20	80	20.0	15	85
Flow rate	1.0 mL/min					
Injection volume	20.0 μl					
Retention time	Soybean: 12.46 min, Pea: 14.59 min					

Table 3. LC-MS/MS operating conditions for propineb

Instrument	DIONEX Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific (USA)		
Detector	TSQ Quantum Access Max, Thermo Fisher Scientific (USA)		
Column	Capcell core C18 (2.1 mm i.d.×150 mm×2.7 μm)		
Column temperature	40°C		
Mobil phase	A:B=0.1% formic acid+5 mM ammonium formate in water:0.1% formic acid in methanol		
	Time (min)	A (%)	B (%)
Mobil phase	1.5	90	10
	3.0	10	90
	6.0	10	90
	6.5	90	10
	10.0	90	10
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection Volume	1.0 μl		
Ion source	Electrospray ionization, negative mode		
Spray voltage	3,500 V		
Vaporize temperature	320°C		
Ion sweep gas pressure	1.0 unit		
Sheath gas pressure	35 unit		
Aux gas pressure	15 unit		
Capillary temperature	270°C		
Retention time	5.40 min		

Table 4. Selected reaction monitoring (SRM) ion transition of propineb in LC-MS/MS

Precursor ion	Product ion	CE	Q1 PW	Q3 PW
254.000	61.0 ^{a)}	13	0.7	0.7
	206.7 ^{b)}	10	0.7	0.7

^{a)} Quantification ion

^{b)} Qualification ion

sulfate anhydrous 층을 통과 탈수시키고 약 10분간 실온에서 방치하였다. 여기에 20% 1,2-propanediol을 함유한 dichloromethane 1 mL를 넣고 rotary vacuum evaporator를 이용하여 30°C 이하의 수욕 상에서 감압농축하였으며 농축된 건고물을 methanol 2 mL로 재용해한 후 HPLC/UV로 분석하였으며, LC-MS/MS로 유도체화 성분을 재확인하였다.

제단백 과정

제단백 횟수와 용매의 용량을 다르게 하여 제단백 효과를 비교하고자 수행하였다. 제단백 과정은 chloroform 50 mL와 amyl alcohol 10 mL, chloroform 100 mL와 amyl alcohol 20 mL 이용하여 대두의 경우 0회(대조구)부터 최대 6회까지 진행하였으며, 완두는 chloroform 50 mL와 amyl alcohol 10 mL를 이용하여 0회(대조구)부터 최대 5회까지 반복 수행하였다.

회수율 시험

잔류분석법의 신뢰성 및 분석 효율을 검증하기 위해 대두와 완두를 이용한 회수율 시험을 수행하였다. 마쇄가 완료된 대두 및 완두 시료 5 g에 propineb의 최종농도가 0.4 및 2.0 mg/L 수준이 되도록 처리하였으며, 2수준 3반복으로 수행하여 회수율과 분석오차를 측정하였다.

결과 및 고찰

HPLC 기기 분석 조건

Dithiocarbamate계 살균제인 propineb는 logP -0.26으로 수용성이며 비극성 유기용매에 난용성인 화합물이다. 또한 증기압 1.6×10^{-7} mPa(20°C)로 휘발성이 매우 낮고 분자 구조 내 -NH기를 가지고 있어 HPLC 분석이 적합하다[19, 7]. 유도체화 propineb (methylated propineb)에 대한 최적 분석 파장을 선택하기 위해 190-360 nm 범위에서 최대흡수

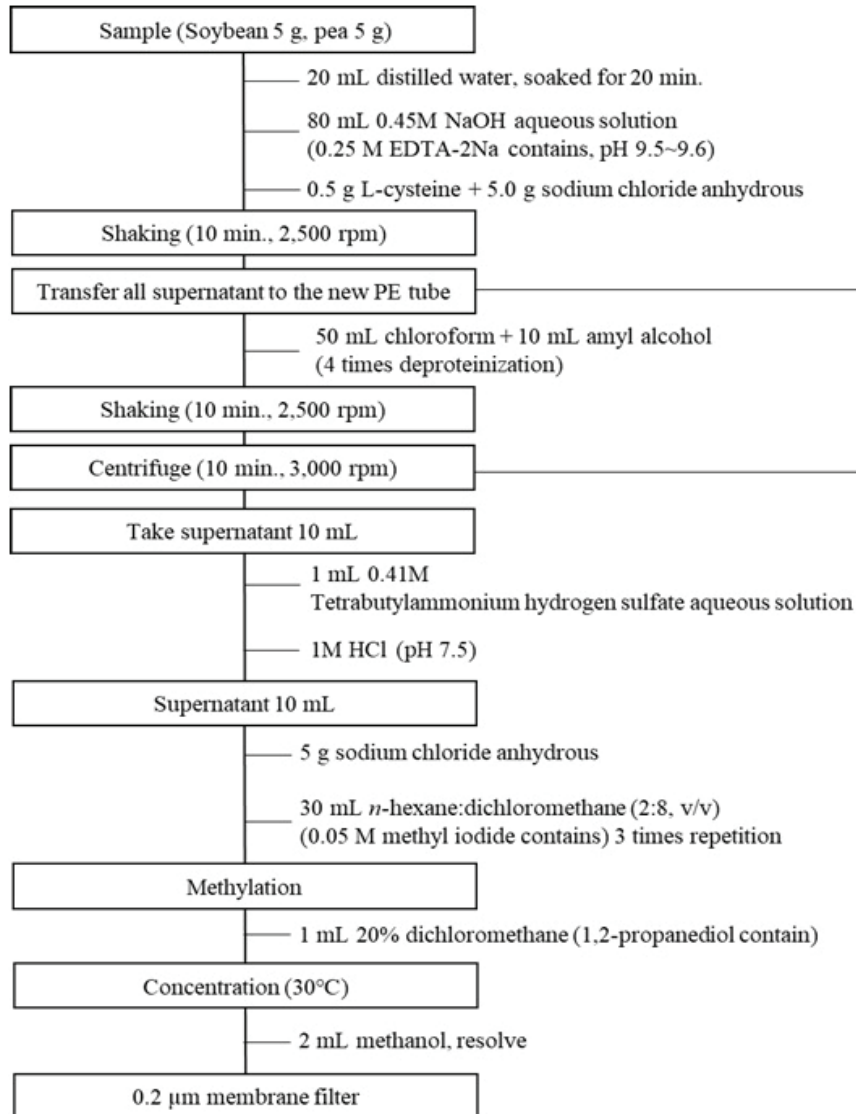


Fig. 1. Analytical scheme of propineb residue in soybean and pea.

파장을 스캔한 결과, 272 nm에서 흡광계수가 가장 높게 나타났다[7]. HPLC 분석의 분리용 C_{18} 계열의 column은 보편적으로 중성의 화합물 분리에 많이 사용되는 역상 (reversed phase) column (C_{18})을 사용하여 분석하였으며, 분리능 및 감도를 향상시키기 위해 이동상 용액은 water/ acetonitrile의 혼합용액을 용매구배법 (gradient elution)을 사용하여 기기 분석 시 추출물의 간섭물질을 최소화하였다 [7].

유도체화 propineb의 표준검량선

유도체화된 propineb의 표준용액(0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L)을 20 μ L씩 기기에 주입하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 대두의 경우 $y=0.064133042x+0.00204252$ ($R^2=0.999$)이었으며, 완두의 경우 $y=0.053637051x+0.005320982$ ($R^2=0.999$)로 R^2 값은 0.999 이상으로 정량의 직선성이 매우 우수하였다(Fig. 2).

유도체화 반응의 개선을 위한 제단백 과정 최적화

식품의약품안전처에 고시된 EDTA-2Na 수용액을 이용한 유도체화 방법에서 회수율을 높이기 위해 L-cysteine도 첨가 하였으나 대두와 완두에 적용하였을 때, 고함량의 단백질이 함유된 대두와 완두의 회수율은 각각 24.2%, 37.5%로 유도체화 반응 이전에 제단백 과정이 필수적으로 요구된다. 본 연구에서는 사전 연구[7]에서 쌀 시료에 적용했던 chloroform-gel method를 이용하여 대두와 완두에 대한 최적의 제단백 과정을 확인하고자 하였다.

Chloroform-gel method는 서로 다른 용해도를 가진 용액을 혼합하여 간단하게 단백질을 제거하는 액체-액체 추출 방법으로, 용매는 phenol과 chloroform을 주로 사용하며 추출 시 발생하는 거품을 방지하기 위해 소포제로 amyl alcohol를 사용한다[16]. 단백질은 아미노산의 구성 특성에 따라 소수성, 친수성을 지니는데 EDTA-2Na 수용액에 용해된 단백질의 경우 소수성 단백질은 내부에 친수성 단백질은

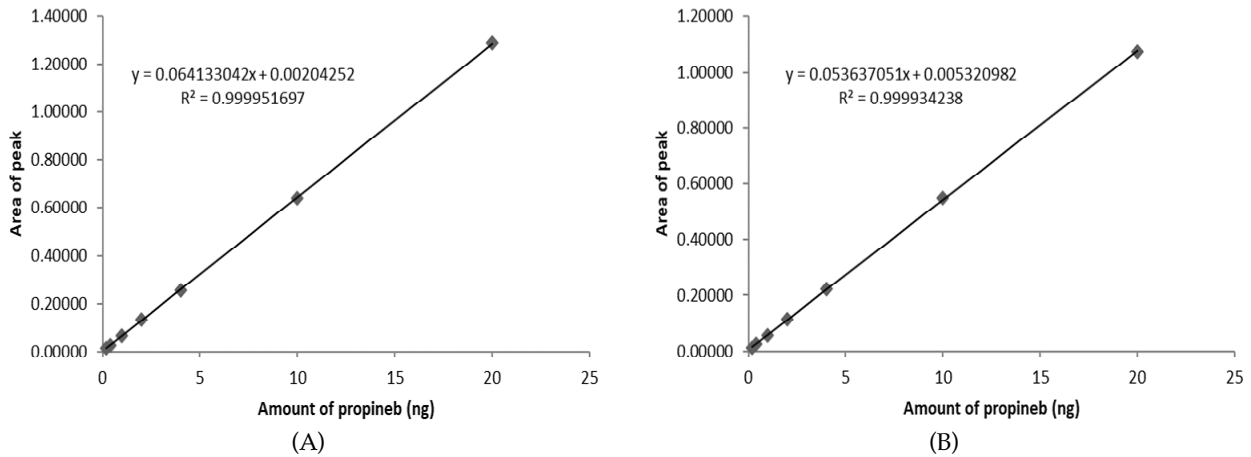


Fig. 2. Linearity of calibration curve used for propineb analysis in soybean (A) and pea (B).

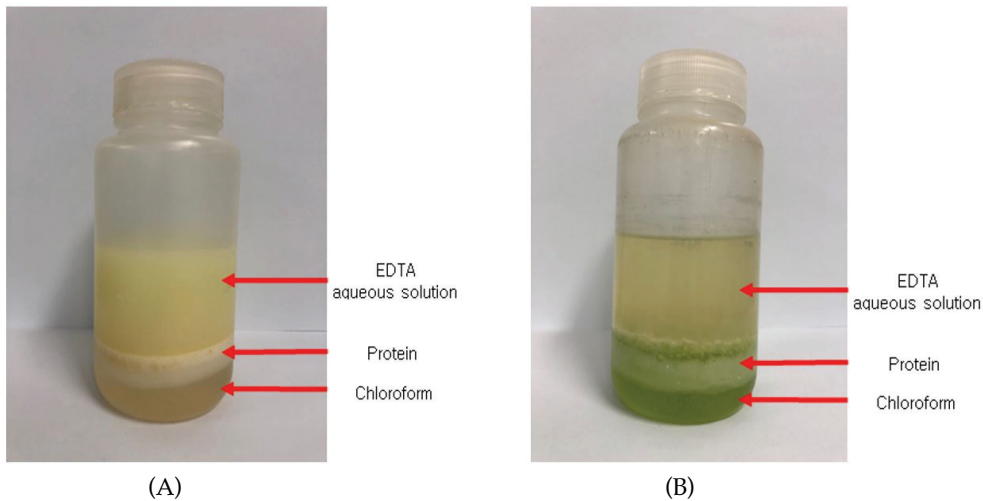


Fig. 3. Deproteinization of soybean (A) and pea (B) extracts using chloroform 50 mL+amyl alcohol 10 mL.

외부로 노출된다. 이때 chloroform을 첨가하게 되면 소수성 단백질은 chloroform 층 외부에 존재하게 되고 친수성 단백질은 내부에 존재하게 되면서 영구적으로 변성된다[17]. 변성된 단백질은 EDTA-2Na 수용액 층과 chloroform 층 사이에 백색 gel 층을 형성하며 이를 통해 단백질이 침전되는 것을 육안으로 확인할 수 있다[16]. 실제 대두와 완두에 제단백 1회 과정을 진행한 결과는 Fig. 3과 같으며, 단백질이 변성되어 백색 gel 층이 형성된 것을 확인할 수 있다.

대두(*Glycine max* (L.) Merrill)에 대한 제단백 효과

대표적인 두류인 대두는 단백질 함량(100 g 당 36.2%)이 높아 용매의 용량을 늘려 제단백 효과를 비교하고자 chloroform 50 mL와 100 mL를 사용하여 제단백 과정을 최대 6 회까지 단계적으로 반복하며 수행하였다(Table 5). 제단백을 진행하지 않고 유도체화 하였을 때(0회) 회수율은 24.2%이었으나 제단백 과정을 chloroform 50 mL로 회수를 반복한 결과 4회 수행 시 91.7%로 가장 좋은 결과를 나타냈다. Chloroform 100 mL로 제단백 과정을 반복한 경우에도 4회 수행

시 회수율 87.2%로 가장 좋은 결과를 보였다. 대두 중 propineb 잔류분석을 위해 사용된 chloroform의 용량과 제단백 과정 반복 횟수는 chloroform 50 mL로 4회 수행하는 경우에서 최적의 회수율을 보였다.

완두(*Pisum sativum* L.)에 대한 제단백 효과

완두는 대두와 강낭콩과 함께 우리나라 3대 다소비 두류 중 하나이며 국민 1인당 연간 120.5 g을 섭취하고 있다(2020, KHIDI). 완두는 우리나라 국민들이 다소비하는 두류 중 하나로 고단백질 함량(100 g 당 24.4%)을 지니고 있어 제단백 과정이 필요하다[22, 23]. 완두는 대두에 대한 실험 결과를 바탕으로 chloroform 50 mL를 사용하여 최대 5회까지 제단백 과정을 반복 수행하면서 회수율을 산출하였다(Table 5). 완두를 제단백을 진행하지 않고(0회) 유도체화를 진행하였을 때 회수율은 37.5%이었으나 제단백 과정을 반복하면서 뚜렷한 개선 효과를 보였다. 본 연구 결과 완두의 경우 chloroform 50 mL를 사용하여 4회 제단백 과정을 수행하였을 때 94.3%로 가장 높은 회수율을 보였다.

Table 5. Recovery yields of propineb from pea after deproteinization process using 50 mL chloroform+10 mL amyl alcohol and 100 mL chloroform+20 mL amyl alcohol

Crops	Solvent amount	Deproteinization time	Recovery (%)			
			1	2	3	Average±SD ^{a)}
Soybean	50 mL	0	18.0	22.8	31.7	24.2±6.9
		1	46.9	43.3	44.3	44.9±1.9
		2	53.2	52.2	52.8	52.7±0.5
		3	79.8	71.6	70.9	74.1±4.9
		4	92.2	92.4	90.6	91.7±1.0
		5	86.8	83.3	80.4	83.5±3.2
	100 mL	6	63.4	61.4	62.9	62.5±1.0
		1	58.3	52.6	50.7	53.9±3.9
		2	74.0	77.9	79.9	77.3±2.9
		3	83.0	89.3	82.4	84.9±3.8
		4	91.5	88.4	81.5	87.2±5.1
		5	80.9	90.2	80.8	84.0±5.4
Pea	50 mL	6	80.8	67.2	75.6	71.4±5.9
		0	38.5	36.0	38.0	37.5±1.3
		1	74.8	61.3	70.0	68.7±6.8
		2	70.9	75.0	77.9	74.6±3.4
		3	89.9	86.9	88.9	88.6±1.4
		4	94.8	90.9	97.4	94.3±3.2
		5	82.9	77.1	85.0	81.7±4.1

^{a)} SD: standard deviation

두류 중 Propineb 잔류분석을 위한 제단백 과정

손 등(1990)의 보고에 의하면, 두류의 단백질은 pH에 따라 용해도가 다르며 대체적으로 pH 9에서 높은 용해도를 나타내어 대두와 완두에 함유된 단백질의 용해도가 약알칼리성인 EDTA-2Na 수용액에 높을 것으로 판단된다[15]. 이를 통해 대두와 완두에 함유된 단백질이 약알칼리성인 EDTA-2Na 수용액에 용해되어 methyl iodide의 propineb 유도체화 반응을 경쟁적으로 방해하는 간섭물질로 작용했을 것으로 추정하였다[13, 14]. 따라서 유도체화 반응 전 대두와 완두에 chloroform-gel-method를 적용하여 고함량의 단백질을 사전에 제거하고 유도체화 과정을 수행한다면 methyl iodide가 propineb와 경쟁적 간섭없이 유도체화 propineb로 전환될 수 있을 것으로 기대하였다. 본 연구 결과 대두와 완두 중 propineb의 유도체화 과정을 방해하는 간섭물질인 고함량의 단백질을 사전에 제거함으로써 분석 회수율이 대두는 24.2%에서 91.7%까지 증가하였으며, 완두는 37.5%에서 94.3%까지 뚜렷하게 개선되는 결과를 관찰하였다. 특히 두 두류 시료의 경우 제단백을 반복적으로 4회 수행하였을 때 가장 높은 회수율을 나타내었다. 그러나 제단백 과정을 반복적으로 수행하였을 때 회수율이 비례적으로 증가할 것으로 예상했으나, 제단백 과정을 5회 이상 수행하였을 때는 오히려 회수율이 감소하였다. 이는 제단백 과정이 필요 이상 반복되면서

EDTA층에 녹아 있던 propineb가 낮은 용해도(<0.1 g propineb/ L dichloromethane) 임에도 chloroform 층으로 분배되면서 회수율 감소에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다[18].

Chloroform 50 mL를 사용한 대두와 완두의 평균 회수율을 비교하였을 때, 완두의 경우 모든 회수율이 대두보다 높게 나타났다(Fig. 4). 이는 대두(단백질 36.2%)의 경우 완두(24.4%)보다 약 12% 정도 높은 단백질 함량을 지니고 있어 chloroform 50 mL와 반응하였을 때, 일부 변성되지 않은 단백질의 간섭으로 인해 완두보다 회수율이 낮게 나타난 것으로 추측된다. 또한 선행연구[7]로 수행한 팥의 평균회수율(98.0%)은 완두의 평균회수율(94.3%)과 비교하였을 때 높은 회수율을 보였다. 이는 완두(24.4%)가 팥(19.0%)보다 약 5% 이상의 단백질을 함유하고 있어 chloroform 50 mL가 완두에 함유된 단백질을 모두 수용하지 못하여 팥과 완두의 회수율 차이가 나타난 것으로 예측된다. 따라서 chloroform 50 mL를 이용하여 4회 제단백 과정을 수행할 경우 대두(36.2%), 완두(24.4%), 팥(19.0%)의 단백질 함량에 따라 propineb의 회수율이 각각 91.7%, 94.4%, 98.0%로 산출되어 단백질 함량과 제단백 과정 사이의 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다.

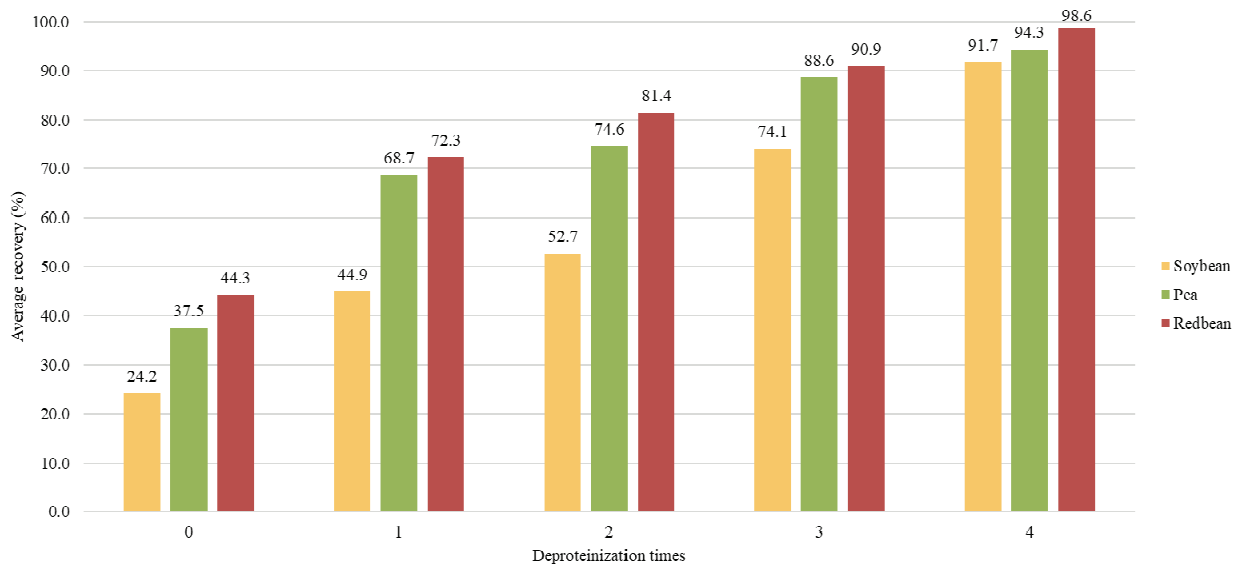


Fig. 4. Comparison of propineb recovery from soybean, pea and red bean ^{a)} according to numbers of deproteinization process. ^{a)} (Leem et al., 2019)

Table 6. Recovery yields and MLOQ (method limit of quantitation) of propineb in soybean and pea

Crop	Fortification level (mg/kg)	Recovery±SD ^{a)} (%)	MLOQ (mg/kg)
Soybean	0.4	88.3±1.1	0.04
	2.0	90.7±1.3	
Pea	0.4	91.0±1.4	0.04
	2.0	93.5±1.6	

^{a)} SD: standard deviation

분석 정량한계 및 회수율

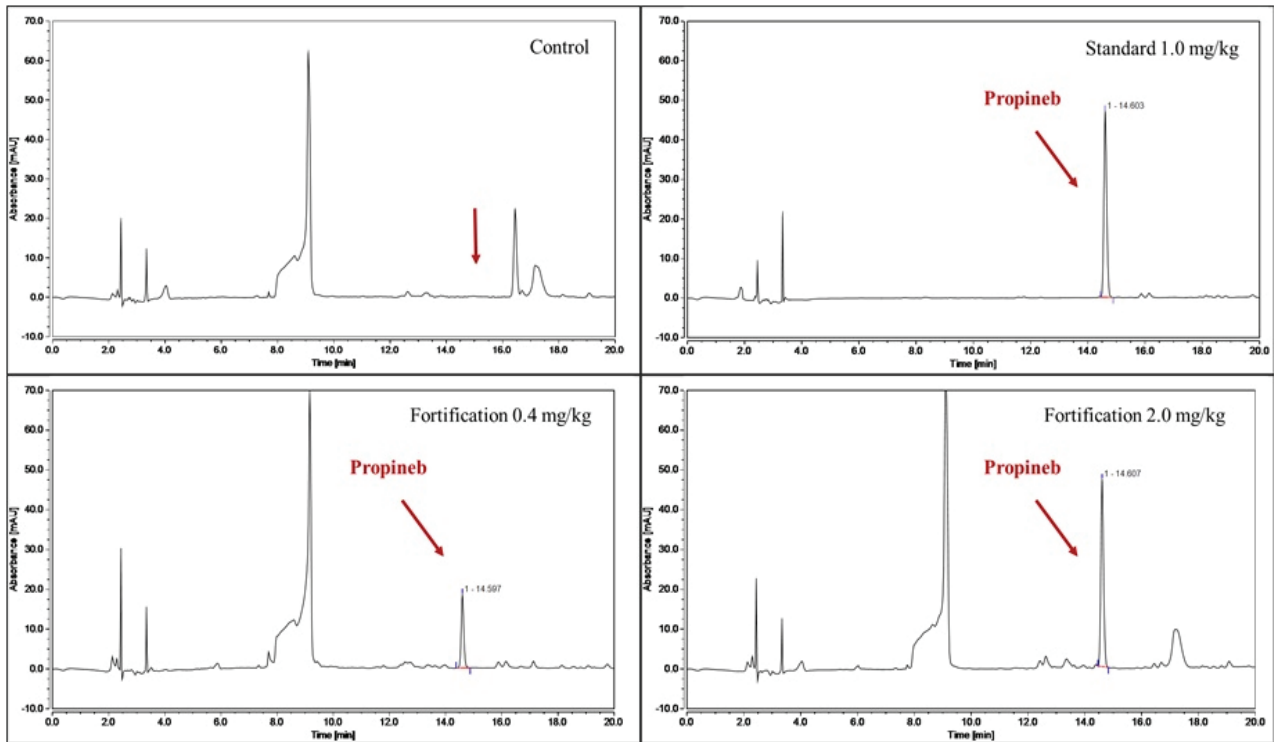
Propineb의 분석정량한계는 기기의 최소검출량(ng), 시료량(g), 최종부피(mL), 기기주입량(μL)을 고려하여 산출하였다. 산출근거는 아래 식과 같으며, propineb의 분석정량한계는 0.04 mg/kg이었고 분석과정의 적합성을 확인하기 위해 실험결과를 바탕으로 대두, 완두에 제단백 과정 4회를 적용하여 분석정량한계의 10배인 0.4 mg/kg, 50배인 2.0 mg/kg 수준으로 시험을 수행하였다. 그 결과, 모두 유효회수율은 범위인 70-120%을 만족하였으며 표준편차는 10% 이하의 기준으로 만족하였다(Table 6). 이때의 대표 크로마토그램은 Fig. 5와 같다.

$$\begin{aligned}
 & \text{최소검출량 (ng)} \times \frac{\text{시료의부피 (mL)}}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{\text{최종부피 (mL)}}{\text{시료의부피 (mL)}} \\
 & \times \frac{1}{\text{기기주입량 (\mu L)}} = \text{분석정량한계 (mg/kg)} \\
 & 0.2 \text{ ng} \times \frac{100 \text{ mL}}{5 \text{ g}} \times \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times \frac{1}{20 \text{ }\mu\text{L}} = 0.04 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

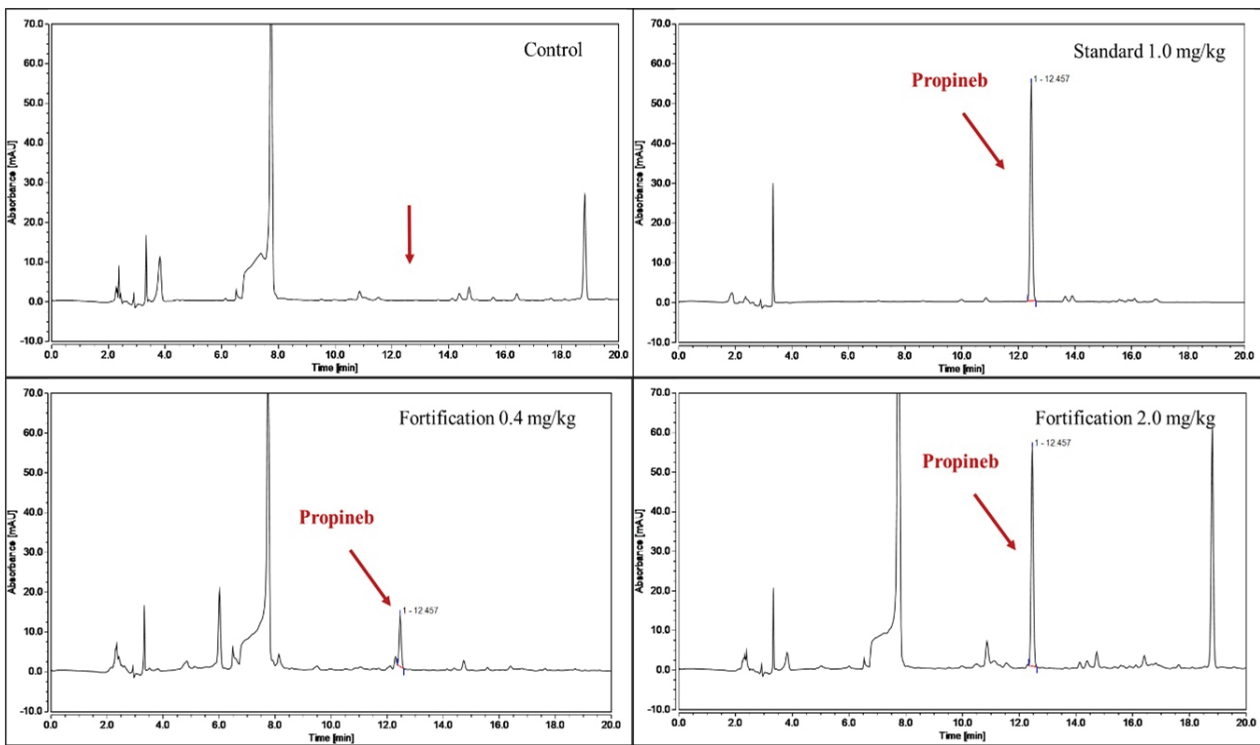
LC-MS/MS를 이용한 분석성분 확인

본 연구에서 유도체화된 propineb 잔류분석법의 정성적 확인을 위하여 LC-MS/MS를 이용하였다. 유도체화된 propineb은 negative ion-mode에서 최적의 감도를 나타냈고, precursor ion은 [M-H]⁺ ion, m/z=254.400, product ion은 m/z=61.060, 206.710이었다. 상기 분석조건을 통해 무처리 대두와 완두 시료에 propineb 표준물질을 첨가하여 제단백과 유도체화 과정을 거치는 경우 LC-MS/MS 상에서 유도체화 propineb 성분을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이를 통하여 고단백질 두류 시료인 대두와 완두 중 함유한 유도체화 propineb 잔류성분의 정량분석을 위하여 HPLC뿐 아니라 LC-MS/MS의 활용이 추천된다.

본 연구를 통하여 단백질 함량이 높은 두류 중 dithiocarbamate계 살균제(propineb 포함)를 유도체화를 통하여 잔류 분석하는 경우 반드시 제단백 과정이 포함되어야 할 것을 제안하고자 한다. 또한 본 연구를 통하여 시도된 분석 간섭물질로서의 과량의 단백질을 제거하기 위한 chloroform-gel-method이 다양한 고단백 함유 농산물 잔류분석 시에 적용될 수 있을 것으로 기대한다.



(A)



(B)

Fig. 5. HPLC-UVD chromatograms of propineb in soybean (A) and pea (B).

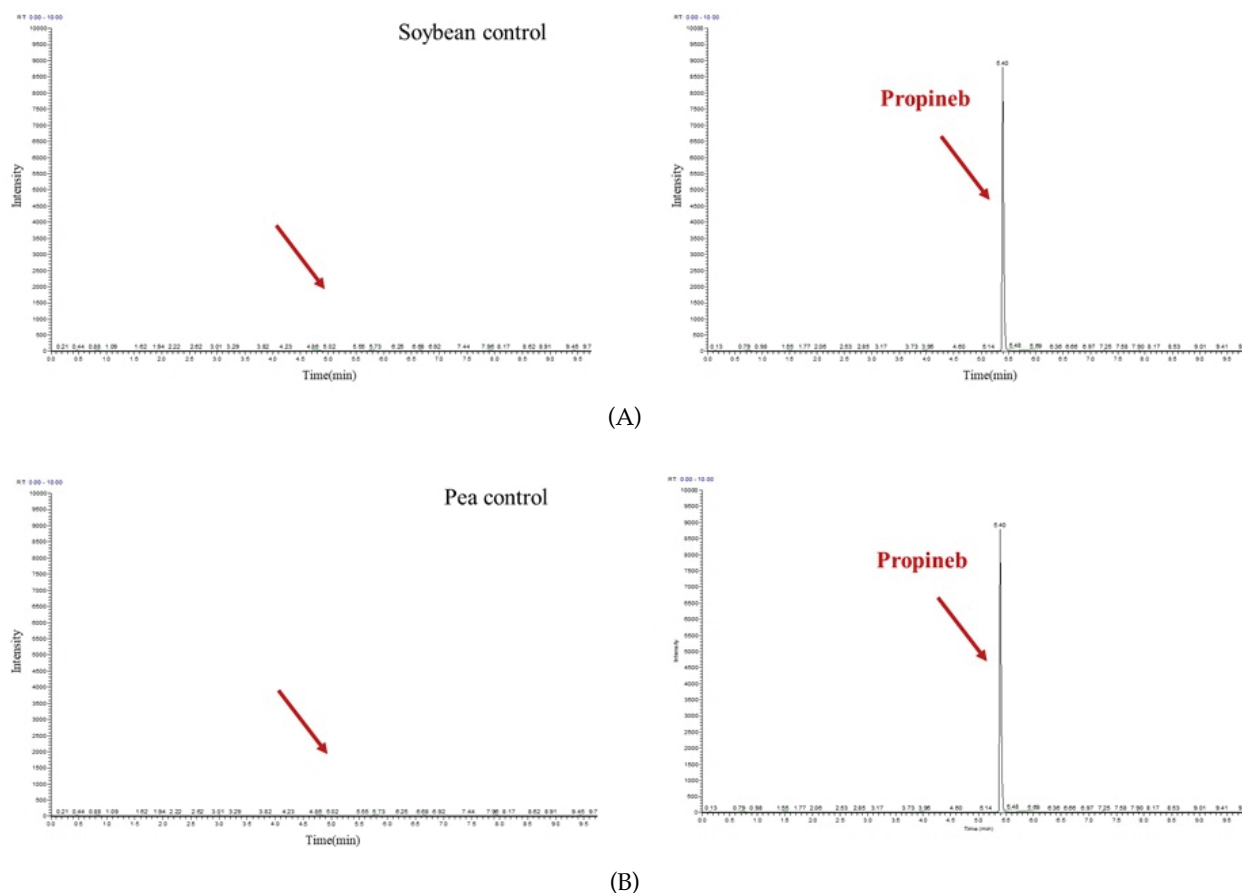


Fig. 6. SRM chromatograms of propineb in soybean (A) and pea (B).

Note

The authors declare no conflict of interest.

References

- Kim EH, Jang MR, Kim JA, Kim TR, Yook DH, Hwang IS, Kim JH (2011) Determination of Ethylenethiourea in Fruits. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 43(3), 277-281. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.3.277>.
- Crnogorac G, Schwack W (2009) Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.008>.
- Josephine AA, Bom L, Chbani A, Fajloun Z, Millet M (2017) Analysis of Dithiocarbamate Fungicides in Vegetable Matrices Using HPLC-UV Followed by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 55(4), April 2017, 429-435. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw198>.
- O. López-Fernández, R. Rial-Otero, C. González-Barreiro, J. Simal-Gándara (2012) Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 134(1), 366-374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.178>.
- Ministry for Food and Drug Safety (2017) Practical manual of residual pesticide analysis method, pp. 204-211, 5th edition, Korea.
- Banerjee H, Ganguly P, Roy S, Banerjee D, Paramasivam M, Banerjee T, Sharma KK (2010). Persistence and safety risk assessment of propineb in Indian tea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 170(1), 311-314. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1234-9>.
- Kim SK, Hoang QV, Lee JY, Kim YJ, Chung KW, Kim YW (2016) Anti-wear properties of thiadiazole and dithiocarbamate derivatives. *Applied Chemistry for Engineering*, 27(5), 521-526. <https://doi.org/10.14478/ace.2016.1076>.
- Jo HW, Sun JH, Heo HM, Lee SH, Kim JE, Moon, JK (2021) Development and Validation of Dithio-

- carbamates Fungicide Analytical Method using CS₂ Trap Method in Livestock Product. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 40(2), 127-133. <https://doi.org/10.5338/KJEA.2021.40.2.15>.
9. Kim HY, Choi HJ, Eom JY, Seo EC, Choi SH, Cheong SY, Choi SH, Lee HJ, Choi JC (2010) Determination of dithiocarbamates in agricultural products circulated in Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 42(1), 1-7.
 10. Zhou L, Xu J, Luan LQ, Ma J, Gong Y, Qin D, Pan C (2013) Optimization and validation of a method based on derivatization with methylating agent followed by HPLC-DAD for determining dithiocarbamates residues. *Acta Chromatographica*, 25(4), 613-625. <https://doi.org/10.1556/achrom.25.2013.4.2>.
 11. Ministry for Food and Drug Safety (2012) Practical manual of residual pesticide analysis method, pp. 202-207, 3rd edition, Korea.
 12. Petha NH, Lokhande RS, Seshadri DT, Patil RM, Bhagat TS, Patil JG (2017) A simple pre-column derivatization method for the determination of mancozeb technical (fungicide) by reverse phase HPLC-UV. *Analytical Methods*, 32(9), 4702-4708. <https://doi.org/10.1039/C7AY00830A>.
 13. Chun KH, Kim BY, Hahm YT (1999) Extension of tofu shelf - life with water soluble degraded chitosan as a coagulant. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 28(1), 161-166.
 14. Han JS, Hwang IK (1992) Effects of functional properties of soy protein isolate and qualities of soybean curd upon proteolytic hydrolysis. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 24(3), 294-299.
 15. Sohn KH, Min SH, Chung HJ (1990) Comparison of functional properties of various bean protein isolates. *Yonsei Journal of Euthenics*, 4, 61-74.
 16. Zumbo P, Mason E (2012) Phenol-chloroform Extraction. pp. 1-7, Weill Cornell Medical college Laboratory of Christopher Department of Physiology & Biophysics, USA.
 17. Oswald N (2021) The basics: How Phenol Extraction of DNA Works. Bitesize Bio, UK.
 18. Turner JA (Edt) (2009) The pesticide Manual, pp. 954-955, 15th edition, Gardners Books, EU.
 19. Vaclavik L, Shippar JJ, Koesukwiwat U, Mastovska K (2018) Method development and validation for low-level propineb and propylenethiourea analysis in baby food, infant formula and related matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(12), 2387-2399. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1539529>.
 20. Bae EA, Moon GS (1997) A study on the anti-oxidative of Korean soybeans. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 26(2), 203-208.
 21. Jung CS, Han WY, Kwak YH, Kwon YC, Lim MS, Son Ck, Lee YS (2002) An early maturing and high-yielding pea variety "olwandu". *Korean Journal of Breeding Science*, 26(2), 203-208.
 22. Koo SC, Kang BK, Kim HT, Seo JH, Jeong KH, Yun HT, Oh IS, Choi MS (2015) Evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) genetic resources for sprout and analysis of optimum culture condition for pea sprout. *Korean Journal of Crop Science*, 60(4), 484-490. <https://doi.org/10.7740/KJCS.2015.60.4.484>.
 23. Cha SH, Shin KO, Han KS (2020) Studies on the characteristics of concentrated soy protein. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 459-466. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2020.52.5.459>.