

## 고성능액체크로마토그래피를 이용한 농산물 중 Mandipropamid의 잔류분석법 확립

권찬혁 · 장문의 · 임무혁\* · 최 훈 · 정다이 · 이수찬 · 유진영 · 이영득<sup>1</sup> · 이종욱 · 홍무기

식품의약품안전청 식품평가부, <sup>1</sup>대구대학교 생명환경학부  
(2008. 8. 1. 접수, 2008. 10. 16. 승인)

### Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry

Chan Hyeok Kwon, Moon Ik Chang, Moo Hyeog Im\*, Hoon Choi, Da I Jung,  
Su Chan Lee, Jin Young Yu, Young Deuk Lee<sup>1</sup>, Jong Ok Lee and Moo Ki Hong

Food Safety Evaluation Department, KFDA, Seoul 122-704

<sup>1</sup>Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

(Received August 1, 2008, Accepted October 16, 2008)

**요 약:** 포도, 고추, 배추, 토마토 및 감자 등 5종 농산물에 대하여 mandelamide계 신규 살균제인 mandipropamid의 잔류분석법을 확립하였다. 각 농산물을 세절한 시료에 methanol을 가하고 고속마쇄하여 잔류분을 추출하였다. 추출액을 포화식염수와 증류수로 희석하고 dichloromethane으로 분배하여 극성 분순물을 제거하였으며, Florisil 흡착크로마토그래피법으로 추가 정제하였다. Mandipropamid의 HPLC/UV 검출기상 최소검출량은 2 ng (S/N>10, 0.01 AUFS)이었고 시료추출물 중 불순물에 의한 간섭은 관찰되지 않았다. 무처리 포도, 토마토, 고추, 배추 및 감자에 대하여 2수준 3반복으로 회수율을 산출한 결과 각각  $99.8 \pm 1.7$  (n=6),  $89.3 \pm 5.3$  (n=6),  $98.7 \pm 2.2$  (n=6),  $99.7 \pm 6.8$  (n=6) 및  $91.1 \pm 3.1$  (n=6)이었으며, 분석법의 정량한계는 0.02~0.04 mg/kg이었다. 아울러 검출된 잔류분은 재확인을 위하여 selected-ion monitoring (SIM)을 이용한 LC/MS법을 추가로 확립하였다. 본 연구에서 확립된 mandipropamid의 잔류분석법은 검출감도 및 재현성을 고려할 때 공정분석법으로 사용이 가능하였다.

**Abstract:** Mandipropamid is a new mandelamide-type fungicide to control foliar *Oomycete* pathogens in some vegetables. An analytical method was developed to determine mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Mandipropamid was extracted with methanol from grape, tomato, green pepper, Chinese cabbage and potato samples. The extract was diluted with saturated sodium chloride solution and distilled water, and dichloromethane partition was followed to recover the mandipropamid from the aqueous phase. Florisil column chromatography was employed to further remove interfering co-extractives prior to HPLC analysis. Reverse-phased HPLC was successfully applied to determine mandipropamid in sample extracts with the detection at its  $\lambda_{\max}$  (223 nm).

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-380-1674 Fax : +82-(0)2-355-6037

E-mail : imh0119@kfda.go.kr

Overall recoveries of mandipropamid from fortified samples averaged  $99.8 \pm 1.7$  ( $n=6$ ),  $89.3 \pm 5.3$  ( $n=6$ ),  $98.7 \pm 2.2$  ( $n=6$ ),  $99.7 \pm 6.8$  ( $n=6$ ) and  $91.1 \pm 3.1$  ( $n=6$ ) for grape, tomato, green pepper, Chinese cabbage and potato, respectively. Limit of quantification of the method was 0.02~0.04 mg/kg for all samples. A LC/mass spectrometry with selected-ion monitoring was also provided to confirm the suspected residue. The proposed method was reproducible and sensitive enough to determine the terminal residue of mandipropamid in agricultural commodities.

**Key words :** mandipropamid, fungicide, residue, agricultural commodity

## 1. 서 론

현대 농업에 있어 병해충 및 잡초를 방제하기 위한 농약의 사용량이 매년 증가함에 따라 농산물 중 잔류 농약에 의한 만성독성학적 위해유발 가능성이 지속적으로 제기되어 왔으며 이에 따라 농산물의 안전성 확보가 커다란 사회적 문제로 대두되고 있다.<sup>1</sup> 현행 사용되는 농약의 경우 일부 속효성 약제를 제외하고는 방제 목적상 살포 후 일정기간 잔효되는 약제 특성이 있어 최종 수확물에 살포농약이 잔류할 가능성이 크다. 따라서 이렇게 살포되는 농약들로부터 농산물 중 안전성 확보는 반드시 이루어져야 한다.<sup>2</sup>

Mandipropamid[2-(4-chlorophenyl)-N-[3-methoxy-4-(prop-2-ynylloxy)-phenethyl]-2-(prop-2-ynylloxy)acetamide]는 Syngenta에서 개발한 mandelamide계 신규 살균제이며, 식물엽에 발생하는 난균류(*Oomycete* pathogen) 방제에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>3-6</sup> 2006년 한국에서 최초로 고추 및 포도가 등록된 이래로 현재 까지 토마토, 배추 및 감자에 추가적으로 사용이 허가되었다. 재배포장에 일반적으로 살포되는 약량은 100~150 g/ha이며, 국내에는 액상수화제의 형태로 mandipropamid 단제 및 chlorothalonil과의 합제로 판매되고 있다.<sup>7-8</sup> 포자의 발아 및 균사생장을 억제시키는 예방 및 치료효과가 탁월하여 국내에는 노균병, 역병, 탄저병에 안전사용기준이 설정되어 있으며,<sup>7-8</sup> 전세계적으로 사용량이 급증할 것으로 예상되는 농약이다. 국내의 mandipropamid의 잔류허용기준은 고추에 5.0 mg/kg과 기타농산물에 0.1 mg/kg으로 설정되어 있으며 피망, 포도, 토마토, 배추 및 감자에는 각각 5.0, 5.0, 0.3, 2.0 및 0.1 mg/kg으로 잔류허용기준이 입안예고 중에 있다.<sup>9-10</sup> 만성독성 시험결과로부터 산출된 mandipropamid의 일일섭취허용량(acceptable daily intake, ADI)은 0.05 mg/kgbw/day으로 살균제로

많이 사용되고 있는 strobilurin계나 trazole계에 비하여 비슷하거나 높은 것으로 알려져 있다.<sup>3,7</sup> 낮은 독성 및 뛰어난 방제효과로 미국, 오스트리아 및 호주 등 여러 나라에서도 최근 등록되어 사용량이 증가하고 있다.

하지만, 과채류는 가장 많이 소비되는 농산물이며, 대부분이 조리하지 않고 섭취하기 때문에 낮은 독성을 가졌음에도 불구하고 mandipropamid와 같이 과채류에 많이 살포될 가능성이 있는 농약의 경우 지속적인 모니터링을 통해 위해평가가 반드시 이루어져야 한다. 한편 모니터링을 위해서는 반드시 신뢰성 있는 시험법 개발이 필수적이나 mandipropamid의 경우 분석법은 제품의 품질관리를 위한 분석법을 제외하고는 국내외적으로 아직 알려진 바가 없어 mandipropamid의 분석법의 개발이 시급하다.

농약의 잔류분석법은 크게 두 가지 이상의 성분을 분석하는 다성분 분석법과 단일 성분만을 분석하는 단성분 분석법으로 나눌 수 있다. 다성분 분석법은 한번에 여러 가지 농약을 분석할 수 있어 분석효율은 있으나, 재현성 및 정확성면에서 모든 농약에 적용하는데 어려움이 있어 상당수의 농약들이 단성분 시험법으로 분석이 이루어지고 있다. 따라서 식품의약품안전청(KFDA) 및 US FDA 등에서 운영되고 있는 농약잔류분석법에서도 농약제품분석법과 별도로 분석목적에 맞게 스크리닝(screening)을 위한 다성분 분석법과 정량시험을 위한 단성분 분석법으로 구분하여 운영하고 있다.<sup>9,11</sup>

본 연구에서는 농산물 중 mandipropamid의 잔류분석법을 개발하고자 하였으며, 개발된 분석법은 공정 분석법으로 사용될 수 있도록 표준화하고 단계별로 분석효율 및 정제도를 검증하도록 하고자 하였다. 또한 개발된 분석법은 재확인 과정을 두어 분석의 신뢰성을 증가시키고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약

본 연구에서 사용한 mandipropamid (96.1%)의 분석용 표준품은 농업과학기술원으로부터 분양받았다. Stock solution은 acetonitrile에 500 mg/L을 조제하여 2°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 이 stock solution은 최소 6개월 동안 안정하였으며, working solution은 필요시마다 보관 중인 stock solution으로부터 희석하여 사용하였다. Florisil (60~100 mesh, 잔류분석용)은 Aldrich Chemical (USA)로부터 구입하여 130°C에서 5시간 이상 활성화시킨 후 사용하였다. *n*-Hexane, dichloromethane 및 ethyl acetate는 잔류분석용을 acetonitrile, methanol 및 deionized water는 HPLC용을 J.T. Baker (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 유기용매 및 무기시약은 시약특급 또는 ACS급을 사용하였다.

### 2.2. 농산물 시료

시험법 개발을 위해 사용된 포도, 고추, 토마토, 배추 및 감자의 무농약 시료는 시장에서 유기농인증 시료를 구입한 후 식품공전 상 검체 처리방법에 따라 전처리 하였다.<sup>9</sup> 즉 포도, 고추 및 토마토 시료는 꼭지를 제거한 후 세절(細切)하였고, 배추는 바깥쪽의 변질된 잎 및 심을 제거하여 세절하였으며, 감자의 경우에는 물로 가볍게 씻어 표면에 붙어있는 흙을 제거한 후 세절하여 사용하였다. 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인한 후 사용하였다.

### 2.3. 시료 추출 및 정제

세절된 농산물 시료 각 25 g에 100 mL의 methanol을 가하여 호모게나이저(Nihonseiki Kaisaha AM-8, Japan)상에서 2분간 고속 마쇄(10,000 rpm) 추출하였다. 추출물을 여지(12 cm i.d., Toyo No 6, Japan)가 깔려 있는 Büchner funnel로 흡인여과하고 잔류물은 methanol 40 mL로 씻어 위의 여액과 합하였다. 합친 여액을 1 L 용량의 분액여두로 옮기고 50 mL의 포화식염수와 300 mL의 증류수를 차례로 가한 후 50 mL의 dichloromethane을 가하여 2분간 격렬하게 흔들어 정지하였다. Dichloromethane층을 20 g의 anhydrous sodium sulfate에 통과시켜 탈수하고 재차 수용액층에 50 mL의 dichloromethane을 가하여 위의 과정을 반복한 다음 앞서의 dichloromethane과 합하였다. 합친

dichloromethane 추출액을 40°C 수욕상에서 감압 농축, 건조하였다. 잔류물을 10 mL의 *n*-hexane으로 재용해(4+3+3 mL)하여 Florisil column chromatography로 추가 정제하였다.

### 2.4. Florisil column chromatography

Chromatographic column (15 mm i.d. × 40 cm, PTFE stopcock 부착)에 활성화시킨 Florisil 10 g과 그 위에 2 cm 높이로 anhydrous sodium sulfate를 차례로 건식 충전하고 50 mL의 *n*-hexane으로 씻어 버렸다. Sodium sulfate층이 노출되기 직전에 앞서의 *n*-hexane에 녹인 시료용액 10 mL를 취하여 column에 가하고 여분의 *n*-hexane 5 mL로 용기 및 column 벽면을 씻어 내렸다. 표면이 노출되기 직전 100 mL의 ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액(20/80, v/v)을 가하여 이 분획은 버리고, 재차 100 mL의 ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액(50/50, v/v)으로 용출시켜 받았다. 이 용출액을 40°C 수욕상에서 감압농축, 건조하였다. 잔류물에 5 mL의 acetonitrile을 가하여 flask 내부의 분석 대상성분을 녹이고 5 mL의 deionized water를 가하여 혼합한 후 기기분석의 공시액으로 하였다.

### 2.5. 기기분석

Agilent (USA) 8453 UV-visible spectroscopy system을 이용하여 mandipropamid의 ultraviolet (UV) spectrum을 측정하였다. Acetonitrile 및 acetonitrile/deionized water 혼합액(50/50, v/v)에 녹인 10 mg/L의 표준용액을 200~350 nm에서 2초 동안 측정하였다.

분석을 위해 사용된 HPLC system 및 column은 다음과 같다. Waters (USA) 2695 HPLC system, 2489 UV/Visible detector 및 Empower data acquisition & processing system의 HPLC를 이용하였다. 분석 column은 Shiseido (Japan) Capcell Pak C18 (UG120), 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm spherical을 사용하였다. Mandipropamid의 정량을 위하여 사용된 HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 이동상은 acetonitrile/deionized water 혼합액(50/50, v/v), 유속은 1 mL/min, column 온도는 40°C, 검출기 파장은 223 nm (0.01 AUFS, 토마토 및 감자의 경우 0.005 AUFS), 시료주입량은 20 μL이었다. 이 조건에서 mandipropamid의 머무름 시간은 약 11.0분이었다.

재확인 과정을 위해 사용된 LC/MS system 및 column은 Thermo Finnigan (USA) TSQ Quantum Ultra LC/MS/MS 및 Capcell Pak C18 (MGII), 2.0 mm i.d.

× 100 mm, 3 μm spherical이였으며, LC/MS의 분석조건은 다음과 같다. 이동상 및 column 온도는 HPLC 동작 조건과 동일하였으며, 유속은 0.2 mL/min이었고 시료주입량은 5 μL였다. 분석을 위한 이온화는 mode는 ESI positive-ion mode에서 spray voltage: 4500 V, sheath gas pressure 40 psi, auxiliary gas pressure 15 psi, tube lens offset 74 V로 분석을 하였으며, mass range는 100~500이었다.

2.6. 회수율 시험

본 연구에서 확립한 잔류분석법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위하여 회수율 시험을 수행하였다. 즉 무농약 농산물 시료에 acetonitrile에 녹인 mandipropamid 표준 용액을 시료에 0.2~2.0 mg/kg이 되도록 처리, 혼화하고 위의 분석과정을 행하여 회수율을 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC 분석조건 확립

Mandipropamid는 n-octanol/water 분배계수(log P<sub>ow</sub>)가 3.2 (25°C)이며, 물에 대한 용해도가 4.2 mg/L(25°C)으로 거의 녹지 않는 비극성화합물이다.<sup>3,7</sup> 증기압이 9.4×10<sup>-7</sup> Pa (25°C) 미만으로 증기압이 매우 낮으며, 200°C이상에서 열분해가 일어난다는 보고가 있어<sup>7</sup> gas chromatography법보다 HPLC에 의한 분석 방법으로 개발하게 되었다. HPLC 사용함에 있어 가장 많이 이용되는 검출기는 전기화학 검출기, 형광검출기 및 자외흡광검출기가 있다. 그러나 mandipropamid는 산화환원 반응을 띄지 않고, 자체 분자구조내 형광을 나타내지도 않아 자외흡광검출기법을 우선적으로 선택되었다. 따라서 Fig. 2와 같이 UV 흡수과장을 측정을 시도하여 최적의 흡수과장을 찾아내고자 하였다. Acetonitrile에 녹인 10 mg/L의 mandipropamid 표준품의 이용하여 200~350 nm 사이의 분석가능한 과장을 측정한 결과 최대흡수과장(λ<sub>max</sub>)은 223 nm이었

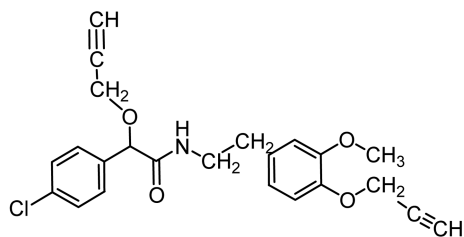


Fig. 1. Chemical structure of mandipropamid.

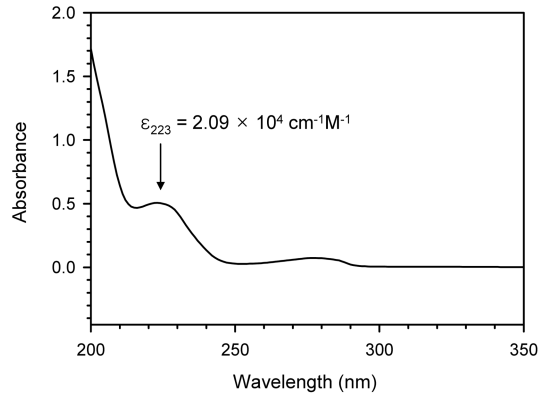


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of mandipropamid. Spectrum was obtained from standard 10 mg/L solution in acetonitrile/deionized water mixture (50/50, v/v).

다. 또한 acetonitrile/deionized water 혼합액 (50/50, v/v)에서 측정하였을 때도 최대흡수과장은 acetonitrile에 녹인 표준품 과장과 거의 일치하여 mandipropamid는 자체적으로 해리하지 않는 것으로 판단되었고, acetonitrile과 deionized water만을 혼합하여도 HPLC 상 분석이 가능할 것으로 기대되었다. Mandipropamid는 최대흡수과장에서의 흡광계수(extinction coefficient, ε)는 2.09×10<sup>4</sup> cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>로 잔류분석에 아주 높은 감도를 나타내었으나 측정과장이 223 nm의 다소 단과장으로 시료추출 후 불순물이 충분히 제거 되어야만 HPLC를 이용한 기기분석이 가능할 것으로 여겨졌다.

Acetonitrile과 deionized water의 혼합액을 이용하여 octadecylsilyl column (C18)상 크로마토그래피적 특성 변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. Acetonitrile/

Table 1. HPLC chromatographic behavior by different mobile phase

Acetonitrile/ water (v/v)	Retention time (min)	Capacity factor (k')	MDQ <sup>a)</sup> (ng)
40/60	28.6	16.9	4.0
50/50	11.0	5.9	2.0
60/40	6.0	2.8	1.2
from 40/60 to 60/40 <sup>b)</sup>	17.5	9.9	1.4

<sup>a)</sup>Minimum detectable quantity at 3% FSD (S/N >10) and 0.01 AUFS.

<sup>b)</sup>Acetonitrile/water mixture, linear gradient from 40/60 to 60/40 for 30 min.

<sup>c)</sup>t<sub>0</sub> = 1.6 min.

deionized water 혼합액(50/50, v/v)의 이동상 조건에서 용량계수(capacity factor,  $k'$ )가 5.9로 최적의 머무름 특성을 나타내었으며, peak 모양은 상호대칭형으로 peak tailing 현상은 관찰되지 않았다. 이때 기기상 검출한계(S/N>10)는 2.0 ng으로 높은 감도를 나타내었다. Acetonitrile/deionized water 혼합액(60/40, v/v)의 이동상 조건에서 용량계수가 2.8로 C18 column상 매우 빨리 용출되어 223 nm의 비교적 단파장을 이용하여 분석을 시도하는 분석법에는 불순물의 간섭이 우려되었다. 또한 40/60의 혼합액에서는 감도가 4.0 ng으로 낮아 분석의 효율이 떨어지는 것으로 판단되었다. 한편 acetonitrile/deionized water의 gradient 조건에서는 peak의 모양이 상호대칭형이고 column efficiency도 뛰어 났지만, 분석시간이 isocratic 보다 많이 소요되고 단파장을 흡수하는 mandipropamid의 경우 검출기가 안정화되는데 많은 시간이 소요되어 isocratic으로 분석시 불순물의 혼입이 있어 분리가 필요할 경우에만 적용하고자 하였다.

### 3.2. 시료추출 및 정제

농산물 중 중성의 비극성 농약을 추출하는 방법으로는 시료침투성과 추출효율이 우수하다고 알려져 있는 수용성 유기용매를 이용하는 것이 보편적이며, 주로 acetone, acetonitrile 및 methanol을 많이 사용하고 있다. Acetone은 현미와 콩 등의 다소 유지성분이 많은 농산물에서 추출효율이 높으나 비극성불순물 및 chlorophyll 과다 추출로 정제 및 기기 분석시 문제가 될 수 있다. 특히 고추 및 배추와 같이 chlorophyll 함량이 높은 시료에서는 추출 후 액-액 분배와 흡착크로마토그래피만을 이용하여 간섭물질을 제거하는 방법에서는 더욱더 기기 분석시 분석에 어려움이 있을 수 있다. 반면 acetonitrile과 methanol의 추출법은 acetone을 이용하여 추출했을 때보다 chlorophyll이 적게 추출된다는 장점이 있다. 최소의 정제만을 이용하여 분석하려고 하는 이 시험법에서는 chlorophyll 뿐만 아니라, 비극성 불순물의 추출을 최소화하기 위하여 acetone 및 acetonitrile보다는 좀 더 극성인 methanol을 추출용매로 사용하고자 하였다.

액-액 분배법은 크게 추출액을 농축하여 분배하는 방법과 농축하지 않고 분배하는 방법으로 나눌 수 있다. 농축하지 않고 분배만 할 수 있다면 농축하여 분배하는 법에 비하여 분석시간 단축과 농축시 휘발 등의 소실을 막을 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 먼저 추출액을 농축하지 않고 methanol을 이

용하여 추출된 시료액을 50 mL의 포화식염수와 300 mL의 증류수로 희석하고 *n*-hexane, dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 및 dichloromethane을 이용하여 분배하는 방법 중 최적의 분배법을 확립하고자 하였다. 분배혼합액에 100 mL의 *n*-hexane 및 100 mL의 dichloromethane/*n*-hexane 혼합액(20/80, v/v)으로 1회 분배시에는 분배효율이 23%와 87%밖에 되지 않았다. Dichloromethane으로 2회 분배시에는 101%로 수용액으로부터 madipropamid를 전부 분배할 수 있어, 분배법으로 활용하였지만, *n*-hexane에 비하여 불순물이 많이 추출되기 때문에 추가 크로마토그래피 정제과정이 반드시 필요로 하였다. 반면 대상 시료들의 지방 함량이 1%미만이었기에 비극성 지방성분을 제거하는데 효율이 높은 *n*-hexane/acetonitrile법과 같은 지방제거법은 적용하지 않았다.

이온성을 띄지 않은 mandipropamid의 경우 흡착크로마토그래피에 의한 정제가 효율적일 것으로 판단되어 졌으며, C18을 이용한 정제법은 기기분석시에도 같은 원리의 column을 이용하여 분석하기 때문에 C18에서 정제가 되지 않으면 HPLC 분석상에서도 분리가 되지 않기 때문에 서로 다른 원리의 정제과정이 필요하였다. 흡착크로마토그래피는 잔류농약 분석시 가장 많이 이용하는 방법이며, 흡착제로는 silica gel, Florisil 및 alumina가 많이 사용되어 진다. 이 중에서 Florisil은 색소와 지방의 제거가 뛰어나 미국의 FDA나 AOAC등에서 가장 많이 사용하는 방법이다.<sup>11-12</sup> 간편하게 정제할 수 있는 solid-phase extraction (SPE)법의 경우 흡착제의 양이 0.5~1 g으로 제한되어 있어 액-액 분배시 별도의 세척과정이 없는 이 분석법에 적용할 경우 추출물이 많기 때문에 overloading 현상이 발생하여 사용이 어려울것으로 판단되었다. Table 2는 mandipropamid의 흡착크로마토그래피 상 용출특성을

Table 2. Elution profile of mandipropamid on Florisil column

Eluting solvent	Recovery (%)		
	0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL
Ethyl acetate/ <i>n</i> -hexane (20/80, v/v)	0	0	0
Ethyl acetate/ <i>n</i> -hexane (50/50, v/v)	24	56	11
Ethyl acetate/ <i>n</i> -hexane (50/50, v/v) <sup>a)</sup>	63	31	NE <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup>Pre-eluted with 100 mL of ethyl acetate/*n*-hexane mixture (20/80, v/v) and then eluted with ethyl acetate/*n*-hexane mixture (50/50, v/v).

<sup>b)</sup>Not eluted.

나타낸 것이다. *n*-Hexane/ethyl acetate의 혼합용매 용출조건으로 시험한 결과 150 mL의 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합액(20/80, v/v)에서는 mandipropamid가 용출되지 않았고, 혼합액(50/50, v/v)에는 0~100 mL 사이에 80%가 회수되었다. 따라서 혼합액(20/80, v/v) 100 mL로 비극성 불순물을 세척이 가능하였고, 이 혼합액 100 mL를 흘려보낸 후 혼합액(50/50, v/v)을 흘렸을 경우 0~100 mL 분액에 94%가 용출되었다.

Mandipropamid 잔류분을 methanol로 추출하고 액-액 분배와 흡착크로마토그래피 과정을 거쳐 조제한 배추와 고추시료의 경우 일부 색소가 존재하였으나 분석에는 영향을 주지 않았고 acetonitrile/deionized water 혼합액(50/50, v/v)에 재용해 한 최종용액은 2°C 냉장고에서 최소 1주이상 안정하였다. 회수율 시험시 대표적인 크로마토그램은 Fig. 3과 같다. 무처리 포도, 고추, 토마토, 배추 및 감자로 부터의 추출물은 mandipropamid의 분석에 간섭하는 물질은 발견되지 않았다. 따라서 분석법상 정량한계가 기기분석 상의 정량한계와 동일하였고 HPLC/UV/D상의 최소검출량 2 ng(토마토 및 감자의 경우 1 ng)으로부터 산출된 정량한계는 고추, 포도 및 배추의 경우 0.04 mg/kg이었고, 토마토 및 감자의 경우 0.02 mg/kg이었다. 분석법의 정량한계는 잔류허용기준 이하로 분석할 수 있는 수준으로 수확물에 대한 mandipropamid의 안전성을 평가하기에 충분한 감도라고 판단되었다.

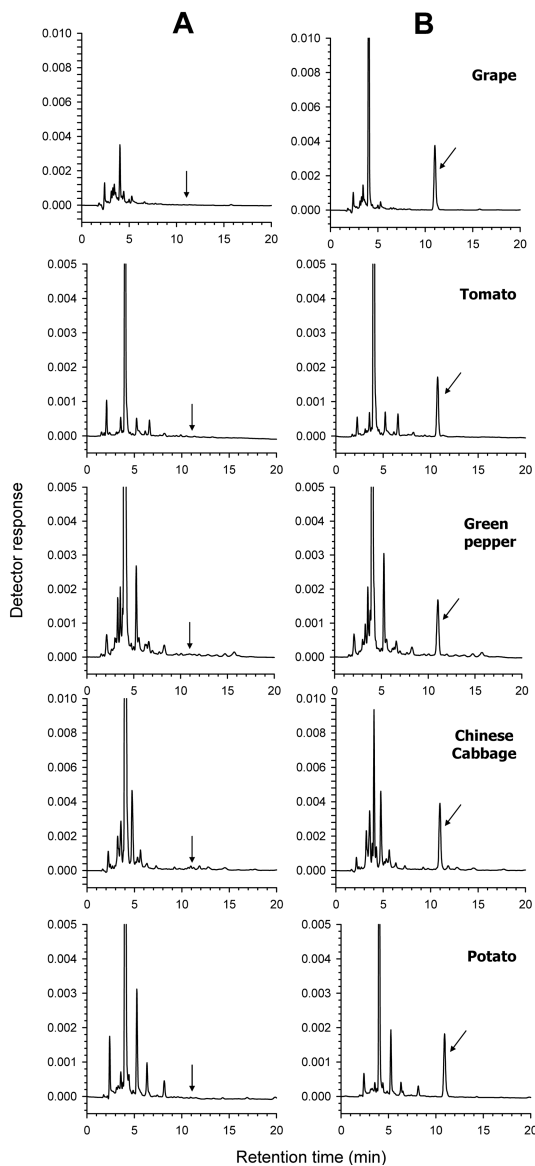


Fig. 3. Typical HPLC chromatograms of extracts from agricultural commodities. A, control; B, fortified with mandipropamid at 0.2~0.4 mg/kg.

### 3.3. 확립된 분석법의 검증

확립된 mandipropamid의 분석법은 공정분석법으로 사용하기 위하여 국제적으로 농약분석법 guideline을 확립하여 운영중에 있는 국제식품규격위원회(Codex) 및 EU의 분석법 guideline에 대한 유효성검증(method validation) 기준을 검토하였다.<sup>13-14</sup> Codex의 분석 guideline은 Table 3과 같이 회수율 처리 농도별 평균 회수율 및 분석오차의 범위가 상이하였다. 처리농도가 0.01 mg/kg이하인 극미량 검출수준을 제외하면 정량시 70~120%의 회수율과 20%미만의 분석오차를 만족해야만 하였다. 정량한계(limits of quantitation, LOQ)는 최소 잔류허용기준(Maximum residue limit)까지 검출이 가능해야 하며, 무처리 시료(control)에서 분석대상성분이 정량한계의 30%를 초과해서는 안된다고 규정하고 있다. EU의 농약잔류분석 validation 기준은 전체적으로

Table 3. Method validation criteria for analysis of pesticide residues in Codex

Concentration level	Repeatability (CV) <sup>a)</sup>	Range of mean recovery (%)
≤ 1 µg/kg	35	50~120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	30	60~120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	20	70~120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	15	70~110
> 1 mg/kg	10	70~110

<sup>a)</sup>Coefficient of variation for analysis excluding sample processing.

Table 4. Recovery and detection limit of mandipropamid residues

Agricultural commodity	Fortification (mg/kg)	Recovery (%) <sup>a)</sup>	LOQ (mg/kg)
Grape	0.4	100.8±1.5	0.04
	2.0	98.9±1.7	
Tomato	0.2	84.6±1.9	0.02
	2.0	94.0±3.2	
Green pepper	0.4	98.5±2.0	0.04
	2.0	98.9±2.8	
Chinese cabbage	0.4	103.7±0.5	0.04
	2.0	95.7±8.3	
Potato	0.2	92.8±1.7	0.02
	2.0	89.3±3.5	

<sup>a)</sup>Mean values for triplicate samples with standard deviations.

불때 국제식품규격위원회의 기준과 유사하였으며, 정량 시 인정되는 회수율의 범위는 70~110%였고 분석오차는 20% 미만의 기준을 만족해야 한다고 규정하고 있다. 아울러 위의 두 분석법 guideline에서는 여러 방법의 재확인 과정(Confirmation)을 두고 있었다.

본 연구에서 확립한 mandipropamid의 경우 공정분석법의 사용목적과 국제적 조화를 위하여 다음과 같은 기준을 두어 분석법 확립을 수행하였다. 분석법의 평균회수율은 70~120% 범위를 만족하도록 하였고, 정량한계는 Codex 기준과 같이 잔류허용기준까지 정량할 수 있는 동시에 0.05mg/kg을 초과하지 않도록 설정하도록 하였다. 특히 분석오차(RSD = 회수율의 표준편차/회수율×100)는 10%이하로 설정하여 공정분석법으로의 이용이 가능하도록 하였다. 또한 회수율 시험시 무처리 시료에 처리농도는 정량한계의 10배 및 정량한계의 50~100배 처리농도에서 각각 3반복으로 측정하고자 하였다. 재확인 과정은 가능하면 mass spectrometry법을 사용하고자 하였으며, 불가능할 경우 특성이 상이한 column이나 유도체를 이용한 재확인법을 확립하고자 하였다.

본 연구에서 확립한 잔류분석법을 이용하여 처리수준에 따른 mandipropamid의 회수율 및 분석오차를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 분석법의 회수율은 시료종류와 처리수준에 따라 큰 차이가 없었으며 전체적으로 83.2~104.1%였고 시료간 분석오차 또한 10% 미만으로 우수한 재현성을 나타내었다. 분석법의 정량한계는 0.02~0.04 mg/kg으로 잔류허용기준의 최소 1/5까지 검출할 수 있는 감도를 나타내었다.

### 3.4. 잔류분의 재확인

한편, 개발된 분석법의 신뢰성을 증대하기 위하여 LC/MS법에 의한 재확인 과정을 추가하였다. 극성이 상이한 column 사용, 유도체방법 및 photodiode array detector (PDA) 등을 사용하여 재확인 할 수도 있으나 mass spectrometry법은 일상적 분석법과 같거나 높은 감도에서 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다. Mandipropamid는 acetonitrile/water의 혼합액만으로도 이온화가 잘 이루어짐으로 이온화를 돕기위해 사용되는 acetic acid 및 formic acid와 같은 산을 필요치 않았으며, HPLC 분석에서 사용된 이동상 조성을 LC/MS에서도 이용하였다. ESI positive-ion mode에서 높은 감도를 나타내었으며, total-ion chromatogram 으로부터 Fig. 4와 같은 mandipropamid의 spectrum을 얻을 수 있었다. 모분자에 proton이 결합한 형태인 (M+H)<sup>+</sup>, m/z 412에서 최고의 감도를 나타내었다. 또한 mandipropamid는 분자구조내 한 개의 chloride를 포함하고 있어 <sup>35</sup>Cl과 <sup>37</sup>Cl간의 동위원소 비율에 따라 m/z 412와 m/z 414 이온들의 비가 3:1 나타났다.<sup>15</sup> 따라서 m/z 414에서도 mandipropamid의 잔류분을 재확인 할 수 있었다. Fig. 5에서는 m/z 412를 이용한 selected-ion monitoring (SIM) mode에서 농산물 중 mandipropamid의 잔류분을 재확인한 chromatogram이며, 불순물과 대상성분과의 선택성이 뛰어난 LC/MS chromatogram은 무처리 시료에서 다른 peak가 전혀 관찰되

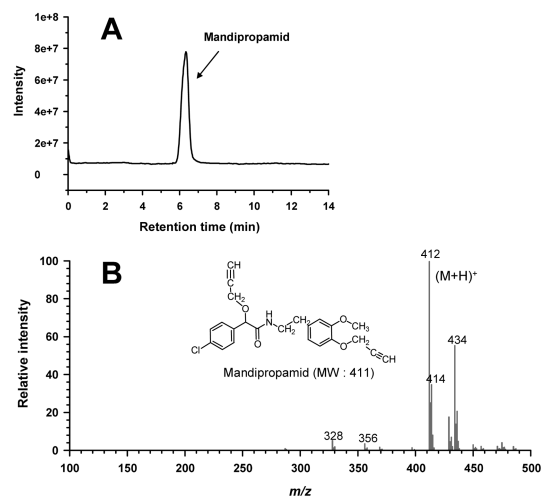


Fig. 4. Total-ion chromatogram (A) and mass spectrum (B) of mandipropamid standard. Mandipropamid standard 50 ng was injected.

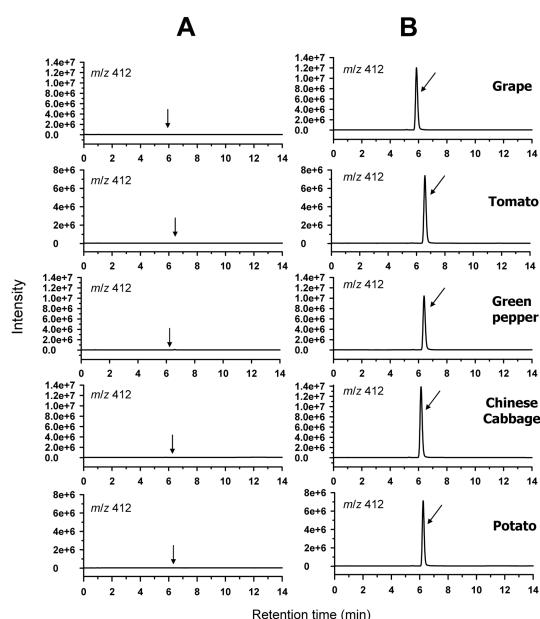


Fig. 5. Typical LC/MS selected-ion monitoring chromatograms for agricultural commodities. A, control; B, fortified with mandipropamid at 0.2~0.4 mg/kg.

지 않았으며, 처리된 시료에서는 mandipropamid의 잔류분만을 확인할 수 있었다. 또한 검출할 수 있는 감도 또한 S/N>10에서 0.001 mg/kg의 잔류분 까지 검출할 수 있는 높은 감도를 나타내었다. 아울러 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우 HPLC/UVD를 이용한 정량법과 더불어 추가적인 정량법으로 사용이 가능할 것으로 판단되었으며, mandipropamid가 LC/MS SIM mode에서 분석이 잘되는 점을 고려할 때 LC/tandem mass spectrometry법의 개발도 가능할 것으로 판단되었다.

#### 4. 결 론

HPLC 및 LC/MS를 이용하여 농산물 시료에서 mandelamide계 신규 살균제인 mandipropamid의 잔류분석법을 확립하였다. 농산물 시료에 methanol을 가하여 추출된 mandipropamid의 잔류분은 dichloromethane 분배법과 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 분석대상 시료로 하였다. octadecylsilyl column을 이용한 HPLC/UVD 분석시 불순물의 간섭은 없었으며, 전체 농산물에 대한 회수율은 83.2~104.1%였으며, 시료에 상관없이 10%미만의 분석오차를 나타내었다. 정량

한계 또한 잔류허용기준의 최소 1/5까지 검출가능한 감도를 나타내었다. 본 연구에서 확립한 mandipropamid의 잔류분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차면에서 국제적 분석기준을 만족할 뿐만 아니라, LC/MS SIM을 이용한 잔류분의 재확인과정의 추가와 분석과정의 편이성 등을 고려할 때 공정분석법으로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

#### 참고문헌

1. C. J. Park and Y. D. Lee, *Life Sci. Res.*, **2**(2), 9-16(2003).
2. C. H. Kwon and Y. D. Lee, *Life Sci. Res.*, **1**(3), 277-286(2003).
3. F. Huggenberger, C. Lamberth and W. Iwanzik, *Proc. BCPC int. Congr. Crop Sci&Tech.* **1**, 87-92(2005).
4. G. Knauf-Beiter and D. Hermann, *Proc. BCPC int. Congr. Crop Sci&Tech.* **1**, 99-104(2005).
5. D. Hermann, D. Bartlett., W. Fischer and H. J. Kempf, *Proc. BCPC int. Congr. Crop Sci&Tech.*, **1**, 93-98(2005).
6. C. Lamberth, A. Jeanguenat, F. Cederbaum, A. D. Mesmaeker, M. Zeller, H. J. Kempf and R. Zeun, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 1531-1545(2008).
7. C. Tomlin, 'The Pesticide Manual', 14th ed., British Crop Protection Council, Surrey, UK, 2007.
8. KCPA, 'Safe Use Standards of Pesticide', Korea Crop Protection Association, Seoul, Korea, 2008.
9. KFDA, 'Korea Food Code', Korean Food and Drug Administration, Seoul, Korea, 2008.
10. KFDA, Advance Notice No. 2008-49 (19 March. 2008).
11. US FDA, 'Pesticide Analytical Manual, Vol 1: Multiresidue Methods (3rd ed.)', US Food and Drug Administration, U.S.A. 1999
12. AOAC, 'Pesticide and industrial chemical residues, In *Official method of analysis*', 17th ed., pp. 1-88, AOAC International, Arlington, VA, USA., 2000.
13. Codex Alimentarius, 'Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis', CAC/GL 40-1993, Rev. 1, 2003.
14. European Commission, 'Guidance Document on Residue Analytical Methods', SANCO/825/00 rev. 7, 2004.
15. F. W. McLafferty and F. Tureek, 'Interpretation of Mass Spectra'. pp. 21-22, University Science Books, Sausalito, U.S.A., 1993.