Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2018;37(2):117-124. Korean
Published online 2018 June 28. https://doi.org/10.5338/KJEA.2018.37.2.14

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

Research Article

Open Access

HPLC-UVD/MS를 이용한 농산물 중 Oxycarboxin의 분석

정명근*

강원대학교 생약자원개발학과

Determination of Oxycarboxin Residues in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS

Myoung-Gun Choung* (Department of Herbal Medicine Resource, College of Health Science, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea)

Received: 18 April 2018/ Revised: 17 May 2018/ Accepted: 23 June 2018

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

Abstract

BACKGROUND: Oxycarboxin(5,6-dihydro-2-methyl-N-phenyl-1,4-oxathiin-3-carboxamide-4,4-dioxide) as oxanthiin is a systemic fungicide commonly used for control of various pathogens in agronomic and horticultural crops. In an effort to develop an analytical method to trace the fungicide, a method using HPLC equipped with UVD/MS was studied.

METHODS AND RESULTS: Oxycarboxin was extracted with acetone from hulled rice, soybean, Kimchi cabbage, green pepper, and apple samples. The extract was diluted with saline water, followed by liquid-liquid extraction with methylene chloride. Florisil column chromatography was employed for the purification of the extracts. Oxycarboxin was determined on a Zorbax SB-AQ C_{18} column by HPLC with UVD. Accuracy of the proposed method was validated by the recovery tests from crop samples fortified with oxycarboxin at 3 levels per crop.

CONCLUSION: Mean recoveries ranged from 78.3% to 96.1% in five representative agricultural commodities. The coefficients of variation were less than 10%, and limit of quantitation of oxycarboxin was 0.04 mg/kg. A confirmatory technique using LC/MS with selected-ion monitoring was also provided to clearly identify the suspected residue. The method was reproducible and sensitive to determine the residue of oxycarboxin in agricultural commodities.

Key words: Oxycarboxin, Oxanthiin fungicide, Pesticide residue

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

서 론

Oxanthiin계 살균제인 oxycarboxin(5,6-dihydro-2-methyl-N-phenyl-1,4-oxathiin-3-carboxamide-4,4-dioxide; Fig. 1)은 곰팡이의 미토콘트리아 내 succinic hydrogenase의 산화작용을 억제하여 살균효과를 나타내며(Krieger, 2001), 국내 미등록 농약이지만 미국, 캐나다 및 호주 등에서는 식물의 녹병 방제에 널리 사용되고 있다(Paranjape *et al.*, 2014). Oxycarboxin은 1966년 Schmeling과 Kulka (1966)에 의해 최초로 발견되었으며, 이후 1968년 Uni Royal사(Canada)에서 제품으로 개발하여 Plantvax라는 상품명으로 시판하였다(Robert Krieger, 2001). 1971년 미국에서 유효성분으로 등록되어(Robert Krieger, 2001) 식물의 화학적 방제에 침투이행성 살균제라는 새로운 장을 열었으며, 식물체에 흡수되어 목질부 또는 체관부를 통해서 병원균이 있는 부위까지 이동 및 작용하는데, 밀과 보리의 종자처리 및 깜부기병 방제에도 널리 사용되고 있다(Kulka & Schmeling, 1995).

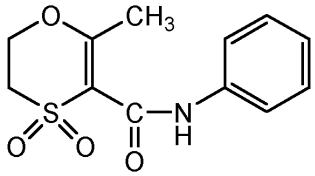

Fig. 1. Chemical structure of oxycarboxin.

Oxycarboxin의 물리화학적 특성을 살펴보면 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})는 0.77인 극성 화합물이며, 분자량 267.3($C_{12}H_{13}NO_4S$), 증기압은 5.6×10^{-3} mPa(25℃)인 백색의 분말형태이고, 다양한 유기용매(acetone 83.7 g, hexane 8.8 g/L) 및 물(1,400 mg/L) 모두에 잘 녹는 특성이 있다(Tomlin, 2003).

Oxycarboxin의 잔류분석법으로 GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry)를 이용한 다성분 다종농약 분석이 보고된 바 있으나(Hayat *et al.*, 2010), 선행 연구결과는 농약 살포 활동에 참여한 작업자로부터 회수한 혈액에서 잔류성분을 분석하기 위해 수행되어진 결과이다. 또한 현재 우리나라 식품공전 잔류농약분석법 4.1.2.1 다종농약다성분 분석법-제1법(Ministry of Food and Drug Safety, 2017)에는 oxycarboxin의 모화합물인 carboxin의 GC-NPD(Gas chromatography-nitrogen phosphorous detector) 분석법이 제시되어 있으나, carboxin의 증기압이 5.6×10^{-3} mPa (25℃)로 GLC 분석은 가능하나, 210℃ 이상의 온도에서는 분해될 가능성이 있고, 더욱이 carboxin의 산화 대사산물인 oxycarboxin의 분석법은 수재되어 있지 않을뿐더러, 실제 농산물을 대상으로 대상농약의 분석조건 확립 및 회수율 등이 체계적으로 검토된 결과는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 고성능 액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 oxanthiin계 살균제인 oxycarboxin을 대상으로 정확성 및 정밀성이 확보된 다양한 농산물에 적용 가능한 신규 분석체계를 검토하여 국내 잔류농약 검사의 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

본 연구에 사용한 oxycarboxine의 분석용 표준품은 순도 99.9% 이상의 분석용 표준품을 Sigma- Aldrich(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 표준품의 stock solution은 methanol에 녹여 500 mg/L의 농도로 조제하여 -20℃의 냉동고에서 보관하고, 필요 시 마다 보관중인 stock solution을 methanol로 희석하여 사용하였다. Florisil(60～100 mesh)은 J. T. Baker(USA)로부터 구입하여 130℃에서 하룻밤 이상 가열, 활성화하여 사용하였다. *n*-hexane, dichloromethane, acetone, acetonitrile 및 methanol은 잔류분석용을, deionized water는 HPLC용을 J. T. Baker (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 유기용매 및 무기시약은 시약특급 또는 잔류분석용을 사용하였다. 농축기는 Eyela NE-1000SW (Japan)를 사용하였고, 농산물 시료는 고속 호모게나이저(IKA, Ultra-Turrax T-25, USA)를 이용하여 마쇄 및 균질화하였다.

농산물 시료

국내 농약 잔류허용기준(Ministry of Food and Drug Safety, 2017) 중 oxycarboxin의 모화합물인 carboxin의 사용이 등록되어있는 농산물을 분석대상으로 하였으며, Codex의 잔류분석법 대상 대표 농산물군(Codex, 2003)과 국내 식품 소비량을 감안하여 곡류는 현미, 콩류는 콩, 채소류는 고추 및 배추, 과일류에서는 사과를 대표시료로 선정하였다. 분석에 사용된 각 무농약 대표시료인 현미, 콩, 고추, 배추 및 사과는 지역 대형마트에서 유기농 인증시료를 구입한 후 식품공전 상 검체 처리방법(Ministry of Food and Drug Safety, 2017)에 따라 전처리하여 사용하였다. 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인하였다.

HPLC-UVD/MS 기기분석 조건

Oxycarboxin은 분자구조 내에 존재하는 amide기가 열에 취약한 특성이 있고, 증기압이 낮은 특성으로 인해 GLC 분석이 어려운 단점을 갖고 있으나, 분자구조 내 conjugated enone(C=C-C=O) 구조를 포함하고 있어 HPLC/UVD 210～260 nm 범위에서 발색단이 예상되므로 농산물 중 oxycarboxin의 잔류 분석은 HPLC/UVD 분석법을 적용하고자 하였다. 분석에 사용된 HPLC는 자외흡광검출기(ultra violet detector; UVD)가 장착된 Agilent (USA) 1200 series를 사용하였으며, 분리용 칼럼은 극성 물질의 분리 효율이 높은 Zorbax SB-AQ C_{18} (250×4.6 mm I.D., S-5 μm, 8 nm, USA)을 사용하였다. 잔류분의 재확인을 위한 LC/MS 분석에는 Agilent(USA) 6110 Quadruple LC/MS를 사용하였으며, 자세한 분석 조건은 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

표준검량선 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

Oxycarboxin의 stock solution을 희석하여 0.05～10 mg/L의 농도가 되도록 농도별 표준용액을 조제하고, 각 20 μL를 HPLC에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다. 분석법의 정량한계는 무농약 농산물 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 후, 분석기기의 정량한계와 시료량 및 분석과정 중의 농축배율을 계산하여 아래의 계산식에 의해 산출하였으며(Ahn *et al.*, 2014), 동일 수준으로 oxycarboxin을 처리한 회수율 시험으로 재확인하였다.

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

Table 1. HPLC operating parameters for the analysis of oxycarboxin

Instrument	Agilent 1200 HPLC system
Column	Zorbax SB-AQ C_{18} (250×4.6 mm I.D., S-5 μm, 8 nm, USA)
Column temp.	30℃
Mobile phase	35% ACN
Flow rate	1.0 mL/min
Wavelength	UV 254 nm
Sample size	20 μL

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

Instrument	Agilent 6110 Quadruple LC/MS
Column	YMC-Pack Pro C_{18} RS (150 × 2.0 mm I.D., S-3 μm, 8 nm, Japan)
Column temp.	30℃
Mobile phase	35% ACN contained 0.1% formic acid
Flow rate	0.3 mL/min
Sample size	5 μL
Ionization	ESI positive-ion mode
Gas temp.	350℃
Drying gas	N_2, 10.0 L/min
Capillary voltage	4.0 kV
Mass range(m/z)	200 ~ 600

시료의 추출 및 분배

농산물 시료 25 g에 acetone 100 mL를 가하고(콩, 현미 시료의 경우는 추출 전 20 mL의 증류수를 가한 후 30분간 방치하여 미리 습윤화 함), 호모게나이저 상에서 2분간 고속 마쇄(12,000rpm), 추출하였다. 추출물을 여과지(Toyo No. 6, Japan)가 장착된 Büchner funnel 상에서 흡인 여과하고, 시료 및 호모게나이저 컵을 여분의 acetone 40 mL로 씻어 앞서의 여과액과 합하였다. 합친 추출액을 1L 용량의 분액여두에 옮기고 포화식염수 50 mL와 증류수 450 mL를 첨가한 뒤 dichloromethane으로 50 mL로 2회 분배 추출하였다. 합친 dichloromethane 추출액을 무수 sodium sulfate 15 g에 통과시켜 탈수한 후 40℃이하의 수욕상에서 감압 농축, 건고 하였다. 현미 및 콩을 제외한 시료의 잔류물은 dichloromethane 10 mL에 재용해하여 Florisil 흡착 크로마토그래피에 직접 공시하였다. 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 3회 분배 추출하였다. 합친 acetonitrile 추출액을 40℃에서 감압 농축, 건고하고 잔류물을 dichloromethane 10 mL에 재용해하여 Florisil 흡착 크로마토그래피에 공시하였다.

흡착 크로마토그래피

내경 1.5 cm, 길이 40 cm의 유리칼럼에 130℃에서 하룻밤 가열하여 활성화시킨 Florisil 10 g을 건식 충전하고, 그 위에 3 g의 무수 sodium sulfate를 첨가하였다. 칼럼에 *n*-hexane 50 mL를 가하여 상단에 소량의 *n*-hexane이 남을 정도로 유출시켜 버린 후 dichloromethane 10 mL에 녹인 시료 용액을 가하여 약 3 mL/min의 유속으로 유출시켰다. 충전제 표면이 노출되기 직전 dichloromethane/*n*-hexane/acetonitrile 혼합용액(50/45/5, v/v/v) 100 mL를 용출시켜 버린 후 재차 dichloromethane/*n*-hexane/acetonitrile 혼합용액(50/40/10, v/v/v) 150 mL를 용출시켜 받았다. Oxycarboxin이 용출된 분획은 40℃이하의 수욕상에서 감압 농축, 건고하고 잔류물을 water/acetonitrile(65/35, v/v) 10 mL에 재용해하여 HPLC/UVD로 분석하였다.

대표 농산물에 대한 oxycarboxin의 회수율 시험

본 실험에서 확립한 oxycarboxin 잔류분석법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위하여 실제 농산물 시료에 대한 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 분쇄 혹은 마세한 각 대표 무농약 농산물 시료 25 g에 정량한계(LOQ), 정량한계의 10배 및 50배에 해당하는 oxycarboxin 표준용액을 각각 3반복으로 처리한 다음 상기 분석과정을 수행하여 회수율과 분석오차를 측정하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건의 확립

Oxycarboxin의 최적 HPLC 분석파장을 선정하기 위하여 methanol에 용해한 2 mg/L의 표준품을 on-line HPLC/

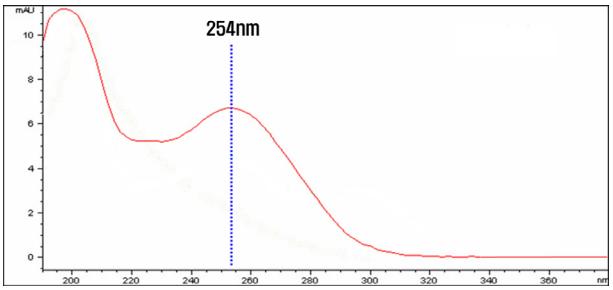

Fig. 2. UV absorption spectrum of oxycarboxin.

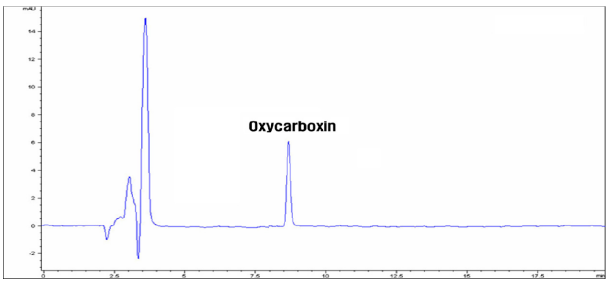

Fig. 3. Chromatogram of oxycarboxin standard solution (20 μL of 0.1 mg/L in MeOH).

DAD를 이용하여 190~400 nm 범위에서 최대흡수파장(λ max)을 검토하였다. 그 결과 흡수파장은 196 nm 및 254 nm에서 관찰되었으며, 흡광계수는 196 nm, 254 nm 순으로 낮아졌다(Fig. 2). Oxycarboxin 의 흡수파장 중 196 nm 영역에서는 흡광계수가 높아 분석 감도는 우수할 것으로 예상되나 시료 중 함께 추출되는 매트릭스 성분들도 이 영역의 파장을 흡수할 것으로 예상되며, 용매에 의한 흡광현상(UV-cutoff)도 심할 것으로 판단된다. 따라서 시료 추출물에 의한 간섭정도가 상대적으로 낮아 분석의 선택성이 우수할 것으로 판단되는 장파장의 254 nm를 검출파장으로 설정하였다. HPLC 분석조건 중에서 분리용 칼럼은 C_{18}계열이면서 상대적으로 극성물질의 분리에 적합한 Zorbax SB-AQ C_{18}(250 ×4.6 mm I.D., S-5 μm, 8 nm, USA)을 이용하였고, 이동상으로는 oxycarboxin이 해리하지 않는 극성 화합물임을 감안하여 acetonitrile 수용액을 사용하였다. 이동상 중 acetonitrile의 농도를 달리하여 머무름시간 및 peak의 이론단수 등을 검토한 결과, 등용매용리(isocratic) 조건에서 acetonitrile/water (35/65, v/v) 혼합용액이 머무름시간과 분리도 측면에서 가장 적합한 양상을 나타내었으며(Fig. 3), 이때 oxycarboxin의 머무름시간은 8.5분이었다. 분리능과 감도를 증대시키기 위하여 용매구배법(gradient elution)을 사용할 수도 있으나, 이 경우 분석시간이 길어지며 재현성이 isocratic 조건에 비하여 열등한 단점이 있다. 본 분석법의 개발 목적은 시료 입수 후 단시간 내에 분석 작업이 수행되어야 하는 일상적 공정 분석용이므로 분석법의 안정성 측면에서 보다 유리한 isocratic 조건을 선정하였다.

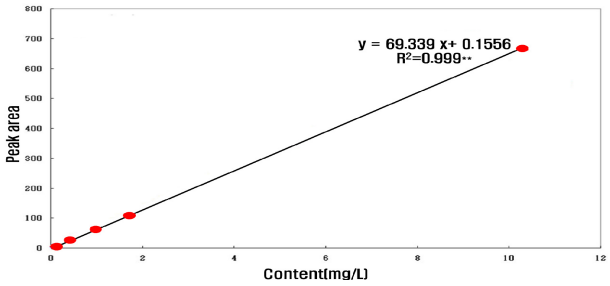

Fig. 4. Calibration curve of oxycarboxin in HPLC (0.05~10 mg/L in MeOH).

표준검량선의 직선성 및 분석정량한계

분석기기의 정량한계는 크로마토그램에서 peak로서 나타난 대상 성분의 분석결과를 신뢰성 있게 수치화할 수 있는 한계농도로써 크로마토그램 상에서 검출된 peak의 S/N (signal/noise)의 비가 최소 10 이상(검출한계의 3배 이상)을 나타내는 대상성분의 농도를 의미한다(Fong *et al.*, 1999; Miller, 2005). Table 1의 HPLC 조건에서 다양한 농도의 oxycarboxin 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과, 기기상의 정량한계(S/N≥10)는 0.1 mg/L 수준이었다. Oxycarboxin의 농도별 표준용액(0.05～10 mg/L) 20 μL를 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 y=69.339x+0.1556(R^2=0.9999**)으로 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 4). 즉, oxycarboxin은 기기정량한계의 1/2 수준인 1 ng에서부터 그 200배인 200 ng까지의 표준검량선에 대한 회귀계수가 R^2=0.999** 이상으로 정량의 직선성이 검정되었으므로 매우 광범위한 농도 범위의 시료 중 잔류량을 비례적으로 산출하는 것이 가능하였다.

시료 추출 및 분배과정

농산물 시료로부터 oxycarboxin 성분을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용하였다. Acetone은 USFDA법이나 AOAC법에서 대상 성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매로써 이미 많은 연구자들에 의하여 농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다(Kwon *et al.*, 2008). 농산물 추출액으로부터 대상 성분과 함께 추출되는 방해물질을 1차적으로 제거하기 위한 조정제법으로는 액-액 분배법을 사용하였다. 분배 용매로 *n*-hexanel 2종의 *n*-hexane/dichloromethane 혼합액, dichloromethane 등 4종의 분배 용매를 공시, 대상 성분의 분배효율을 조사하였다(Table 3).

대상성분들의 액-액 분배조건에 따른 분배효율을 조사한 결과, *n*-hexane 용액 100 mL로 분획하였을 때 oxycarboxin은 전혀 검출되지 않았으며, *n*-hexane/dichloromethane 혼합액(80:20, v/v) 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 23% 수준, *n*-hexane/dichloromethane 혼합액(20:80, v/v) 100 mL로 분획하였을 때 회수율은 85% 수준이었으며, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때는 94%의 회수율을 나

Table 3. Efficiency of liquid-liquid partition of crude extract by different solvents for oxycarboxin

Compound	Recovery ratio(%)[1]			
	Partition Ⅰ[2]	Partition Ⅱ	Partition Ⅲ	Partition Ⅳ
Oxycarboxin	0	22.6	85.3	94.3

[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 4. Efficiency of *n*-hexane/acetonitrile partition for oxycarboxin

Compound	Recovery ratio (%)[1]	
	Partition Ⅰ[2]	Partition Ⅱ
Oxycarboxin	83.8	90.4

[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 5. Elution profile of oxycarboxin on Florisil column

Elution solvent (v/v)	Recovery ratio (%)[1]			
	0-50 mL	51-100 mL	101-150 mL	Total
50 : 45 : 5[2]	0.0	0.0	0.0	0.0
50 : 43 : 7[3]	0.0	7.0	0.0	7.0
50 : 42 : 8[3]	0.0	31.7	0.0	31.7
50 : 41 : 9[3]	0.0	42.3	43.6	85.9
50 : 40 : 10[3]	5.2	54.8	35.0	95.0

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

타내어 대상농약이 극성 화합물이라는 특성에 맞게 분획용매의 극성이 높을수록 회수율이 높아지는 양상을 나타내었다. 따라서 가장 우수한 회수율을 나타낸 분배용매 Ⅳ의 dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하는 액-액 분배조건을 oxycarboxin의 분배용매로 선정하였다.

Dichloromethane을 이용한 액-액 분배과정에 의하여 시료 중에 포함된 상당량의 비극성 및 기타 방해물질이 제거될 것으로 기대되나, 유지 성분은 dichloromethane 층으로 대상 성분과 함께 분배되기 때문에 제거되지 않는다. 본 연구의 대상 시료 중 현미 및 콩은 유지가 약 1~3% 및 20% 수준 함유되어 있는 시료이므로 이러한 시료에 함유된 유지성분을 제거하기 위해 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가로 공시하였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000). Table 4에 나타낸 바와 같이 미리 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile로 3회 분배하였을 때 90% 수준의 oxycarboxin의 회수가 가능하였으므로, 유지 및 비극성 간섭물질의 제거를 위한 *n*-hexane/acetonitrile 분배법은 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile로 3회 분배를 실시하는 분배조건Ⅱ로 설정하였다. 한편 유지 함량이 1% 미만인 비유지 시료로 분류되는 배추, 사과 및 고추에서는 제거되는 비극성 유지 성분 및 불순물의 양이 매우 작고 크로마토그램 상에서 그 정제 효과 또한 미미하였으므로 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 생략하였다.

흡착 크로마토그래피 정제조건

농산물에 함유된 oxycarboxin의 분석 시 상기 액-액 분배과정 및 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정을 통해 상당량의 불순물 및 비극성 간섭물질들이 제거되었을 것으로 판단되나, 농산물에 따라 시료로부터 유래되는 다양한 기타 불순물이 존재하므로 추가적인 정제과정이 필요할 것으로 판단되어 흡착크로마토그래피에 의한 정제법을 검토하였다. 흡착 크로마토그래피는 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 방법이며, 흡착제로는 Florisil, silica gel 및 alumina 등이 많이 사용된다. 이 중 Florisil은 색소와 지방의 제거가 뛰어나 미국의 FDA(1999)나 AOAC(2000) 등에서 가장 많이 사용하는 방법이다.

본 연구에서도 Florisil을 흡착제로 선정 하였으며, 용매의 극성 조절을 위해 dichloromethane/*n*-hexane/acetonitrile 혼합용액의 용매체계를 사용하여 최적화하고자 하였다(Table 5).

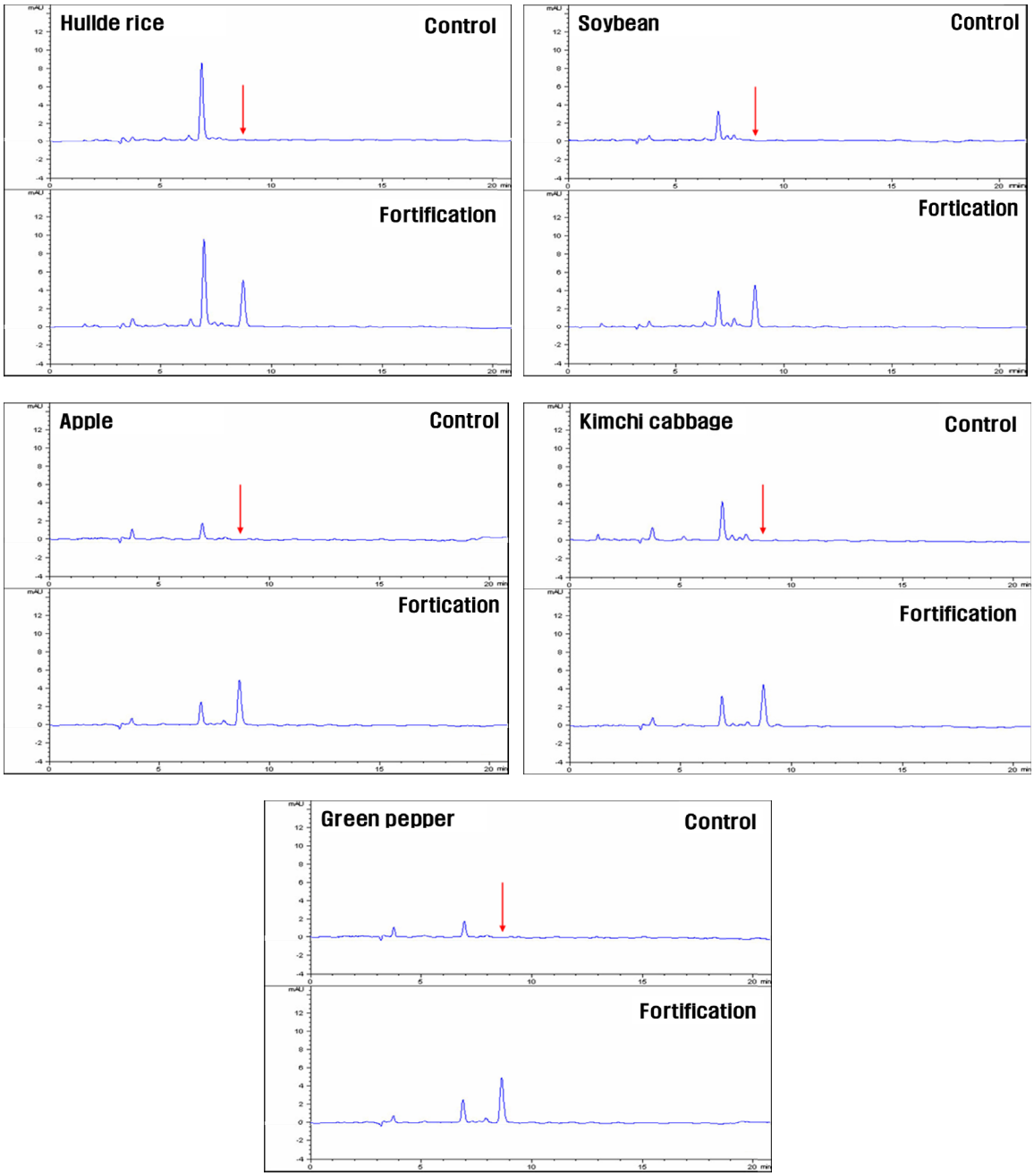

Fig. 5. Typical HPLC chromatograms of agricultural commodity extracts for the analysis of oxycarboxin.

Florisil 흡착크로마토그래피용 용매의 다양한 극성조절을 이용하여 oxycarboxin의 회수율을 조사한 결과 dichloromethane/*n*-hexane/acetonitrile 혼합액(50/45/5, v/v) 100 mL로 pre-washing한 후, dichloromethane/*n*-hexane/acetonitrile 혼합액(50/40/10, v/v) 150 mL로 용출할 경우 oxycarboxin 성분의 회수율이 95.0% 수준으로 검토된 용매체계 중 가장 우수한 회수율을 나타내었으므로 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용하여 간섭물질 제거를 위한 추가적인 정제법으로 확립하였다.

농산물 시료 중 oxycarboxin의 회수율 검증

본 연구에서 확립한 시료 추출 및 정제, 그리고 기기분석 과정을 무농약 농산물 시료에 적용한 대표적 결과는 Fig. 5와 같다. 무농약 농산물의 최종 시료용액에서 oxycarboxin의 머무름시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였고, 분석기기의 정량한계와 시료량, 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 분석법의 정량한계를 산출하였다.

본 연구에서 무농약 농산물 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 후 산출된 oxycarboxin의 정량한계는 0.04 mg/kg이었으며, 국제기준인 Codex(Codex Alimentarius

Table 6. Recovery ratio of oxycarboxin in different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%)[1)]	CV (%)	LOQ (mg/kg)
Apple	0.04	84.3±2.3	2.7	0.04
	0.4	85.7±2.1	2.4	
	2.0	84.0±1.7	2.0	
Green pepper	0.04	86.3±3.7	4.3	0.04
	0.4	82.5±1.1	1.4	
	2.0	78.3±0.8	1.0	
Kimchi cabbage	0.04	88.2±2.6	2.9	0.04
	0.4	85.9±0.4	0.5	
	2.0	83.0±1.3	1.6	
Soybean	0.04	88.7±3.1	3.5	0.04
	0.4	83.6±2.0	2.4	
	2.0	80.9±1.2	1.4	
Hulled rice	0.04	96.1±4.5	4.7	0.04
	0.4	90.0±2.4	2.7	
	2.0	90.9±0.5	0.5	

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

Commission, 2003) 및 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(Lee, 2017)에서 권장하는 잔류농약분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 MRL의 1/2 이하의 정량한계 기준에 적합하였다. 각각의 대표 농산물 무처리 시료에 oxycarboxin 표준용액을 정량한계(LOQ), 정량한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가하고, 상기 확립된 분석방법에 의하여 대표 농산물을 3반복으로 분석하여 회수율을 조사한 결과, 정량한계 수준에서는 84.3~96.1%, 정량한계 10배 수준에서는 82.5~90.0%, 정량한계 50배 수준에서는 78.3~90.9%의 양호한 회수율을 나타내었으며, 재현성도 양호하여 분석오차는 최대 4.7%로 조사되었다.

따라서, 처리수준 및 농산물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70～120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하였다(Table 6). 이상의 결과에서 볼 때, 본 연구에서 확립된 oxycarboxin 분석법은 국내・외 농산물의 잔류농약 분석 및 검사에 충분히 적용 가능함을 확인하였다.

LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

개발된 분석법의 신뢰성을 확보하기 위하여 LC/MS에 의한 재확인 과정을 추가하였다. LC/MS 분석 시 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다(Kwon *et al.*, 2008). Oxycarboxin의 이온화를 향상시키기 위하여 HPLC 분석에 이용된 이동상 용매인 35% acetonitrile용액에 0.1%의 formic acid를 첨가하여 분석을 실시하였고, Fig. 6과 7에 나타낸 TIC(total-ion chromatogram) 및 mass spectrum으로부터 oxycarboxin

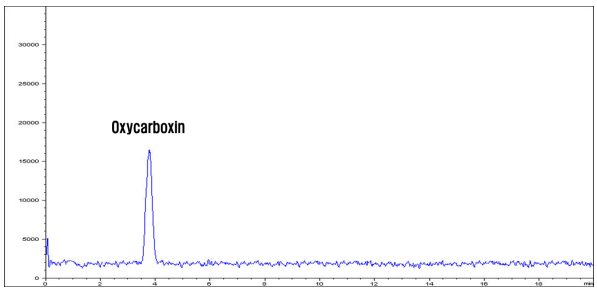

Fig. 6. Total-ion chromatogram (TIC) of oxycarboxin in LC/MS.

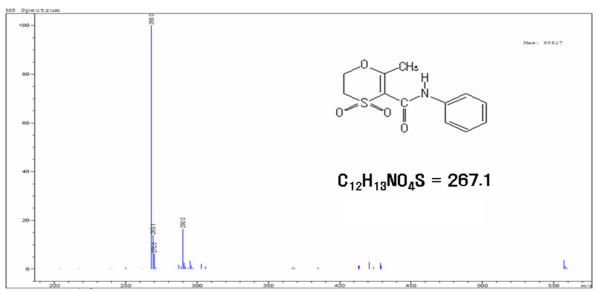

Fig. 7. ESI(+) mass spectrum of oxycarboxin.

은 ESI(electrospray ionization) positive ion 조건에서 용이하게 protonation 되어 $[M+H]^+$를 형성함을 알 수 있었다(McLafferty, 1993; Ardrey, 2003). 본 연구에서 oxycarboxin의 $[M+H]^+$ peak가 base peak로 나타나므로 selected-ion

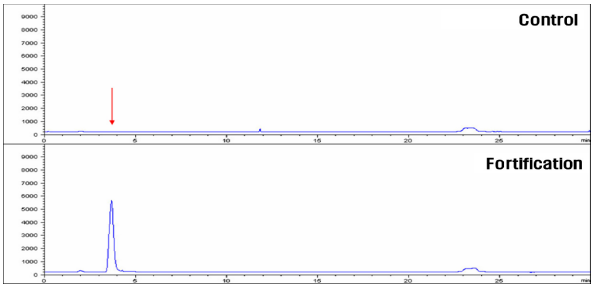

Fig. 8. SIM chromatogram of hulled rice extract for the confirmation of oxycarboxin.

monitoring(SIM)용 ion으로는 $[M+H]^+$인 m/z=268.0 이온만을 이용하여도 충분한 정성적 확인이 가능하였다.

Fig. 8은 본 실험에 사용된 대표적 농산물 시료 중 현미를 대상으로 oxycarboxin의 잔류분을 재확인한 SIM chromatogram 이며, 본 실험에서 사용된 모든 농산물의 무처리 시료에서는 대상 농약성분의 peak가 관찰되지 않았고, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름시간에 정확하게 oxycarboxin의 잔류분만을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC/UVD를 이용한 정량법과 더불어 oxycarboxin 잔류분의 추가적 정성분석법으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 HPLC-UVD/MS를 이용하여 농산물 중 oxanthiin 살균제인 oxycarboxin의 잔류 분석법을 확립하였다. 대표 농산물은 현미, 콩, 배추, 고추 및 사과를 선정하였고 acetone을 가하여 추출된 oxycarboxin 성분을 dichloromethane 액-액 분배법과 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 HPLC-UVD/MS 분석대상 시료로 사용하였다. Oxycarboxin의 정량적 분석을 위한 최적 분석 조건을 확립하였으며, 정량한계(LOQ)는 0.04 mg/kg 이었다. 각 대표 농산물에 대해 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과 모든 처리농도에서 78.3～96.1% 수준을 나타내었으며, 반복 간 변이계수(CV)는 최대 4.7%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70～120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 만족한 결과를 도출하였으며, LC/MS SIM을 이용하여 실제 농산물 시료에 적용하여 재확인 하였다. 이상의 결과로 신규 oxycarboxin의 HPLC-UVD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용 가능할 것이다.

Note

The author 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).

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. The Korean Journal of Pesticide Science, 18(4), 321-329.

Fong, W. G., Moye, H. A., Seiber, J. N., & Toth, J. P. (1999). Pesticide residues in foods: methods, techniques and regulations. pp. 3-44, John Wiley and Sons, New York, USA.

Hayat, K., Ashfaq, M., Ashfaq, U., & Saleem, M. A. (2010). Determination of pesticide residues in blood samples of villagers involved in pesticide application at District Vehari (Punjab), Pakistan. African Journal of Environmental Science and Technology, 4(10), 666-684.

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.

Kulka, M., & Von Schmeling, B. (1995) Carboxin fungicides and related compounds : In Modern Selective Fungicides, pp. 133-147, 출판사명, New York. USA.

Lee, S. J., Hwang, Y. S., Kim, Y. H., Nam, M. Y., Hong, S. B., Yun, W. K., Kwon, C. H., Do, J. A., Im, M. H., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2010). Determination of fomesafen residue in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. The Korean Journal of Pesticide Science, 14(2), 95-103.

Miller, J. M. (2005). Chromatography: concepts and contrasts. pp. 286-287, John Wiley and Sons, New York, USA.

Paranjape, K., Vasant. G., & Sugha, G. (2014). Classification of pesticides, p. 342, The Pesticide Encyclopedia, CABI, UK.

Krieger, R. (Ed.). (2001). Handbook of pesticide toxicology, two-volume set: principles and agents (Vol. 2). pp. 1194-1198, Academic Press, USA.

Tomlin, C. D. S. (2003). The Pesticide Manual: a world compendium, Oxycarboxin. 13th ed. p. 1250, British Crop Protection Council, UK.