발 간 등 록 번 호
11-1470550-000004-14

식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서

– 제3판 –

KFDA 식 약 청
식품의약품안전평가원

발 간 등 록 번 호
11-1470550-000004-14

식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서

- 제3판 -

KFDA 식 약 청
식품의약품안전평가원

발 간 사

최근 들어 생활수준의 향상과 더불어 안전한 먹거리에 대한 국민들의 관심과 요구 수준은 갈수록 높아지고 있으며, 이러한 현상을 반영하듯 식품 중 잔류농약의 위해성에 대한 소비자들의 우려도 지속되고 있습니다.

농약은 대부분이 인위적으로 만든 합성 화학물질로서 세계 각국에서는 농산물 및 식품에 대한 잔류 농약의 안전성을 평가하여 사용량 및 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있습니다. 우리나라의 경우도 1988년 DDT 등 17종에 대한 기준 및 규격을 설정한 이래 식품의약품안전청은 최근까지 총 427종에 대한 식품 중 잔류농약기준을 설정하여 관리하고 있습니다.

또한 식품 중에 잔류하는 농약의 안전관리를 위하여 각 기준이 설정된 검사 대상에 적합한 분석방법을 개발하여 수입 및 유통 식품에 대한 검사와 모니터링에 활용하고 있습니다.

하지만 다른 이화학적 검사와 달리 잔류 농약의 경우 사용하는 목적과 품종의 다양성 및 극미량 검출이라는 특성으로 인하여 검사시 전문성, 풍부한 경험 및 지식 등을 요구하므로 일선 분석담당자은 그간 많은 어려움을 피력하여 왔습니다.

식품의약품안전청 식품의약품안전평가원에서는 현장의 이러한 어려움을 해소하고자 식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서를 발간해오고 있습니다. 이번에 발간하는 책자는 세번째 발간하는 증보판으로 잔류 농약 분석 담당자분들에게 전문 지식 습득뿐만 아니라 분석에 관련된 제반 문제의 발생 시에도 많은 도움과 지침이 되기를 바랍니다.

마지막으로 본 책자 발간을 위해 노고를 아끼지 않으신 이영득 교수님께 감사드립니다.

2012. 7.

식품의약품안전평가원장 **이 광 호**

머 리 말

잔류농약 분석은 백만분의 1(ppm, mg/kg) 이하의 분석 대상성분을 고감도로 검출하고 정량하는 미량 분석화학분야이며 다양한 검체 형태로부터 혼입되는 방해성분들의 제거 방법이 복잡하여 가장 어려운 화학분석으로 인식되고 있다. 따라서 잔류분석법을 체계적으로 운영하기 위해서는 농약별로 다양하게 채용되는 선택성 분석기기, 검체 추출 및 정제과정에 대한 깊은 이해가 필수적이다.

현재 잔류농약 분석법에 대하여 소수의 외국서적이 발간되어 있으나 대부분 일부 농약이나 농약 부류에 대한 분석법이 심포지움 시리즈 형태로 출판되어 있어 기본적 원리 및 과정별 해설을 상세히 기술하고 있지 않다. 보다 자세한 기술서로서 미국 FDA에서 발간한 Pesticide Analytical Manual, 이와 유사한 내용으로 되어 있는 AOAC Official Methods 중 잔류농약 분석편을 대표적으로 들 수 있다. 이들 지침서는 기본적으로 분석화학에 대한 기초 지식을 상당히 축적하고 있는 연구 인력이 공정분석법 체계를 운영하고 관리할 목적으로 기술되었기 때문에 분석과정 자체에 대한 기술은 자세하고 표준적이나 그러한 분석과정이 확립되기까지의 상세 원리 및 경험적 해설에 대해서는 대부분 생략되어 있다. 또한 전체 분석과정이 일괄적으로 기술되어 있는 것이 아니라 분석과정의 각 단계별로 선택할 수 있는 방법들을 열거한 후 대상농약 및 검체 특성에 따라 적절히 이를 조합, 하나의 분석과정을 구성하는 체계로 되어 있어 국내에서 잔류농약 분석업무에 종사하는 연구원이 실무적으로 직접 이용하기 어렵다.

잔류농약 분석은 다양한 분석화학 이론을 포함하고 있는데 각 이론들에 대해서는 분석화학 및 기기분석학 분야의 전문 문헌의 형태로 출간되어 있다. 즉 잔류농약 분석의 이론을 이해하기 위해서는 각 분야 문헌에 산발적으로 기술되어 있는 이론적 배경 및 기술을 이들 문헌으로부터 선택적으로 추출하고 이를 체계적으로 습득하여야하는 어려움이 있다.

이러한 어려움을 해소하고자 식품의약품안전평가원『국가잔류농약안전관리 연구사업단』과 공동으로 2009년 7월 식품공전 잔류농약 분석법 실무해설서를 최초로 발간하게 되었다. 해설서는 잔류농약 분석 종사자를 대상으로 분석법의 상세 원리와 실무적 운용을 위한 해설을 중심으로 집필하였으며, 미량 분석 화학적 이론 해설을 반드시 포함하되 이해하기 쉽도록 가급적 복잡한 수식의 사용은 피하고 최대한 직관적으로 기술하고자 하였다. 또한 추가적 해설이 필요하거나 보완적 설명이 필요한 중요한 부분에는 예시적 표와 그림을 삽입하여 이해를 돕고자 하였다. 아울러 식품공전에 이용된 이론을 중심으로 하되 일반적 분석이론 보다는 보다 구체적인 실용이론 및 실무 해설에 중점을 두어 집필하였다.

이번에 발간하는 해설서 제3판에는 식품의약품안전평가원 화학물질과에서 자체적 수행한 연구 사업 및 국가 잔류농약 안전관리 연구 사업단에서 수행한 연구결과를 새로이 포함하고 지난 초판 및 2판에서 누락된 식품공전 분석법 등 54종 농약에 대하여 4개 다성분 및 35개 단성분 분석법에 대한 해설을 대폭 추가하여 2,4-D 등 총 361종 농약에 대한 134개 분석법을 수록하였다. 아울러 부록으로 잔류분석법의 적용에 필수적으로 고려되는 검체별 유지, 수분 및 당 함량을 정리, 수록하여 각 검체에 대하여 최적의 분석법을 적용, 원활한 분석 작업을 수행할 수 있도록 배려하였다.

향후에도 잔류농약 분석법 해설서는 국가잔류농약사업단 및 화학물질과에서 수행한 연구사업 결과를 지속적으로 추가 반영할 예정이다.

– 2012년 7월 저자 이영득 및 편집위원 일동

목 차

1. 잔류농약 분석 개론 ····· 1

1.1 잔류농약 분석의 역사 1

1.2 잔류농약 분석법의 특성 및 구분 3

1.3 일반적 잔류농약 분석과정 5

2. 검체 채취 및 전처리 ····· 8

2.1 검체 채취 8

2.2 검체 전처리 및 보관 9

3. 추출 ····· 11

3.1 기계적 진탕법 11

3.2 Soxhlet 추출법 15

3.3 초음파 추출법 17

3.4 가속용매 추출법 17

3.5 Column 추출법 17

3.6 초임계유체 추출법 18

3.7 고상추출법 19

4. 추출물의 분리 및 정제 ····· 21

4.1 액-액 분배법 22

4.2 크로마토그래피법 26

4.3 기타 정제법 34

5. 기기분석 ····· 38

5.1 기체크로마토그래피법 39

5.2 고성능 액체크로마토그래피법 49

5.3 기체크로마토그래피/질량분석법 62

5.4 액체크로마토그래피/질량분석법 66

6. 정성 및 정량분석 ····· 70
6.1 정성 분석 70
6.2 정량 분석 72
6.3 잔류분의 재확인 75

7. 분석법의 검증 ····· 78
7.1 분석법의 검출 및 정량한계 78
7.2 회수율 및 분석오차 80

8. 식품공전 분석법 해설 ····· 83
8.1 분석법의 범례 및 기준 83
8.2 다종농약다성분 분석법 92
8.2.1 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법 - 제2법 (Multi class pesticide multiresidue methods) 92
8.3 다성분 분석법 105
8.3.1 4.1.3.5 델타메쓰린(Deltamethrin), 바이오레스메스린(Bioresmethrin), 싸이할로쓰린(Cyhalothrin), 싸이플러쓰린(Cyfluthrin), 싸이퍼메쓰린(Cypermethrin), 트라로메스린(Tralomethrin), 펜발러레이트(Fenvalerate), 펜프로파스린(Fenpropathrin), 푸르발리네이트(Fluvalinate), 푸르시트리네이트(Flucythrinate), 퍼메쓰린(Permethrin) 105
8.3.2 4.1.3.6 디노테푸란(Dinotefuran), 아세타미프리드(Acetamiprid), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 크로치아니딘(Clothianidin), 티아크로프리드(Thiacloprid), 티아메톡삼(Thiamethoxam) 115
8.3.3 4.1.3.8 아세페이트(Acephate), 메타미도포스(Methamidophos), 모노크로토포스(Monocrotophos), 오메토에이트(Omethoate) 바미도티온(Vamidothion) 122
8.3.4 4.1.3.9 트리아디메놀(Triadimenol), 프로피코나졸(Propiconazole) 129
8.3.5 4.1.3.10 에디펜포스(Edifenphos), 파라티온메틸(Parathion methyl), 펜설포티온(Fensulfothion) 134
8.3.6 4.1.3.11 펜치온(Fenthion), 포레이트(Phorate), 터브포스(Terbufos) 138
8.3.7 4.1.3.12 아바멕틴(Abamectin), 밀베멕틴(Milbemectin) 146

8.3.8 4.1.3.13 2,4-D(이사디), 디캄바(Dicamba),
클로로페녹시아세테이트(4-Chlorophenoxy acetate) 153
8.3.9 4.1.3.14 벤족시메이트(Benzoximate), 클로펜테진(Clofentezine),
페나자퀸(Fenazaquin), 훼노치오카브(Fenothiocarb),
펜피록시메이트(Fenpyroximate), 헥시치아족스(Hexythiazox),
피리다벤(Pyridaben), 테부펜피라드(Tebufenpyrad) 159
8.3.10 4.1.3.15 메소밀(Methomyl), 옥사밀(Oxamyl) 168
8.3.11 4.1.3.16 아조싸이클로틴(Azocyclotin), 싸이헥사틴(Cyhexatin) 175
8.3.12 4.1.3.17 클레소딤(Clethodim), 프로폭시딤(Profoxydim)
세톡시딤(Sethoxydim) 181
8.3.13 4.1.3.18 펜틴아세테이트(Fentin acetate), 펜틴클로라이드(Fentin chloride),
펜틴하이드록사이드(Fentin hydroxide) 190
8.3.14 4.1.3.20 벤설탑(Bensultap), 칼탑(Cartap), 티오싸이크람(Thiocyclam) 196
8.3.15 4.1.3.21 디메칠디치오카바메이트(Dimethyldithiocarbamates),
에틸렌비스디치오카바메이트[Ethylenebis (dithiocarbamate)s],
프로피네브(Propineb) 202
8.3.16 4.1.3.22 플루퀸코나졸(Fluquinconazole),
이미벤코나졸(Imibenconazole) 208
8.3.17 4.1.3.23 디페노코나졸(Difenoconazole), 페나리몰(Fenarimol),
펜부코나졸(Fenbuconazole), 헥사코나졸(Hexaconazole),
마이클로부타닐(Myclobutanil), 누아리몰 (Nuarimol),
파클로부트라졸(Paclobutrazol) 214
8.3.18 4.1.3.24 엠씨피비(MCPB) 및 트리클로피르(Triclopyr) 222
8.3.19 4.1.3.26 아짐설푸론(Azimsulfuron), 벤설푸론-메칠(Bensulfuron-methyl),
클로르설푸론(Chlorsulfuron), 시노설푸론(Cinosulfuron),
사이클로설파무론(Cyclosulfamuron),
에톡시설푸론(Ethoxysulfuron), 플루세토설푸론(Flucetosulfuron),
할로설푸론-메칠(Halosulfuron-methyl), 이마조설푸론(Imazosulfuron),
아이오도설퓨론-메칠-나트륨(Iodosulfuron-methyl-sodium),
메트설푸론-메칠(Metsulfuron-methyl),
피라조설푸론-에칠(Pyrazosulfuron-ethyl),
치펜설푸론-메칠(Thifensulfuron-methyl) 228
8.3.20 4.1.3.27 카벤다짐(Carbendazim), 베노밀(Benomyl),
티아벤다졸(Thiabendazole) 241

8.3.21 4.1.3.28 클로르풀루아주론(Chlorfluazuron), 디프루벤주론(Diflubenzuron), 플루페녹수론(Flufenoxuron), 헥사프루무론(Hexaflumuron), 루페누론(Lufenuron), 노발루론(Novaluron), 테프루벤주론(Teflubenzuron), 트리플루무론(Triflumuron) 247
8.3.22 4.1.3.29 피로퀼론(Pyroquilon), 트리싸이클라졸(Tricyclazole) 256
8.3.23 4.1.3.30 카보후란(Carbofuran 및 3-Hydroxycarbofuran), 벤푸라카브(Benfuracarb), 카보설판(Carbosulfan), 푸라치오카브(Furathiocarb) 264
8.3.24 4.1.3.31 보스칼리드(Boscalid), 플루토라닐(Flutolanil), 메프로닐(Mepronil), 티플루자마이드(Thifluzamide) 274
8.3.25 4.1.3.32 비페녹스(Bifenox), 에탈풀루라린(Ethalfluralin), 메토라크로르(Metolachlor), 옥시풀루오르펜(Oxyfluorfen), 프레틸라클로르(Pretilachlor), 테닐클로르(Thenylchlor), 트리풀루라린(Trifluralin) 281
8.3.26 4.1.3.33 싸이프로코나졸(Cyproconazole), 디니코나졸(Diniconazole), 푸루실라졸(Flusilazole), 펜코나졸(Penconazole), 터부코나졸(Tebuconazole) 290

8.4 단성분 분석법 299
8.4.1 4.1.4.1 디크로프루아니드(Dichlofluanid) 299
8.4.2 4.1.4.2 알루미늄포스파이드(Aluminium phosphide) 304
8.4.3 4.1.4.3 아미트라즈(Amitraz) 310
8.4.4 4.1.4.4 벤타존(Bentazone) 314
8.4.5 4.1.4.5 오리사스트로빈(Orysastrobin) 319
8.4.6 4.1.4.8 클로르피리포스-메틸(Chlorpyrifos methyl) 325
8.4.7 4.1.4.11 사이플루메토펜(Cyflumetofen) 329
8.4.8 4.1.4.13 에토프로포스(Ethoprophos) 333
8.4.9 4.1.4.16 에트림포스(Etrimfos) 337
8.4.10 4.1.4.18 글리포세이트(Glyphosate) 341
8.4.11 4.1.4.19 이마자릴(Imazalil) 345
8.4.12 4.1.4.21 메타락실(Metalaxyl) 349
8.4.13 4.1.4.24 메트리부진(Metribuzin) 353
8.4.14 4.1.4.26 폭심(Phoxim) 357
8.4.15 4.1.4.27 프로시미돈(Procymidone) 362

8.4.16 4.1.4.29 프로파모카브(Propamocarb) 366
8.4.17 4.1.4.31 펜부타틴옥사이드 (Fenbutatin oxide) 370
8.4.18 4.1.4.32 벤티아발리카브아이소프로필(Benthiavalicarb-isopropyl) 375
8.4.19 4.1.4.33 티오벤카브(Thiobencarb) 379
8.4.20 4.1.4.34 티오디카브(Thiodicarb) 383
8.4.21 4.1.4.35 트리아디메폰(Triadimefon) 388
8.4.22 4.1.4.36 트리클로르폰(Trichlorfon) 394
8.4.23 4.1.4.37 트리프루미졸(Triflumizole) 400
8.4.24 4.1.4.38 트리포린(Triforine) 404
8.4.25 4.1.4.40 싸이로마진(Cyromazine) 408
8.4.26 4.1.4.41 아닐라진(Anilazine) 412
8.4.27 4.1.4.42 베나락실(Benalaxyl) 416
8.4.28 4.1.4.45 부프로페진(Buprofezin) 419
8.4.29 4.1.4.46 에세폰(Ethephon) 423
8.4.30 4.1.4.47 에토펜프록스(Etofenprox) 427
8.4.31 4.1.4.49 헥사지논(Hexazinone) 432
8.4.32 4.1.4.50 톨크로포스-메칠(Tolclofos-methyl) 438
8.4.33 4.1.4.53 비스트리플루론(Bistrifluron) 441
8.4.34 4.1.4.55 디치아논(Dithianon) 445
8.4.35 4.1.4.56 피메트로진(Pymetrozine) 449
8.4.36 4.1.4.57 벤퓨러세이트(Benfuresate) 453
8.4.37 4.1.4.59 에마멕틴 벤조에이트(Emamectin benzoate) 456
8.4.38 4.1.4.60 파목사돈(Famoxadone) 461
8.4.39 4.1.4.61 플루오로이미드(Fluoroimide) 465
8.4.40 4.1.4.63 할록시포프(Haloxyfop) 468
8.4.41 4.1.4.64 오리잘린(Oryzalin) 474
8.4.42 4.1.4.66 스피노사드(Spinosad) 478
8.4.43 4.1.4.67 티람(Thiram) 482
8.4.44 4.1.4.68 다이므론(Dymron) 487
8.4.45 4.1.4.69 디클로르프로프(Dichlorprop) 492
8.4.46 4.1.4.70 메탐-소디움(Metam-sodium) 497
8.4.47 4.1.4.71 메피쿼트 클로라이드(Mepiquat chloride) 500
8.4.48 4.1.4.72 비스피리박-소디움(Bispyribac-sodium) 505

8.4.49 4.1.4.73 에티클로제이트(Ethychlozate) 509
8.4.50 4.1.4.74 씨메트린(Simetryn) 514
8.4.51 4.1.4.75 아시벤졸라-에스-메칠(Acibenzolar-S-methyl) 518
8.4.52 4.1.4.76 이나벤화이드(Inabenfide) 523
8.4.53 4.1.4.77 퀸크로락(Quinclorac) 528
8.4.54 4.1.4.79 테트라코나졸(Tetraconazole) 533
8.4.55 4.1.4.80 포세틸-알루미늄(Fosetyl-aluminium) 537
8.4.56 4.1.4.83 피라족시펜(Pyrazoxyfen) 541
8.4.57 4.1.4.84 하이멕사졸(Hymexazol) 545
8.4.58 4.1.4.86 다조멭(Dazomet) 549
8.4.59 4.1.4.87 비페나제이트(Bifenazate) 553
8.4.60 4.1.4.88 아세퀴노실(Acequinocyl) 557
8.4.61 4.1.4.89 옥사디아길(Oxadiargyl) 561
8.4.62 4.1.4.90 카펜트라존-에칠(Carfentrazone-ethyl) 565
8.4.63 4.1.4.92 티디아주론(Thidiazuron) 570
8.4.64 4.1.4.93 펜트라자마이드(Fentrazamide) 573
8.4.65 4.1.4.94 플러옥시피르(Fluroxypyr) 579
8.4.66 4.1.4.96 피리프탈리드(Pyriftalid) 584
8.4.67 4.1.4.97 메트코나졸(Metconazole) 588
8.4.68 4.1.4.98 트리아자메이트(Triazamate) 592
8.4.69 4.1.4.99 알라니카브(Alanycarb) 595
8.4.70 4.1.4.100 페림존(Ferimzone) 599
8.4.71 4.1.4.101 플루아크리피림(Fluacrypyrim) 603
8.4.72 4.1.4.102 메코프로프-피(Mecoprop-P) 606
8.4.73 4.1.4.103 피리다릴(Pyridalyl) 609
8.4.74 4.1.4.104 스피로메시펜(Spiromesifen) 613
8.4.75 4.1.4.105 퀴날포스(Quinalphos) 617
8.4.76 4.1.4.106 6-벤질 아미노퓨린(6-Benzyl aminopurine) 621
8.4.77 4.1.4.107 벤조비싸이클론(Benzobicyclon) 626
8.4.78 4.1.4.108 카펜스트롤(Cafenstrole) 630
8.4.79 4.1.4.109 사이플루페나미드(Cyflufenamid) 633
8.4.80 4.1.4.110 펜클로림(Fenclorim) 637
8.4.81 4.1.4.111 플로니카미드(Flonicamid) 640

8.4.82 4.1.4.112 플루오피콜라이드(Fluopicolide) 643
8.4.83 4.1.4.114 페녹슐람(Penoxsulam) 647
8.4.84 4.1.4.115 시메코나졸(Simeconazole) 651
8.4.85 4.1.4.116 만디프로파미드(Mandipropamid) 655
8.4.86 4.1.4.117 메소트리온(Mesotrione) 659
8.4.87 4.1.4.118 메트알데하이드(Metaldehyde) 664
8.4.88 4.1.4.119 디메타메트린(Dimethametryn) 668
8.4.89 4.1.4.120 피리벤족심(Pyribenzoxim) 673
8.4.90 4.1.4.121 디비이디시(DBEDC) 677
8.4.91 4.1.4.122 메타미포프(Metamifop) 682
8.4.92 4.1.4.123 메타플루미존(Metaflumizone) 687
8.4.93 4.1.4.124 메트라페논(Metrafenone) 692
8.4.94 4.1.4.125 브로모뷰타이드(Bromobutide) 696
8.4.95 4.1.4.126 스피네토람(Spinetoram) 701
8.4.96 4.1.4.127 아미설브롬(Amisulbrom) 707
8.4.97 4.1.4.128 옥솔린산(Oxolinic acid) 711
8.4.98 4.1.4.129 올소설파뮤론(Orthosulfamuron) 716
8.4.99 4.1.4.130 엠씨피에이(MCPA) 722
8.4.100 4.1.4.131 퀴노클라민(Quinoclamine) 728
8.4.101 4.1.4.132 퀸메락(Quinmerac) 733
8.4.102 4.1.4.133 크로마페노자이드(Chromafenozide) 739
8.4.103 4.1.4.134 클로란트라닐리프롤(Chlorantraniliprole) 744
8.4.104 4.1.4.135 플루벤디아마이드(Flubendiamide) 749
8.4.105 4.1.4.136 피페로포스(Piperophos) 753
8.4.106 4.1.4.148 옥시카복신(Oxycarboxin) 757
8.4.107 4.1.4.149 시아조파미드(Cyazofamid) 762

참고문헌 767

부록 1. 식품 검체별 전처리 방법 769

부록 2. 식품 검체별 유지, 수분 및 당(糖) 함량 771

농약 색인 792

1. 잔류농약 분석 개론

식품 중 잔류농약 수준을 검사 평가하여 안전성을 확보하기 위해서는 정확하고 신뢰성 있는 잔류농약 분석법의 이용이 필수적이다. 잔류농약 분석은 화학 분석 중에서도 mg/kg 이하의 분석 대상성분을 고감도로 검출하고 정량하는 미량분석 분야이다. 다양한 검체 형태로부터 혼입되는 방해성분들을 선택적으로 제거하여야 하는 정제방법이 복잡할 뿐만 아니라 분석결과의 공적, 법적 사용을 위하여 높은 신뢰성이 요구되는 분석법 분야이기도 하다. 이 단원에서는 현재 사용되고 있는 잔류농약 분석법의 기초 이론 및 실질적 기술을 포괄적으로 소개하고자 한다. 즉 추출, 정제, 기기분석 및 재확인 과정에 대하여 현재까지 일반적으로 이용되는 이론 및 기술을 과정별로 설명하고자 한다. 아울러 향후 적용될 최신 분석기술 및 잔류농약 분석법의 발전방향을 제시하고자 한다. 이 단원에서 언급할 분석법은 현재 사용되고 있는 잔류분석법의 대부분을 차지하는 화학적 분석법이며 면역학적 기법을 이용한 immunoassay나 생물학적 bioassay법은 그 용도가 제한적이며 활용성이 낮아 포함시키지 않았다.

1.1 잔류농약 분석의 역사

잔류농약 분석의 역사는 근대 농업에서 유기 합성농약이 대량으로 사용되면서 농산물 및 환경 중 잔존하는 잔류농약의 부작용을 조사 평가하기 위한 연구 과정으로부터 유래한다. 즉 1939년 P. Müller가 DDT를 개발한 이래, 유기 합성 농약은 뛰어난 약효에 힘입어 선진국을 중심으로 1950년대부터 대량으로 사용되기 시작하였다. 그 당시 농약의 개발 과정에서는 해충에 대한 약효를 최우선으로 하고 작물에 대한 약해 및 살포자인 농민에 대한 급성독성 정도만을 추가로 고려하였으며 잔류농약에 의한 농산물 및 환경오염은 관심대상 밖이었다. 주로 사용되던 농약 부류는 유기염소계 살충제였는데, 이들 농약들이 잔효성이 길어 농작물 및 환경 중에 오랫동안 잔류한다는 점이 문제였다. 이러한 잔류성 농약들이 광범위하게 사용됨에 따라 식품 및 환경 중 필연적으로 잔존하게 되는 잔류분으로 인하여 동식물계 특히 비표적 생물계에 대한 만성독성학적 위해 유발 가능성이 제기되기 시작하였다. 여류 생태학자 R. Carson은 1963년에 출간한 단행본 “Silent Spring (침묵의 봄, 또는 조용한 봄)”에서, 환경 중 잔류농약은 먹이사슬에 의한

생물농축과정을 통하여 먹이섭취 최상위에 속하는 조류들에게 만성적 치사를 유발할 것이며 이로 인하여 결국 새들이 지저귀는 소리를 들을 수 없는 조용한 봄을 맞이하게 될 것이라고 경고하였다. 이러한 잔류농약에 의한 만성독성학적 위해 유발 가능성은 전세계적으로 큰 사회적 반향을 일으키게 되었고 이에 따라 미 대통령 과학자문위원회를 중심으로 식품 및 환경 중 잔류농약에 대한 과학적 연구 및 실태조사가 대대적으로 개시되게 되었다.

식품 및 환경 중 잔류농약의 농도는 mg/kg 이하로 매우 낮아 당시의 화학분석 기술로서는 이를 분석하기 어려웠다. 따라서 연구 도구로서 고감도이면서 선택성이 우수한 잔류농약 분석법의 개발은 필수적이었다. 현재에도 그 기본적 원리 및 과정이 여전히 적용되고 있는 잔류분석법의 기초는 1960년대 초반 미국 FDA의 Mills 등에 의하여 제안된 유기염소계 농약에 대한 다성분 잔류분석법이다. 즉 비극성이면서 분자 내에 halogen이 다수 존재하는 농약을 대상으로, acetonitrile에 의한 검체 추출, 추출액의 saline 희석, 액-액 분배 및 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 정제과정을 거쳐 고감도 고선택 electron-capture detector (ECD)를 장착한 gas chromatography (GC)로 기기 분석하는 방법이었다. 그 이후 이 방법은 보다 극성이 낮거나 다양한 구조를 가진 화합물에도 적용이 가능하도록 Luke 등에 의하여 몇 차례 변개되었다.

1970년대에 이르러 등록 사용되는 농약 화합물들이 매우 다양해짐에 따라 대상 화합물의 극성, 해리 특성, 구조적 특징에 따라 다양한 분석법들이 연구 개발되었다. 농산물 및 식품에 대한 잔류농약 분석법은 그 목적상 최고의 분석 감도, 정밀성 및 신뢰도가 보장되어야 하므로 미량 분석기술의 발전에 따라 계속적으로 개선되어 왔다. 즉 고성능 capillary column을 이용한 고분리능 GC법이나 다양한 reversed phase column을 이용한 high-performance liquid chromatography (HPLC) 등과 같은 chromatography 기기분석법, 높은 신뢰성의 정성/정량분석이 가능한 GC/mass spectrometry (MS)나 LC/MS와 같은 hyphenated techniques, 고상추출법 (solid-phase extraction, SPE)이나 hydromatrix를 이용한 검체정제법 등이 적극적으로 도입, 활용되고 있어 기존 분석법들이 계속적으로 변경 개선되고 있다.

1.2 잔류농약 분석법의 특성 및 구분

식품이나 농산물 중 잔류농약 수준을 검사 평가하여 안전성을 확보하기 위해서는 정확하고 신뢰성 있는 잔류농약 분석법의 확립이 필수적이다. 농약제품의 품질 검사를 위한 일반 분석법과 잔류 분석법간 차이점을 표 1에 나타내었다.

표 1. 농약 제품 및 잔류 분석법간의 비교

구분	제품 분석	잔류 분석
분석 대상성분	모화합물, 불순물, 보조제	모화합물, 불순물, 대사산물
검체 조성 (방해물질)	대부분 알려져 있음	알려져 있지 않음
검체 종류	제한적 검체 종류	매우 다양함
분석물질의 함유 농도	% 수준	μg/kg~mg/kg
추출물의 정제과정	대부분 불필요	필수
정밀도	높음	높음
감도	보통	높음
선택성	보통	매우 선택적
재확인 과정	불필요	필요

식품 중 잔류농약의 허용기준이 현재 0.005~50 mg/kg 범위이므로 잔류농약 분석법은 허용기준 이하를 충분히 검출하도록 감도가 높아야 한다. 또한 분석 결과가 대부분 공공의 목적으로 사용되므로 높은 신뢰성을 아울러 요구하고 있다. 즉 식품에 대한 잔류농약 분석법 기준은 분석목적에 따른 다성분 및 개별분석법에 따라 다소 상이하기는 하나 정량한계 0.05 mg/kg 이하 또는 잔류허용기준의 1/2 (잔류허용기준이 0.05 mg/kg 이하인 경우), 회수율 70~130%, 분석오차 10~30% 이하이다. 잔류분석을 수행하는 실험실은 사용하는 각 분석법과 분석요원의 능력이 상기 기준을 만족함을 실험적으로 입증하여야 한다. 즉 주기적 회수율 실험 (분석법별 무처리 검체와 함께 임의의 최소 2수준 3반복 처리검체에 대한 분석 - 제 7장 분석법의 검증 참조) 결과를 통하여 실험실 분석 데이터의 신뢰성을 입증하도록 요구하고 있다.

잔류농약 분석은 화학 분석 중에서도 mg/kg 이하의 분석 대상성분을 고감도로 검출하고 정량하는 미량분석 분야이며 다양한 검체 형태로부터 혼입되는 방해 성분들의 제거방법이 복잡하여 가장 어려운 화학분석으로 인식되고 있다. 또한 작물 재배 시 사용되는 농약의 종류는 매우 다양하여 수백 성분에 달하므로 잔류농약 분석법은 그 분석 목적 및 1회당 분석성분 수에 따라 다성분 분석법 (multiresidue analytical method)과 개별 분석법 (individual analytical method)으로 대별된다.

표 2. 다성분 및 개별 분석법의 특성 비교

특징	다성분 분석법	개별 분석법
분석의 최우선 목적	검색	정량
분석법의 특화	신속성	정밀성
분석 대상성분	유사 특성 화합물군	개별 단성분
정량한계	≤ 0.05 mg/kg 또는 MRL의 1/2	≤ 0.05 mg/kg 또는 MRL의 1/2
회수율	70~130%	70~120%
분석오차 (CV, %)	≤ 30%	≤ 10%

전자의 경우는 분석조작 1회당 검사가 가능한 농약수가 수십 가지 이상으로 분석효율은 매우 높으나 각각의 성분에 대한 분석의 정밀도나 신뢰성은 다소 열등한 단점이 있다. 즉 다성분 분석법에서는 대상성분들을 물리화학적 특성 범위별로 그룹핑하고 그룹별로 검체 추출, 정제 및 기기분석과정에 의하여 검체 분석을 수행하므로 1개 분석 대상성분마다 최적의 분석법을 적용하는 것이 불가능하다. 따라서 각 대상성분에 대하여 최적화된 검체 조제 및 기기분석조건이 적용되는 개별 분석법에 비하여 분석 감도, 정밀성 및 신뢰도가 떨어질 수밖에 없다. 이에 따라 다성분 분석법은 적정한 분석기준을 만족하면서 분석효율에 중점을 두어 개발되었으며 주로 잔류농약검색용 (screening) 목적에 적합하다.

후자의 개별 분석법은 개별 농약성분별로 최적화시킨 분석법으로 다성분 분석법에 비하여 상대적으로 분석의 효율은 낮으나 최고의 분석 감도, 정밀성 및 신뢰도가 보장된다. 따라서 어떠한 검체의 다성분 검색 결과 검출된 의심성분을

보다 정확히 정성 및 정량하며, 특히 법적 및 행정적 목적으로 분석의 신뢰성이 요구될 때 이용된다. 또한 다성분 분석법에 포함시킬 수 없는 성분들에 대하여는 각각의 개별 분석법이 개발 적용된다. 이러한 두 분석체계간 보완적 특성에 따라 미국 FDA에서는 1960년대부터 다성분 분석법과 더불어 개별 분석법을 Pesticide Analytical Manual (PAM) method에 포함시켜 적용하고 있다. 국내에서도 식품의약품안전청 (KFDA)에서 2종의 다성분 분석법과 더불어 150여종의 개별 분석법을 고시하여 두 분석법 체계를 함께 운용하고 있다.

또한 잔류농약 분석법은 동일한 분석 대상성분이라도 검체의 종류에 따라 그 분석법이 상이한 경우가 많다. 즉 표 1에서 나타낸 바와 같이 대상 검체에 따라 추출효율, 방해물질의 종류 및 양이 매우 상이하므로 식품 (농산물) 군별에 따라 특화된 추출 및 정제법이 사용되는 경우가 많다. 예를 들어 식품 (농산물) 검체에서는 유지 (油脂, fat) 함량 (2%)에 따라 비유지 및 유지 검체로 구분하며 추출 및 정제 방법이 상이하다. 또한 당 함량 (5% 이하, 5~15%, 15% 이상) 및 수분함량 (75%)에 따라 추출방법이 상이하며 기타 특수 간섭물질이 관찰되는 검체에 따라 특화된 추출 및 정제법이 사용된다. 따라서 동일한 대상성분이라도 분석하고자 하는 검체의 종류에 따라 신중한 분석법의 선택이 요구된다.

1.3 일반적 잔류농약 분석과정

식품 (농산물) 중 잔류농약에 대한 화학적 분석법의 과정을 간략히 요약하면 다음의 다섯 단계로 진행된다.

1) **분석용 검체의 조제 (preparation of analytical sample)** : 포장이나 시장 등에서 채취한 식품 (농산물) 검체를 분석용 검체의 형태로 전처리하는 과정이다. 검체의 종류에 따라 전처리과정이 규정되어 있으므로 이를 준수하여야 한다. 농산물 검체에서 주로 식용으로 사용되는 가식부를 위주로 하나 분석부위와 반드시 일치하는 것은 아니다. 예를 들어 밀감이나 수박의 경우 껍질은 식용으로 하지 않으나 분석부위에 포함시켜 과실 전체가 분석 대상이 된다.

2) **검체 추출 (extraction)** : 분석용 검체로부터 분석 대상성분을 추출하는 과정이다. 분석 대상성분은 표 1에 언급한 바와 같이 모화합물을 주 대상으로 하며 그 외 독성학적 중요성 (toxicological significance)이 인정되는 불순물 및 분해대사산물이 추가된다. 각 농약별로 대상성분을 규정하는 잔류분 정의 (residue definition)를 참조한다. 예를 들어 endosulfan의 경우 유효성분이 α-endosulfan과 β-endosulfan의 2개 성분이며 생체 및 환경 중에서 endosulfan sulfate가 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이므로 식품 및 농산물 검체에서 분석 대상성분은 3개 성분이며 잔류분 표기는 총 endosulfan을 기준으로 환산, 표시된다.

3) **추출물 (액)의 정제 (purification of the extract)** : 대상성분들에 대한 기기분석이 가능하도록 검체 추출물 (액)을 정제하는 과정이며 일명 cleanup 과정이라고 약칭된다. 현재까지 검체로부터 분석 대상성분만을 정확히 선택적으로 추출하는 방법은 아직 없으며 분석을 간섭하는 물질이 함께 다량으로 추출된다. 이러한 방해물질의 존재로 인해 아무리 선택적인 분석기기를 사용하더라도 심각한 간섭현상이 일반적으로 초래된다. 따라서 이러한 간섭물질을 효과적으로 분리 제거하는 것이 필수적이며 잔류분석에서 가장 많은 시간과 노력이 요구되는 과정이다. 방해물질 제거에 이용되는 기본 원리는 분석 대상 물질과 간섭물질간의 물리화학적 특성 차이에 근거한 분리이다. 가장 보편적으로 이용되는 분리의 원리는 액-액 분배와 크로마토그래피법이다.

4) **기기분석 (determination)** : 분석기기를 이용하여 추출 정제액에 함유된 대상성분을 분석하는 과정이다. 대상성분에 대하여 정성 및 정량분석이 함께 수행된다. 일상적으로 가장 많이 사용되는 분석기기는 GC와 HPLC이며 검출기로는 고감도의 선택성 검출기 (specific detector)가 주로 이용되는데 그 이유는 대상성분의 함량이 극미량이며 정제액이라 하더라도 상당수의 간섭물질이 여전히 포함되어 있기 때문이다.

5) **재확인 (confirmation)** : 기기분석을 수행한 검체액에 대하여 다른 특성이나 분석원리를 이용하여 잔류분을 재확인하는 정성적 과정이다. 앞서 언급한 바와 같이 정제액이라 하더라도 다수의 간섭물질이 여전히 포함되어 있으므로 GC 및 HPLC에서의 머무름 시간과 같은 간단한 크로마토그래피적 정성법으로는 분석한 성분의 확실성을 보장할 수 없는 경우가 많다. 즉 대상성분의 peak와

머무름 시간이 거의 동일한 간섭물질이 혼입될 가능성이 많으므로 이를 분리 특성이 상이한 추가의 크로마토그래피법이나 다른 화학분석법을 이용하여 재확인, 분석의 신뢰성을 확보하여야 한다. 최근에는 정성적 기능이 강력한 질량분석기와 GC나 HPLC를 coupling시킨 GC/MS 및 LC/MS를 이용하여 기기분석을 수행함으로써 이러한 재확인과정을 기기분석과 동시에 수행하는 경우도 많다.

2. 검체 채취 및 전처리

2.1 검체 채취

검체 채취는 잔류농약 분석의 첫 번째 단계로서 모집단에 대한 분석결과의 대표성과 타당성을 좌우하는 매우 중요한 과정이다. 분석 대상 검체는 잔류 수준 및 위해성의 조사, 평가를 위하여 잔류농약 분석이 요구되는 모든 식품 및 농축산물이 포함된다. 검체는 대상 모집단의 특성을 잘 반영할 수 있도록 대표검체 (representative sample)의 형태로 채취하여야 한다. 즉, 모집단 전체에서 무작위성을 충분히 반영하면서 평면적으로 또는 공간적으로 균일하게 채취하여야 한다. 검체 채취방법은 모집단의 크기, 장소, 전수/발췌 조사 또는 검사 목적에 따라 매우 다양하므로 해당 분야나 기관에서 별개로 정한 기준을 준수하도록 한다. 일반적으로 통용되는 분석용 농산물 검체의 채취량을 표 3에 나타내었다.

검체 채취는 분석목적에 해당하는 시기와 장소에서 수행한다. 예를 들어 농산물 중 잔류모니터링을 목적으로 하는 검체는 조사의 시점이 출하시기 (farmer's gate basis)이므로 농가에서 출하시점에 직접 채취하며 식이섭취량 (total diet study) 평가를 위한 basket analysis용 검체는 시장에서 판매하는 상태의 검체를 채취한다. 잔류분석법의 검증을 위하여 농약이 처리되지 않은 무농약 검체를 확보하는 것도 매우 중요하다. 검체 채취 작업 중 중요한 점 중의 하나는 교차오염 (cross contamination)이 발생하지 않도록 하는 것이다. 즉 하나의 대표검체 마다 별개로 채취 작업을 수행하여 검체 간에 상호오염을 차단하여야 한다.

채취한 검체는 잔류분석에 방해가 되지 않는 재료를 사용하여 검체에 손상이 없도록 포장한다. 특히 딸기, 토마토 등과 같이 손상되기 쉬운 검체는 원형이 유지되도록 적절한 용기나 포장법을 사용하여야 한다. 채취한 검체는 즉시 분석실험실로 운송하며, 24시간 내에 실험실로 운송할 수 없을 경우는 분석성분의 분해 등 검체 내 변화를 최소화하기 위하여 냉동처리 후 운반하여야 한다.

2.2 검체 전처리 및 보관

실험실에 도착한 검체는 원칙적으로 즉시 전처리 (前處理)하여 잔류분석용 검체를 조제한다. 농산물 검체의 특성에 따라 정해진 분석부위를 얻도록 전처리하는 방법을 표 3에 나타내었다. 앞서 언급한 바와 같이 식용으로 사용되는 가식부를 위주로 하나 분석부위와 반드시 일치하는 것은 아니라는 점을 유의한다. 검체 종류에 따라 채취량이 많을 경우에는 2, 4, 6, 8분법으로 균일하게 절단하고 각 부분을 혼합하여 대표검체를 얻는다.

전처리한 분석용 검체에 대하여 즉시 잔류분석과정을 수행하는 것이 가장 바람직하지만 대부분 현실적으로 가능하지 않기 때문에 분석 시까지 검체를 보관하는 경우가 많다. 검체를 보관하는 경우에는 보관기간 중 분석성분의 분해를 방지하기 위하여 최소한 -20℃ 이하의 냉동조건을 유지하여야 하며, 특히 동·식물체내 효소에 의한 분해를 방지하기 위해서는 -70℃ 이하의 초저온 (deep freezing) 보관도 필요하다. 보관용기는 500~1,000 mL정도의 유리용기가 바람직하나 파손의 우려가 있을 경우 분석에 방해가 되지 않는다고 확인된 재료의 다른 용기 (polyethylene bag 등)도 사용 가능하다.

표 3. 농산물 검체의 잔류농약 분석을 위한 검체채취 및 전처리 방법

농산물	검체 전처리	검체량 (kg)
벼	현미를 분쇄 (40 mesh 이상)한다.	1
보리 (쌀보리, 맥주맥 포함)	알곡을 분쇄 (40 mesh 이상)한다.	1
밀	〃	1
옥수수	〃	1
콩류 (콩, 팥, 녹두 등)	종실을 분쇄(40 mesh 이상)한다.	1
유채, 땅콩	〃	1
무 (순무포함)	잎과 뿌리를 구분하여 분석하되 뿌리에 묻어 있는 흙은 가볍게 물로 씻어 내어 세절한다.	2
쑥갓 (미나리 등)	변질 잎 및 뿌리 제거 후 세절한다.	1
파 (셀러리포함)	외피 및 뿌리 제거 후 세절한다.	1
고추	잎과 열매를 구분하여 분석하되 열매는 꼭지 제거 후 세절한다.	1
마늘	생육시기에 따라 풋마늘과 종구로 구분하여 분석하되 풋마늘은 변질 잎 및 뿌리를 제거하고 종구는 외피제거 후 세절한다.	2
수박	꼭지를 제거하여 세절한다.	5 (5개)
포도	꼭지를 제거한다.	2 (5송이)
감귤	외피와 과육의 구분 없이 세절한다.	2
차	생엽, 제품, 침출액으로 구분한다.	1
참다래	꼭지제거 후 세절한다.	2
기타 작물	작물의 가식부를 고려하여 위에 명시한 전처리 방법에 준한다.	적량

3. 추 출

추출은 검체 중의 농약성분을 용매 등으로 녹여내는 작업으로써 검체와 분석대상성분을 분리하여 잔류분석을 하기 위한 첫 번째 과정이다. 추출의 원칙은 대상성분을 효율적로 추출하되 분석에 간섭하는 물질은 최소화하는 것이다. 분석용 검체로부터 잔류농약을 추출하기 위해서는 대상 검체의 종류 및 분석성분에 따라 다양한 방법이 사용된다. 일반적으로 잔류농약의 추출에 사용되는 방법을 열거하면 다음과 같다.

잔류농약 추출법
- 기계적 진탕법 (shaking, blending, homogenization 등)
- Soxhlet 추출법
- 초음파 추출법 (ultrasonication)
- 가속용매 추출법 (accelerated solvent extraction, ASE)
- Column 추출법
- 초임계유체 추출법 (supercritical fluid extraction)
- 고상추출법 (solid-phase extraction, SPE)

이들 방법 중 가장 일반적으로 사용되는 방법은 적절한 추출용매를 가하고 기계적으로 마쇄 진탕하여 검체로부터 대상 농약성분을 용매에 용해, 추출하는 방법이다. 그 외 방법들은 특정 농약(군) 및 검체 종류에 대하여 추출과정의 효율성 및 간편성 등을 위하여 사용되며 기계적 진탕법에 비하여 각기 장단점이 있으므로 각 방법의 특징을 상호 비교하여 적절히 선택할 수 있다.

3.1 기계적 진탕법

가장 일반적으로 사용되는 간편한 추출방법으로 분말이나 가는 입자 형태의 곡류 등은 진탕법, 비교적 큰 입자가 섞여 있으면서 분말로 만들기 힘든 세절채소, 과실류는 blending 또는 homogenization하여 추출한다.

진탕법은 Erlenmeyer flask와 같은 추출용기에 일정량의 검체와 검체에 대하여

2~5배량의 추출용매를 가하고 진탕기 (보통 200 rpm)에서 30분 내지 수시간 진탕하여 추출한다. Blending과 homogenization은 일정량의 검체를 각각 blender 컵이나 homogenizer컵에 넣고 2~5배량의 추출용매를 넣은 후 1~5분간 고속 마쇄하면서 추출하는 방식은 동일하다. 그러나 blender의 경우 회전수가 3,600 rpm 이면서 회전구동부가 하부에 위치한 반면, 후자의 homogenizer는 회전수가 최고 10,000~15,000 rpm으로 보다 고속이고 회전구동부가 상부에 장착되어 있는 점이 다르다. Blender는 저렴하고 마쇄 효율이 우수하나 회전구동부가 하부에 위치하여 컵과 구동부간 연결부위가 느슨해질 경우 가연성 추출용매가 회전모터로 흘러들어가 폭발할 위험이 있다. 이를 방지하기 위하여 구동부의 전기방전을 밀봉한 폭발 방지형 (explosion-proof)이 있으나 고가이다. Homogenizer는 회전구동부가 상부에 있어 폭발의 위험성은 없으나 마쇄 성능이 떨어지는 단점이 있다. 기계적 진탕법에서 추출 효율은 회전수와 진탕시간의 곱인 총 진탕회수로 결정되기 때문에 두 추출법간 효율 차이는 없다. 단지 진탕법이 추출과정에 보다 많은 시간이 소요되나 다수의 검체를 동시에 추출하는 특성을 감안하면 단위 검체 당 소요시간도 양 방법 간에 큰 차이가 없다. 추출용기는 유리 또는 stainless steel 재질이므로 일상적 용매를 사용할 경우 용기로부터의 오염은 없다. 단지 마개 및 구동부와의 연결부위는 일상적으로 사용되는 고무나 플라스틱 재질을 사용할 경우 간섭물질이 용출될 수 있으므로 반드시 PTFE (Teflon™)나 최소한 silicon rubber와 같은 무용출성 비활성 재질을 사용하여야 한다.

추출 혼합물은 진탕이나 마쇄 후 여과하거나 원심분리하여 추출액과 검체를 분리한다. 여과는 주로 여지를 사용한 흡인여과법이 보편적인데 사용하는 여지는 pore size가 일상적인 10~20 μm보다는 2~5 μm인 것을 사용, 보다 미세 여과하여야 후속 정제과정인 액-액 분배에서 확실한 층 분리에 유리하다. 산이나 alkali 조건의 추출용매를 사용하여 여지가 손상되거나 간섭물질이 용출될 염려가 있을 경우에는 유리섬유필터 (glass-fiber filter)를 사용한다. 또한 미세 분말이 많거나 유지 함량이 높아 여과하기 곤란한 검체의 경우에는 Hyflo Super Cel이나 Celite 545와 같은 여과 보조제 (filter-aid)를 여지 위에 0.5~1 cm 정도를 깔아 사용하면 미세 입자를 미리 걸러주기 때문에 보다 효율적으로 여과할 수 있다. 원심분리를 할 경우에는 검체 및 추출용매에 따라 다소 상이하나 대개 수천 g (또는 수천 rpm)에서 10~30분간 수행하여 상등액을 취하면 된다. 원심분리용기는 유리 재질이 가장 바람직하며 polypropylene (PP) 재질을 사용할 경우 예비시험에

의하여 간섭물질 용출 여부를 확인하여야 한다. 또한 대부분 휘발성 유기용매를 사용하므로 비활성 재질의 마개를 사용하여 완전히 밀봉하여야 한다.

기계적 진탕법을 포함하여 추출용매를 사용하는 추출법에서 가장 중요한 사항은 최적 추출용매의 선정이다. 잔류농약을 분석검체로부터 추출할 때 사용되는 용매는 다음과 같은 사항을 종합적으로 검토하여 적정 용매를 선택한다.

최적 추출용매의 선택을 위한 주요 고려 사항
- 분석 대상성분의 극성 (지용성 또는 수용성)
- 대상성분의 추출용매에 대한 용해도
- 분석 검체의 종류 (간섭물질의 종류 및 양)
- 적용 분석법 (다성분 또는 개별 분석법)
- 분석 대상성분과의 반응성
- 용매의 독성
- 용매의 휘발성
- 용매의 순도, 정제의 용이성, 가격 등

최우선적으로 대상성분의 극성과 용매에 대한 용해도를 비교하여 충분한 용해도를 나타내는 용매를 선정한다. 용해도 자료가 없더라도 일반적으로 극성 화합물은 극성, 비극성 화합물은 비극성용매에 대한 용해도가 높으므로 대상성분의 log P_{ow} (n-octanol/water 분배계수)와 용매의 극성을 알면 근사적 용해도를 추정할 수 있다. 잔류농약 분석에 주로 사용되는 용매의 극성 순을 표 4에 나타내었다. 추출뿐만 아니라 액-액 분배, 크로마토그래피 정제 및 HPLC에서 이러한 극성순은 매우 중요하다.

그러나 대상성분의 용해도가 높을수록 최적 추출용매는 아니다. 왜냐하면 추출용매에 의한 검체 중 간섭물질의 추출량이 많을수록 정제과정이 복잡해질 수 있기 때문이다. 다성분 분석법의 경우에는 동시에 추출하여야 하는 성분들의 극성 범위가 개별 분석법에 비하여 넓으므로 추출용매 선택의 폭이 좁다. 산이나 염기를 포함하는 추출용매를 사용할 경우에는 대상성분에 대한 가수분해 등과 같은 반응성이 없음을 확인하여야 한다. 용매의 휘발성은 추출액을 증발시키는 과정이 후속으로 포함될 경우 분석 효율에 영향을 미친다. 또한 분석자에게

상대적으로 안전하고 정제하기 쉬운 저렴한 용매를 가급적 사용한다.

표 4. 잔류농약 분석용 용매의 극성

순번	용 매 명 (극성지수)	순번	용 매 명 (극성지수)
1	H_2O (10.2) (극성)	11	Isopropanol (3.9)
2	Acetic acid (6.0)	12	*n*-Butanol (3.9)
3	Acetonitrile (5.8)	13	Dichloromethane (3.1)
4	Methanol (5.1)	14	Diethyl ether (2.8)
5	Acetone (5.1)	15	Benzene (2.7)
6	Methyl ethyl ketone (4.7)	16	*p*-Xylene (2.5)
7	Ethyl acetate (4.4)	17	Toluene (2.4)
8	Ethanol (4.3)	18	*n*-Heptane (0.2)
9	Chloroform (4.1)	19	*n*-Hexane (0.1)
10	Tetrahydrofuran (4.0)	20	Cyclohexane (-0.2) (비극성)

식품 및 농산물 검체의 추출에 보편적으로 사용되는 용매와 방법을 표 5에 나타내었다. 수분을 함유하고 있는 검체의 경우 대부분의 중성 잔류분은 검체 입자 표면이나 내부에 존재하고 그 주위가 수분으로 수화되어 있기 때문에 물과 섞이지 않는 비극성 유기용매를 직접 사용할 경우 검체 내부로의 침투성이 낮아 충분한 추출 효율을 얻을 수 없다. 따라서 acetone, acetonitrile, methanol과 같은 수용성 유기용매를 주로 사용한다. 곡류 등 건조검체의 경우는 일반적으로 건조된 상태에서는 수용성 유기용매에 의한 추출효율이 낮다. 또한 비극성 농약에 대한 흡착성이 다소 강한 편이다. 따라서 일반적으로 추출 전에 일정량의 수분을 첨가하여 습윤화한다.

물과 섞이지 않는 비극성 유기용매로 직접 추출하고자 할 때에는 검체에 다량의 건조제 (무수 sodium sulfate 등)를 가한 후 혼합하는 탈수과정이 추출에 앞서 필요하다.

표 5. 식품 및 농산물 검체의 용매추출법

검체 종류	대상 농약	추출용매
비유지 식품	중성 화합물	- 수용성 용매 (acetone, acetonitrile, methanol 등) - 검체를 탈수한 후 비극성 용매 (ethyl acetate, ether 등)
	약산성 화합물	- 검체를 산성화한 후 비극성 또는 극성 용매
	약염기성 화합물	- 검체를 중성 또는 약염기화한 후 비극성 또는 극성 용매
유지 식품	중성 화합물	- 검체를 탈수한 후 비극성 용매

약산 또는 약염기성 대상성분에 대해서는 2가지의 추출법을 사용할 수 있다. 하나는 이온억압 (ion-suppression) 조건으로 조절하여 비이온화 지용성 화합물 형태가 되도록 한 후 비극성 유기용매로 추출하는 방법이다. 즉 약산 화합물의 경우 검체나 추출용매의 pH를 pKa와의 1.5이상의 차이를 둔 산성조건으로 조절하면 95%이상이 이온억압상태가 되고 대상 화합물은 지용성 특성을 갖도록 하는 것이다. 약염기성 화합물의 경우는 반대로 짝산 pKa와의 1.5이상의 차이를 두는 염기성 조건으로 조절하면 된다. 다른 하나의 방법은 이온억압과는 반대로 완전 이온화 상태로 검체나 추출용매의 pH를 조절하여 이온상태의 대상 화합물을 수용성 용매로 추출하는 방법이다. 두 가지 추출법 중 어느 방법이 추출효율 및 간섭물질의 최소화에 유리한 지는 검체의 종류 및 대상 화합물의 pKa 값과 안정성에 따라 다르므로 사전에 충분한 검토가 필요하다. 일반적으로 산성조건이 염기조건에 보다는 간섭물질의 공(共)추출 측면에서 유리한 경우가 많으며 화합물의 안정성을 위하여 강산 및 강염기 조건은 사용하지 않는 것이 좋다. 한편 이온억압에 요구되는 pH가 너무 강산 및 강염기 조건일 경우에는 염을 첨가, 이온강도를 높임으로써 이온억압 효과를 증대시켜 추출효율을 향상시킬 수 있다.

3.2 Soxhlet 추출법

일명 exhaustive extraction이라고도 불리며 유지 및 건조식품 또는 통상의 방법으로는 추출효율이 낮은 농약성분을 추출할 때 사용하는 추출법이다. 유리제 Soxhlet 장치를 사용하여 용매가 가열과 응축과정을 거쳐 순환하면서 검체 중의 농약성분을 연속적으로 추출하는 방법이다.

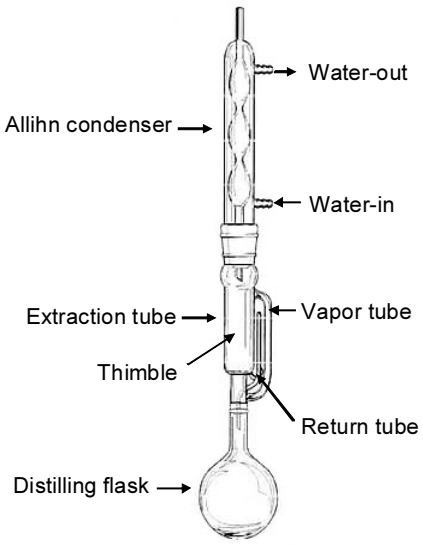


그림 1. Soxhlet 추출장치

즉 하부의 플라스크에 추출용매를 넣고 extractor내 원통여지 (간섭물질이 관찰될 경우에는 sintered glass funnel을 사용)에 일정량의 검체를 넣는다. 플라스크를 가열하면 용매 증기는 증발관을 통하여 상승하고 extractor 상부에 장착된 냉각관 (condenser)에서 응축하여 원통여지 내 검체로 점적되어 검체를 추출하기 시작한다. Extractor내 추출액이 일정 수준이상으로 증가하면 siphon 원리에 의하여 extractor와 flask 간에 별도로 연결된 유리관을 통하여 추출액은 flask로 다시 흘러간다. 추출액 중 분석성분은 대부분 용매보다 끓는점이 매우 높으므로 용매의 증기에는 포함되지 않는다. 따라서 검체는 항상 새로운 용매로 추출하는 셈이 되고 추출된 성분은 flask에 농축되게 된다. 보통 이러한 siphon 순환이 4~8회/시간이 되도록 가열하며 8~24시간 동안 추출한다. 검체나 대상성분에 따라서는 추출효율을 높이기 위하여 물 등을 첨가한 혼합용매를 사용하기도 한다. 광범위한 분석성분을 검체의 종류에 관계없이 효율적으로 추출하는 것이 가능하며 사용이 간편한 장점이 있으나 추출시간이 길고 장치의 설치 및 운용이 번거로운 단점이 있다.

3.3 초음파 추출법 (ultrasonication)

검체에 추출용매를 넣고 초음파의 고속 진동을 이용하여 농약성분을 추출하는 방법이다. 주로 초음파세척기를 이용하여 5~30분간 추출한다. 조작이 쉽고 추출시간을 단축할 수 있으나 대상성분 및 검체 종류에 따라 회수율과 재현성이 일정하지 않은 단점이 있다. 또한 가연성 용매를 사용할 경우 발화의 위험이 있다.

3.4 가속용매 추출법 (accelerated solvent extraction, ASE)

유기용매와 함께 온도와 압력을 증가시킴으로 소량의 용매로 농약성분을 신속하게 추출할 수 있는 추출법으로 10 g의 검체를 추출할 경우 용매 약 15 mL와 15분 정도의 시간만이 소요되는 매우 효율적인 추출법이다. 특수하게 설계 제조된 별도의 추출기를 이용하며 고온과 고압에 견디도록 만들어진 금속성의 추출 셀에 검체를 채우고 온도 (100℃)와 압력 (1,500~2,000 psi)을 증가시키면서 용매를 흘리게 되면 추출용매의 점도, 확산성, 용매강도, 용해도 등 용매의 물리적 특성이 추출에 적합하도록 변화되면서 추출 효율이 증가하므로 추출 효율이 매우 높은 것이 특징이다. 주로 수분함량이 적은 곡물과 같은 고체 검체에 적용이 가능하며 수분이 많은 채소류나 과일의 경우에는 추출 전 동결건조 등의 방법으로 검체 중 수분을 제거하는 것이 필요하다.

3.5 Column 추출법

이 방법은 특별한 장치를 사용하지 않고 주로 육류나 어류 등 동물성 검체로부터 비극성 농약을 추출할 때 사용된다. 육류나 어류검체에 다량의 건조제 (anhydrous sodium sulfate, 약 100 g/10 g 검체)를 가하고 혼합 마쇄하여 검체 중 수분을 제거한다. 내경 22 mm의 유리관에 건조 검체를 충전한 후 *n*-hexane과 같은 비극성 용매를 서서히 용출시켜 추출한다. 매우 간편하나 추출 효율이 낮으며 추출이 용이한 농약 성분 및 검체에만 선택적으로 적용할 수 있다는 점이 단점이다.

3.6 초임계유체 추출법 (supercritical fluid extraction)

초임계유체 추출법 (supercritical fluid extraction, SFE)은 검체 추출에 있어 일반 유기용매가 아닌 초임계유체를 사용하는 방법이다. 초임계유체란 고체-액체-기체의 상평형에서 임계점 이상의 온도와 압력조건하에서 존재하게 되는 유체 (流體)로 액체 또는 기체라고 구별할 수는 없으나 용해력을 조절할 수 있는 고밀도의 유동성 물질의 형태이다.

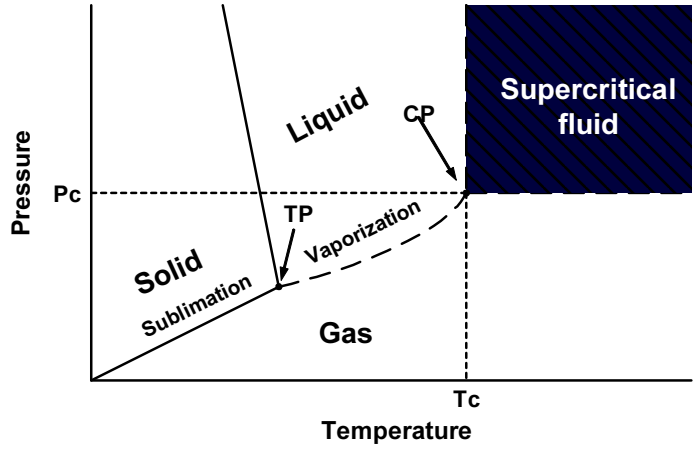


그림 2. 고체–액체–기체–초임계유체 상평형도
TP, 삼중점 (triple point); CP, 임계점 (critical point);
Pc, 임계압력 (critical pressure); Tc, 임계온도 (critical temperature)

초임계유체는 기체와 같은 높은 침투성과 액체와 같은 강한 용해력을 나타내므로 검체 추출에 매우 바람직한 특성을 가지고 있다. 주로 사용되는 기체는 탄산가스 (CO_2)나 nitrous oxide (N_2O)이다. 이 중 CO_2는 임계온도와 임계압력이 낮으며, 독성과 활성이 낮은 초임계유체로서 액체와 비슷한 성질을 가지고 점도는 기체와 유사하여 고체 검체내의 미세공극을 빠르게 통과할 수 있다. 안전하고 임계온도나 임계압력이 낮아 (37℃, 73 atm) 쉽게 초임계유체화 할 수 있기 때문에 열분해가 우려되는 대상성분도 용이하게 추출이 가능하다.

이들을 초임계유체로 사용할 경우 비극성의 특성을 나타내므로 보다 극성의 대상성분을 추출하기 위해서는 소량의 극성용매 (modifier)를 첨가할 수 있다. 주로 사용되는 modifier로는 methanol, propanol, THF, acetonitrile, formic acid 등이다. 이 추출법은 추출효율이 우수할 뿐만 아니라 선택적 추출이 가능하여 간섭물질의 공추출을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 높은 압력과 온도를 유지하는 고가의 특수 장치가 필요하고 또한 추출물이 용출되는 restrictor tube가 매우 가늘어 막힘 (clogging) 현상이 자주 발생, 일상적으로 기기를 운용하기가 어렵다는 것이 단점이다.

3.7 고상추출법 (solid-phase extraction, SPE)

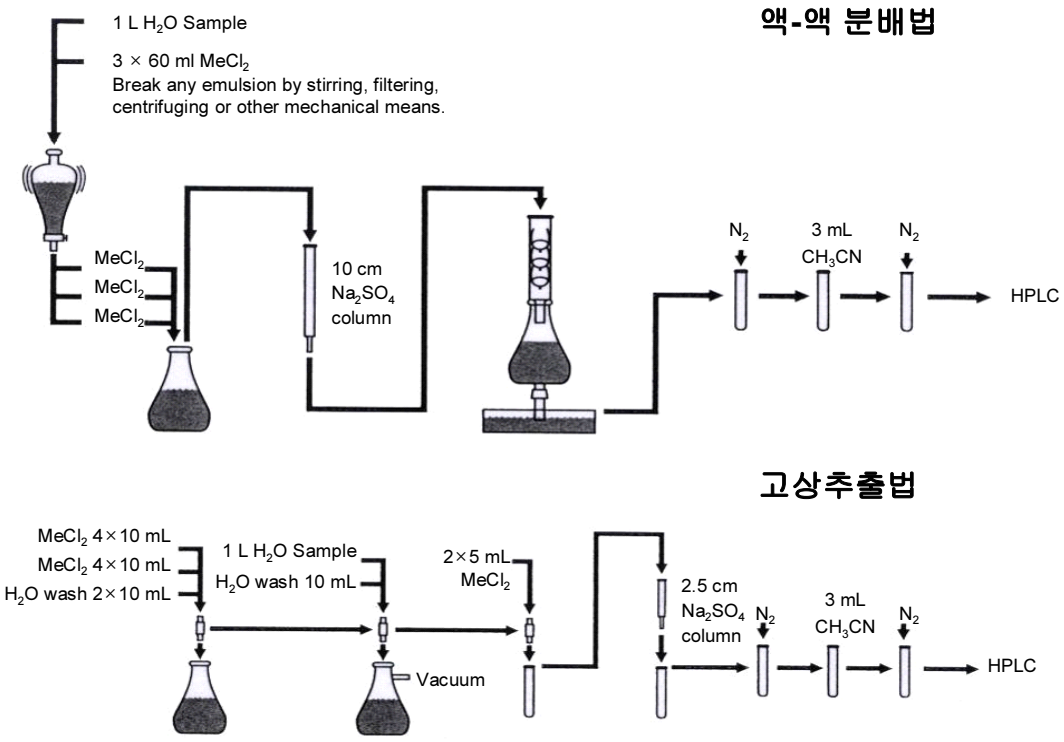


그림 3. 물 (액체) 검체에 대한 액-액 분배법과 고상추출법 (SPE)의 추출과정 비교

고상추출법은 소량 (100 mg~수 g)의 흡수제 (sorbent)가 담긴 카트리지에 액체나 기체 검체를 통과시켜 대상성분들을 선택적으로 포집 (trapping)한 후 소량의 용출용매로 용리시키는 추출법이다. 포집의 원리로는 대상 화합물의 종류에 따라서 흡착 (silica, alumina, Florisil™, graphitized carbon, polystyrene-divinylbenzene copolymer resin, Tenax GC™ 등), 분배 (C_{18}, C_8 등) 및 이온교환 (aminopropyl 등의 약음이온, carboxypropyl 등의 약양이온, 4차 암모늄의 강음이온, sulfonate 등의 강양이온 교환수지)를 다양하게 이용할 수 있다. 그림 3에 나타낸 바와 같이 추출과정이 단순하고 용매 및 농축시간이 절약되는 장점이 있다. 그러나 대상 검체의 혼탁, 오염정도에 따라 흡수제의 용량이 조절되어야 하고 추출효율도 가변적인 단점도 있어 액-액 분배법과의 적절한 비교 선택이 필요하다. 이러한 고상 추출법의 원리는 검체 추출과정 뿐만 아니라 후술할 추출액의 정제과정에서도 폭넓게 이용된다.

4. 추출물의 분리 및 정제

대상성분들을 기기 분석할 수 있도록 검체 추출물(액)을 정제하는 과정이며 일명 cleanup 과정이라 불린다. 보통 분석 대상성분을 검체로부터 추출하면 분석을 간섭하는 물질도 함께 다량으로 추출된다. 이러한 방해물질은 아무리 선택적 분석기기를 사용하더라도 기기분석 과정에서 심각한 간섭현상을 초래한다. 따라서 이러한 간섭물질을 효과적으로 분리 제거하는 것이 필수적이며 잔류분석에서 가장 많은 시간과 노력이 요구되는 과정이다. 방해물질 제거에 이용되는 기본 원리는 분석 대상물질과 간섭물질간의 물리화학적 특성 차이에 근거한 분리이다. 가장 보편적으로 이용되는 분리의 원리를 다음에 요약하였다.

잔류농약 분석에서의 주요 정제법
- 액-액 분배법 (liquid-liquid partition)
극성 추출액의 비극성 용매에 의한 분배
Petroleum-acetonitrile partition
Ion-associated partition
- 크로마토그래피법 (chromatography)
Column 크로마토그래피 (흡착, 분배, 겔 침투, 이온교환)
박층 크로마토그래피 (thin layer chromatography, TLC)
고상추출법 (solid-phase extraction, SPE)
- 기타
Sweep co-distillation
침전법 (응고법, coagulation)
화학처리법 (탈황화, 가수분해, 산화 등)

추출액 정제의 정도는 검체로부터 추출되는 간섭물질의 양과 종류 그리고 분석기기의 선택성에 의해서 좌우되며 위의 방법 1종 이상 (보통 2종)을 연속 조합하여 수행한다. 예를 들면 추출액 → 액-액 분배 → 크로마토그래피 → 기기분석의 순이다. 추출액에 대하여 2종 이상의 정제과정을 조합할 경우에는 서로 다른 분리 원리를 적용하여야 정제효과가 높다. 일반적으로 검체로부터

함께 추출되는 간섭물질은 유지 등 일부 성분을 제외하고는 미지의 화합물이므로 분석성분과의 물리화학적 특성 차이를 정확히 알 수 없어 맞춤형 분리 원리를 적용하기 힘들다. 또한 문제가 되는 물질은 대상성분과 유사한 특성을 가진 화합물들이므로 하나의 정제원리를 반복 적용한다 하더라도 분석성분과 간섭물질 간 분리능은 향상되지 않는다. 따라서 서로 다른 분리 원리를 적용하여야만 분석성분과 간섭물질 간에 분리가 일어날 확률이 상대적으로 높다.

4.1 액-액 분배법

액-액 분배법은 대상성분의 서로 섞이지 않는 두 용매간 분배계수의 차이를 이용하여 불순물을 제거하는 방법이다. 분리 효율은 그다지 높지 않아 분배 후 직접 기기분석에 공시하는 경우는 드물며, 주로 추출액 중 간섭물질의 1차적 정제에 많이 사용된다. 즉 기기분석을 위한 최종 정제과정으로 가장 많이 사용되는 크로마토그래피법은 분리 효율은 높으나 검체 주입량이 매우 작은 (수 mg~수백 mg) 단점이 있다. 따라서 간섭물질이 양 자체가 많은 추출액에 대하여 직접 적용시키기 힘들다. 분배법은 처리할 수 있는 검체량이 비교적 크므로 불순물의 양을 줄이기 위한 조정제 방법으로 가장 많이 사용된다. 또한 ion-associated partition과 같은 일부 분배법의 경우는 그 분리 효율이 높아 직접 기기분석에 공시할 수도 있다.

1) 극성 추출액의 비극성 용매에 의한 분배

수용성 용매 추출액에 섞이지 않는 비극성 용매를 가하고 진탕하여 두 층이 분리되면 추출액 중의 분석성분을 비극성 용매 쪽으로 분배시켜 극성이 높은 각종 불순물 제거하는 방법이며, 주로 중간 극성~비극성 (대개 log P_{ow} 2 이상)의 해리하지 않는 중성 성분 (neutral compound)에 대한 정제에 사용된다. 수용성 추출액은 검체 추출법에서 언급한 바와 같이 추출용매인 acetonitrile, acetone, methanol과 검체로부터 용출되었거나 임의로 첨가한 일부 물과의 혼합물 형태이다. Acetonitrile, acetone, methanol은 *n*-hexane, dichloromethane과 같은 비극성 용매와 일부 또는 전부가 서로 섞이므로 직접 분배할 경우 층이 분리되지 않거나 서로 용해되어 충분한 불순물 제거효과를 거둘 수 없다.

따라서 두 가지의 방법이 가능한데 하나는 추출액에 다량의 물을 가하여 희석한 후 비극성 용매로 추출하는 방법이다. 첨가하는 물의 양은 추출용매에 따라 차이가 있는데 acetonitrile 및 acetone의 경우 3~4배량, methanol의 경우 2~3배량이다. 또한 층 분리를 보다 명확하게 하고 비극성 용매 쪽으로의 분배 효율을 높이기 위해서 수용액 층에 중성의 염 (대표적으로 포화 NaCl 수용액을 추출액의 1/10~1/3 정도)을 첨가, 이온강도를 증가시킨다 (salting-out 효과). 분배 용매로는 대상성분의 극성에 따라 *n*-hexane 및 dichloromethane 또는 두 용매의 혼합액이 사용되며 수용액 층의 1/10~1/5의 양으로 1~3회 추출한다. 대부분의 비유지성 식품 및 농산물 검체에 적용이 가능하고 추출액의 농축과정이 생략되는 뚜렷한 장점이 있다. 또 하나의 방법은 추출액을 농축하여 추출용매를 날려 보내고 비극성용매로 추출하는 방법이다. 분배용매로는 *n*-hexane, dichloromethane과 함께 보다 극성이 강한 diethyl ether, ethyl acetate 등이 주로 사용되는데 보다 극성이 강한 대상성분도 분배가 가능하며 여기에서도 중성의 염을 첨가, 분배 효율을 높인다. 이 방법은 번거로운 추출액의 농축과정이 포함되므로 전자의 방법으로는 분배가 잘되지 않는 유지검체나 극성 성분에 대하여 적용한다.

중성의 극성 대상성분 (log P_{ow} 2이하)에 대해서는 이러한 분배과정에 세척과정을 추가함으로써 비극성 및 수용성 불순물을 효과적으로 제거할 수 있다. 즉, 추출액을 일단 *n*-hexane과 같은 비극성 용매로 분배하여 버림으로써 유지를 포함한 비극성 불순물을 제거한다. 수용액 층의 이온강도를 증강시킨 후 보다 극성이 강한 dichloromethane이나 ethyl acetate로 극성 대상성분을 분배 추출한다. 예를 들어 극성이 강한 6종의 neonicotinoid계 살충제 (log P_{ow} -0.64~1.60)의 잔류분석법에서 이러한 과정으로 총 추출 불순물량의 99% 이상을 제거할 수 있다.

분배 추출액 중에는 대개 약간의 수분이 존재하며 다음 정제 과정에 지장을 초래할 수 있으므로 보통 탈수 (脫水) 과정을 거친다. 가장 많이 사용하는 탈수 방법은 추출액을 중성 (中性)의 건조제에 통과시키거나 건조제를 추출액에 가하고 일정시간 교반, 탈수한 후 여과하는 것이다. 건조제로는 무수 망초 (anhydrous sodium sulfate)가 대표적인데 용매 종류에 따라 10~20 g/100 mL (분배 추출액) 정도를 사용하면 충분하다.

2) Petroleum-acetonitrile partition

이 분배법은 추출액 중 비극성 유지성분을 제거하기 위한 방법이다. 유지성분은 농약성분에 비하여 보다 비극성이므로 비극성 용매인 petroleum ether (*n*-hexane으로 대체 가능)와 극성 용매인 acetonitrile 간에 분배할 경우 petroleum ether 층에 주로 분포하게 된다. 이에 반하여 농약 성분은 극성이 다소 높으므로 상대적으로 acetonitrile 층에 보다 많이 분포한다. 이러한 원리를 이용하면 간단한 분배조작에 의하여 잔류농약 분석에서 가장 제거하기 어려운 간섭성분을 상당히 제거할 수 있다. 수용성 용매로 추출한 유지 검체에 대해서는 대개 액-액 분배에 추가하여 적용하며 그 방법은 다음과 같다. 즉 분배 추출액을 농축, 건고한 후 잔류물 (유지량 3 g 이하)을 acetonitrile로 미리 포화시킨 petroleum ether (*n*-hexane으로 대체 가능) 15~30 mL에 재용해하여 분액여두에 옮긴다. Petroleum ether로 미리 포화시킨 acetonitrile 동량으로 2~4회 분배 추출한다. 이 과정에서 수분이 혼입되지 않도록 주의하며 acetonitrile 추출액에 대해서는 보통 탈수과정을 수행하지 않아도 무방하다. 이러한 분배 과정에 의하여 현미 및 대두 검체 중 유지성분을 제거한 예를 표 6에 나타내었다.

표 6. Petroleum ether–acetonitrile partition (PAP)을 이용한 유지성분 제거

검체	추출용매	추출량 (mg, 건조물 기준)*		제거율 (%)
		조추출물	PAP 후 정제물	
현미	Acetone	271	50	82
	Acetonitrile	95	42	56
대두 종실	Acetone	528	19	96
	Acetonitrile	61	3	95

* 검체 20 g 기준, PAP 과정에서 acetonitrile로 2회 분배.

3) Ion-associated partition

이 분배법은 약하게 해리하는 산성 또는 염기성의 대상성분을 위한 정제법으로 불순물 제거효율이 매우 우수하여 대부분의 정제액은 직접 기기기분석이 가능

하다. 분배의 원리는 산-염기 평형을 이용하는 것이다. 농약 성분 중 약하게 해리하는 화합물들은 분자 내에 약산성의 경우 carboxylic acid 나 phenolic hydroxyl기를 갖고 있으며 약염기성의 경우 amine기를 보유하고 있다. 분자의 나머지 부분은 대부분 비극성의 작용기로 이루어져 있다.

약산의 경우 수용액 중에서 해리하여 평형에 도달한다. 해리되지 않은 HA는 나머지 비극성 부분에 의하여 지용성이며, 해리한 이온형태인 A^-는 수용성이 된다. Henderson-Hasselbalch equation에 의하여 다음과 수식이 성립한다.

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-$$

$$pKa - pH = \log([HA/[A-])$$

HA : unionized form, A^- : ionized form

pKa는 화합물 고유의 산도상수이므로 온도가 변하지 않는 한 일정한 상수이다. pH는 수용액 중에 산이나 알칼리를 가하여 변화시킬 수 있으므로 (pKa-pH) 값을 변경하여 HA/A^-의 비율을 임의로 조절할 수 있다. 분석 검체에 산을 첨가, 이온억압조건에서 유기용매로 대상성분을 추출한 후 용매를 증발시킨 수용성 추출액을 분배한다고 가정한다. 수용성 추출액에 알칼리를 가하여 pH를 (pKa-pH) 값이 -2이상 되도록 조절하면 화합물의 99% 이상이 해리하므로 수용성이 된다. 이 상태에서 비극성 유기용매로 분배하여 버리면 대상성분은 수용성이므로 분배되지 않고 비극성의 불순물이 제거된다. 다시 수용성 추출액에 산을 가하여 pH를 (pKa-pH) 값이 2이상 되도록 조절하면 화합물은 해리하지 않은 형태로 지용성이 된다. 이를 비극성 유기용매로 분배하면 대상성분은 분배 추출되며 수용성 불순물은 분배되지 않으므로 효과적으로 제거할 수 있게 된다. 약염기성 성분에 대해서는 관행적으로 표시되는 짝산 (conjugated acid)의 pKa에 대해서 pH 조절을 반대로 수행하면 된다. 이러한 분배법을 적용할 경우 비극성과 수용성 불순물을 함께 제거할 수 있어 그 정제효과가 다른 분배법에 비하여 월등하다. 다만 강산이나 강염기로 pH를 조절할 경우 화합물 자체의 가수분해가 일어날 염려가 있으므로 사전 조사와 함께 가급적 가혹한 조건은 피한다. 보통 (pKa-pH) 값을 ±1.5 정도로 조절한 후 각 2회 세척/추출 분배로 충분한 정제가 가능하다.

4.2 크로마토그래피법 (chromatography)

크로마토그래피법은 고정상과 이동상으로 이루어진 분리 체계에서 화합물들의 고정상/이동상간 서로 상이한 분포특성을 이용하여 이동속도의 차이로 화합물들을 분리하는 방법으로 추출액의 정제에 가장 많이 사용되는 방법이다. 분리효율은 매우 우수하나 한 번에 분리할 수 있는 검체량이 매우 작은 (수 mg~수백 mg) 단점이 있어 추출액에 직접 적용하는 경우는 드물며 주로 액-액 분배 후 최종 정제 단계에서 사용된다. 크로마토그래피법에서의 실제적 분리 원리는 4가지로 요약될 수 있는데 이는 흡착 (adsorption), 분배 (partition), 겔 침투 (gel permeation) 및 이온교환 (ion-exchange)이다. 분석 대상성분 및 제거하고자 하는 간섭물질의 특성에 따라 적절한 분리 양식의 선택이 가능하다. 이 중 중성의 대상성분에서 가장 많이 사용되는 것은 흡착크로마토그래피법이다. 분배크로마토그래피법은 그 자체로 최종 정제과정으로 사용되기도 하나 액-액 분배와 유사한 분리 원리이므로 액-액 분배과정을 대용할 목적으로도 사용된다. 겔 투과 (gel permeation) 크로마토그래피는 분자의 크기 (분자량) 차이를 이용한 분리법으로 주로 농약에 비하여 분자량이 큰 유지나 색소 성분을 제거하는데 사용되며 이온교환 크로마토그래피는 이온성 화합물들의 정제과정에 주로 사용된다. 크로마토그래피법은 이러한 분리 원리에 따른 분류 뿐 만 아니라 관행적으로 분리체계의 사용 형태를 기준으로 분류한다. 즉 관 형태인 경우는 column chromatography, sorbent를 얇은 두께로 입힌 판의 형태이면 박층 크로마토그래피 (thin layer chromatography, TLC), 최근에 상용화된 소형 column의 카트리지 형태인 경우는 고상추출법 (SPE) 이라고 편의상 구분하는데, 형태나 과정은 다소 상이하나 분리에 이용되는 원리는 동일하다.

1) Column chromatography

고전적인 크로마토그래피의 형태로 보통 유리관에 고정상을 충전하고 이동상을 상부로부터 흘려보내는 크로마토그래피 형태이다. 앞서 언급한 4가지의 분리양식이 모두 가능하나 가장 많이 사용되는 흡착크로마토그래피를 주로 지칭하는 경우가 많다. 잔류농약분석에서는 중성 (일부 약이온성 포함) 대상성분의 기기분석을 위한 최종 정제과정으로 거의 필수적으로 이용된다. 흡착제로는 alumina,

Florisil, silica gel 및 활성탄 등이 사용된다. Florisil은 magnesia (MgO)와 silica (SiO_2)를 혼합, 용융하여 제조한 합성 흡착제로서 유지 및 색소의 비용출성이 우수하여 가장 많이 사용된다. 그 다음으로는 silica gel이 다소 흡착력이 낮으나 극성의 화합물을 쉽게 용출시킨다는 점에서 많이 사용된다. Alumina는 흡착력이 강하여 직접 사용되는 경우는 적고 일정량의 물을 가하여 흡착력을 약화(deactivation)시켜 사용한다. 활성탄은 색소에 대한 흡착력이 강한 특징이 있으나 흡착력이 너무 강하여 단독 보다는 Celite 545나 MgO와의 혼합물 형태로 일부 검체에 사용된다.

Florisil과 silica gel은 일반적으로 약 130℃에서 5시간 이상 가열하여 흡착표면 중 수분을 제거, 활성화시킨 후 사용되는데 일부 방법에서는 적량의 물 (약 1~2%)을 첨가하거나 극성용매를 미리 흘려 (pre-washing 또는 pre-wetting) 흡착력을 다소 약화시켜 사용하기도 한다. 사용되는 입자의 크기는 Florisil의 경우 60~100 mesh 이며 silica gel의 경우는 방법에 따라 다소 상이하나 70~230 mesh의 입자가 주로 사용된다.

US FDA에서 확립하여 중간 극성 및 비극성 농약의 잔류분석법에서 표준적으로 사용하는 Florisil 흡착크로마토그래피법은 다음과 같다. 사용하는 column의 내경은 표준이 22 mm이며 이 경우 20 g의 활성화시킨 Florisil이 사용된다. 추출액 중 간섭물질의 양이 적어 사용하는 Florisil의 양을 줄이고자 할 경우에는 10 g 또는 5 g을 사용할 수 있는데 이때 사용하는 column의 내경은 각각 15 mm 및 11 mm로서 충전제의 높이는 거의 같다. 충전법으로는 건식과 습식충전법이 있는데 전자의 경우는 소정의 흡착제를 바로 column에 충전하는 방법으로 간편하나 기포의 제거가 어려운 단점이 있다. 후자의 습식법은 Florisil을 pre-washing용 용매(*n*-hexane 등 비극성 용매)에 분산, 기포를 최대한 제거한 후 용매와 함께 충전(slurry packing) 하는 방법으로 기포가 적어 용출양상은 건식법에 비하여 일정하나 과정이 번거롭다. 표준법은 건식충전법이다. Florisil 층 상부에는 수분의 유입을 방지하고 일부 여과작용이 수행되도록 1/2인치 높이로 anhydrous sodium sulfate를 추가하여 충전한다. 충전 후 *n*-hexane 등 비극성 용매를 흡착제 1 g 당 5 mL를 흘려보내어 pre-washing을 수행한다.

검체 용액 (주로 *n*-hexane 또는 첫 번째 용출용매에 녹임)을 가하고 용출용매를

흡착제 1 g 당 10 mL의 양으로 순차적으로 흘려보내어 대상 화합물들의 용출되는 분획을 받는다. 표준 용출용매에는 다음 2종류의 혼합액이 널리 사용되는데 petroleum ether는 *n*-hexane으로 대체 가능하다.

- Ethyl ether/petroleum ether 혼합액 : 6/94, 15/85, 50/50 (v/v)
- Dichloromethane/acetonitrile/*n*-hexane 혼합액 : 20/0/80 (v/v/v), 50/0.35/49.65, 50/1.5/48.5 (v/v/v)

Ethyl ether/petroleum ether 혼합액은 1960~70년대 유기염소계 및 유기인계 농약의 잔류분석에 널리 사용되었던 조합인데 현재도 많이 사용하고 있으나 ethyl ether 시약의 항상성을 관리하는 것이 어렵다. 즉, ethyl ether는 증류하여 불순물인 peroxide를 제거하고 보존제로서 2%의 ethanol을 첨가하여 사용하여야 하는 불편함이 있다. Dichloromethane/acetonitrile/*n*-hexane 혼합액은 1972년에 확립되어 보다 많은 농약성분에 대하여 적용되고 있다. 각 용출분획은 색소가 거의 제거되어 거의 무색이며 3번째 분획에서만 검체에 따라 약간의 carotenoid 색소가 용출될 정도이다.

Silica gel, alumina 및 활성탄 (Celite 545나 MgO와의 혼합물 형태로 사용)의 경우도 사용 방법은 Florisil과 매우 유사하다. 단 용출용매로는 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl ether, acetone, ethyl acetate 등 검체 및 성분에 따라 다른 용매들의 혼합액이 사용된다. Florisil의 경우에도 위에 언급한 용매외의 다른 용매들의 혼합액 사용이 얼마든지 가능하며 검체 및 대상성분에 따라 용매 및 혼합비율을 실험적으로 최적화하여 사용한다.

용출용매를 최적화하는 것은 이러한 column chromatography가 기기분석전의 최종 정제단계라는 점을 감안할 때 매우 중요한 사항이다. 분석성분을 충분히 용출시키면서도 간섭물질의 용출을 최소화하여야 용출액 중 간섭물질이 양이 적어 기기분석이 가능해지기 때문이며 그렇지 못할 경우 추가의 정제과정을 수행하여야 하는 어려움이 발생한다. 흡착크로마토그래피에서 흡착된 분석성분이나 간섭물질 분자는 이동상 분자와의 흡착활성기에 대한 경쟁적 친화력에 따라 급격히 탈착된다. 따라서 용출용매의 작은 극성 변화에 대하여 용출강도가 매우 민감하게 대응하므로 분배크로마토그래피에서의 점진적 용출양상과는 다르다.

즉, 용출용매의 조성을 미세하게 조절함으로써 분석성분과 간섭물질간의 분리를 최대화할 수 있다.

표 7에 유기용매별 흡착제 alumina에 대한 용출강도를 나타내었다. Silica의 경우도 강도의 차이는 다소 있으나 매우 유사한 경향을 나타낸다. 표 4의 용매별 극성과는 그 순서가 서로 다른데 이는 흡착활성기인 hydroxyl group에 대한 친화력과 화합물 극성과는 반드시 일치하지 않기 때문이다.

표 7. 흡착 크로마토그래피에서 용매별 용출강도

순번	용매명 (용출강도 지수*)	순번	용매명 (용출강도 지수)
1	Methanol (0.95) (강함)	10	Dichloromethane (0.42)
2	Ethanol (0.88)	11	Chloroform (0.40)
3	Isopropanol (0.82)	12	Diethyl ether (0.38)
4	n-Butanol (0.70)	13	Benzene (0.32)
5	Acetonitrile (0.65)	14	Toluene (0.29)
6	Ethyl acetate (0.58)	15	p-Xylene (0.26)
7	Tetrahydrofuran (0.57)	16	Cyclohexane (0.04)
8	Acetone (0.56)	17	n-Hexane (0.01)
9	Methyl ethyl ketone (0.51)	18	n-Heptane (0.01) (약함)

* Alumina에 대한 용출강도

용출용매의 최적화의 첫 번째 단계는 용출용매 량을 표준법에서와 같이 흡착제 1 g 당 10 mL로 하여 분석성분을 용출하는 용매와 용출하지 않는 용매 2종을 선정하는 것이다. 이때 너무 용출강도가 강하거나 약한 용매는 피한다. 두 용매의 혼합비율을 달리하여 세척용 및 용출용 혼합액 조성을 실험적으로 구한다. 한 가지 용출용매를 다량 사용하여 분획별로 수집하는 것은 분석성분의 확산 등 간섭물질과의 분리가 보통 불충분하다.

혼합 비율에 따른 용출강도의 변화는 그림 4에 나타낸 바와 같이 직선적이 아니라 log 함수적으로 변화한다. 즉 극성 용매의 비율이 20% 이하일 경우는 민감하게 용출강도가 변화하나 50% 이상이 되면 그 정도가 미미하다. 따라서

극성 용매의 비율을 용출강도가 등간격이 되도록 5, 10, 20, 50% 등으로 조절한다.

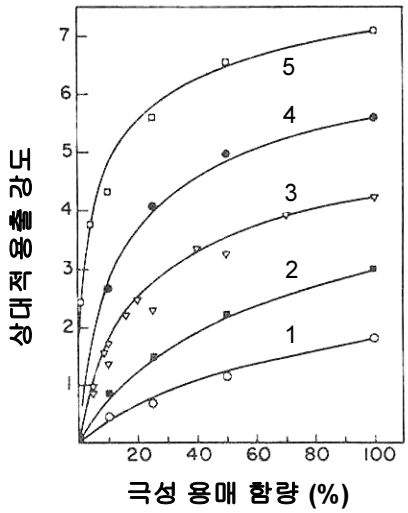


그림 4. 비극성 용매와 극성 용매 혼합액의 alumina column 상 용출강도
비극성 용매 : n-pentane,
극성 용매 : 1, CCl4; 2, n-propyl chloride; 3, CH2Cl2; 4, acetone; 5, pyridine.

세척용의 경우 흡착제 1 g당 10~15 mL 분획에서 분석 성분이 약 10% 용출되면 최적치 이다. 왜냐하면 검체추출량 (overloading 정도) 및 실험실 온습도 (흡착제의 흡착력) 조건에 따라 용출 양상이 다소 변화되기 때문에 어느 정도의 여유분이 필요하다. 용출용의 경우 세척용매를 흘려버린 후, 용출용 용매를 흘려 흡착제 1 g 당 0~5 mL 분획에서 50~70%, 5~10 mL 분획에서 30~50%이면 최적치 이다. 이는 분석성분의 용출양상에서 일상적으로 관찰되는 약간의 tailing 현상을 감안한 범위이다.

2) 겔 침투 크로마토그래피 (gel permeation chromatography, GPC)

겔 침투크로마토그래피는 분자체 (molecular sieving) 특성을 나타내는 다공성 중합체를 이용하여 분자의 크기 (분자량)에 따라 화합물들을 분리하는 방법이다.

즉 일정한 분자 공극구조 (molecular pore structure)를 가진 입자형태의 중합체를 팽윤 (swelling)시킨 후 column에 충전하면 입자간 큰 공극과 입자 내 다공성 구조에 의한 미세 공극이 존재하게 된다. 여기에 다양한 분자 크기 (분자량)를 가진 화합물들의 혼합물을 주입하고 이동상을 흘리면, 입자내 작은 공극의 배제한계 (exclusion limit)를 초과하는 아주 큰 분자는 입자간 공극을 통하여 이동상의 속도와 거의 동일하게 빠르게 이동한다 (total exclusion). 반면 아주 작은 분자는 입자 내 공극을 모두 통과하므로 경로가 매우 길어져 column을 느리게 이동하게 된다 (total permeation). 보통 크기의 입자들은 그 크기에 따라 미세 공극을 통과하는 정도가 상이하게 되고 (selective permeation) 이러한 이동 경로의 차이에 따라 column을 통과하는 속도가 다르게 되므로 화합물간의 분리가 이루어진다.

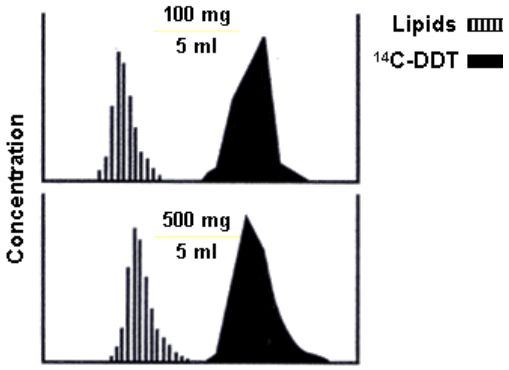


그림 5. GPC에 의한 농약 (DDT)과 유지 간섭성분간의 분리.
충전제 Bio-Bead S-X2, column 길이 23 cm.

GPC는 대상 화합물과 간섭성분간 분자량 차이가 현저한 유지 검체의 경우에 정제 효과가 뛰어나다. 즉 농약 성분은 대개 그 분자량이 200~600 범위이고 유지 (fat)의 분자량은 1,000 이상이므로 그림 5에 나타난 바와 같이 GPC를 이용할 경우 대부분의 유지를 효과적으로 제거할 수 있다. 또한 색소 및 기타 정유 (oil) 등 비교적 분자량이 큰 간섭성분의 제거에 많이 사용된다. 충전제로는 Bio-Beads S-X2나 S-X3, Sephadex LH-20 등이 분리 분자량 범위에 맞추어 선택적으로 사용되며 이동상으로는 유지 및 대상성분에 대한 용해도가 높은 cyclohexane, dichloromethane

또는 그 혼합액이 가장 보편적이다.

3) 박층 크로마토그래피 (thin layer chromatography, TLC)

TLC의 원리는 column chromatography와 동일하여 open-column chromatography라고도 불린다. 형태상 겔 침투 및 이온교환의 분리 양식은 적용하기 힘들며 주로 흡착과 분배가 분리 원리인데 잔류농약 분석법에서는 주로 흡착원리가 이용된다. 흡착제 (주로 silica gel)를 얇게 (보통 0.5~1 mm) 입힌 TLC판에 소량 (약 0.5 mL)의 휘발성 유기 용매에 용해한 검체를 모세관이나 미세주사기를 이용하여 TLC판 하단 약 3cm 높이에 소량씩 점적 (spot) 또는 띠모양 (band)으로 떨어뜨리고 공기나 질소기류 하에서 건조시킨다. 이때 분석 대상성분의 표준용액을 대조구로 판의 별도의 위치에 함께 처리한다. 검체를 처리한 TLC판은 전개용매가 담긴 chamber에 넣고 뚜껑을 덮어 밀폐하면 전개용매가 모세관 현상에 의하여 흡착제를 적시면서 판을 상승한다. 약 10~15 cm 상방 전개 후 판을 꺼내어 건조하고 자외선을 조사하거나 발색시약을 사용하여 표준물질의 전개위치를 확인한다. 표준물질의 Rf값을 기준으로 분석 대상 농약에 해당하는 부위를 긁어내어 적당량의 유기용매로 추출한 후 기기분석에 공시한다.

TLC는 그 검체 처리과정이 다소 번거롭고 검체 주입량도 제한적이기는 하나 좁은 장소에서 한 번에 다수의 검체를 간편하게 정제할 수 있다는 장점이 있다. 분리 효율은 우수한 편이며 간섭물질의 양이 비교적 적은 다수 검체의 정제에 편리하다.

4) 고상추출법 (solid-phase extraction, SPE)

고상추출법 (SPE)은 column chromatography와 분리에 이용되는 원리는 동일하나 소형 column의 카트리지 형태로 상용화되어 형태나 과정은 다소 상이하다. 고전적 column chromatography가 주로 흡착의 분리 원리를 주로 이용하는데 비하여 SPE에서는 흡착, 분배 및 이온교환 등 구조적으로 적용하기 힘든 겔 침투를 제외한 chromatography의 3가지 분리 원리를 다량하게 이용하고 있다. 주로 사용되는 카트리지는 1, 3, 6, 10 mL 용량의 보통 주사기 모양 (straight barrel)

이나 용출용매의 양을 보다 많이 담을 수 있는 LRC형이 있고 충전되어 있는 흡수제 (sorbent)의 양은 100~1,000 mg 범위이다. SPE에서 가장 중요한 사항은 대상성분과 검체의 종류에 따라 적절한 분리 원리의 SPE를 선택하는 것이다. 상용화되어 있는 주요 SPE 카트리지의 분리 원리 및 충전제의 작용기를 표 8에 나타내었다.

표 8. SPE sorbent의 분리 원리 및 종류

분리 원리	작 용 기	특 기 사 항
흡착	Hydroxyl (alumina, Florisil, silica)	순상
	2,3-Dihydroxypropoxypropyl (Diol)	순상
	Styrene-divinylbenzene (SDVB, HLB)	역상
분배	Octyl (C_8), octadecyl (C_{18}), phenyl	역상
	Cyanopropyl (CN)	순상/역상
약 양이온교환	Carboxypropyl (CBA)	순상
강 양이온교환	Propylsulfonic acid (PRS)	
	Benzenesulfonic acid (SCX)	
약 음이온교환	Aminopropyl (NH_2)	순상
	Diethylaminopropyl (DEA)	
	Ethylenediamine-N-propyl (PSA)	
강 음이온교환	Quaternary ammonium (SAX)	
혼합 분리원리	음이온교환/분배 (MCX, WCX)	
	양이온교환/분배 (MAX, WAX)	

예를 들어 분석하고자하는 대상성분이 비극성인데 흡착 원리에 의한 머무름 (retention)으로 불순물과의 분리를 시도하고자 한다면 hydroxyl기를 작용기로 가지고 있는 alumina, Florisil, silica나 diol을 선택하고 이동상은 용출강도가 용매의 극성이 커지는 방향인 순상 (normal phase)으로 용출시킨다. 그러나 검체 중 극성 불순물이 많을 경우에는 styrene-divinylbenzene copolymer로 충전된 SDVB나 HLB 카트리지를 사용하는 것이 유리하다. 대개의 SPE는 사용전 충전제 중 작용기를 표면으로 노출시켜 분리효율을 높이기 위한 활성화 (activation) 과정이 필요하다.

SPE는 카트리지를 하나씩 사용할 수도 있으나 대개 전용의 vacuum manifold 장치를 이용, 다수의 카트리지를 동시에 사용하여 간편하게 분리작업을 수행할 수 있다. 그러나 사용하는 충전제 용량에 한계가 있어 다량의 불순물을 함유한 추출액을 정제할 경우 용량초과 (overloading)로 분리의 효율이 열등해지는 단점이 있다. 또한 제조 회사나 번호, 사용 실험실 환경에 따라 다소의 활성 차이(특히 흡착제의 경우)를 나타내므로 용출용매 체계를 보다 빈번히 점검하여야 하는 번거로움도 있다.

4.3 기타 정제법

1) 침전법 (응고법, coagulation)

응고법은 중간 극성에서 극성 성분을 분석할 때 검체 중 색소나 지방을 제거할 목적으로 사용되는 정제법이다. 정제 원리는 검체 추출물을 acetone/산성 응고액과 혼합, 응집시킨 후 여과함으로써 간섭물질을 Celite 545와 같은 흡착력이 약한 규조토에 침전, 제거하는데 이 조건에서 대상성분은 수용성이 있으므로 Celite bed를 통과하여 여액 중에 존재하게 된다. 이러한 응고법은 carbamate계 살충제의 잔류분석법에서 널리 이용되고 있으며 다른 농약의 잔류분석법에도 적용이 가능하다.

응고액은 물 360 mL에 NH_4Cl 20 g과 H_3PO_4 40 mL (85%)을 용해하여 원액으로 보관하고 정제 시마다 10배로 희석하여 사용한다. 검체의 유기용매 추출액을 감압 농축한 후 acetone 5 mL를 가하여 재용해하고 응고액 50 mL와 Celite 1~2 g을 첨가하여 혼합한 후 Celite 545를 약 6 mm 두께로 깐 Büchner 여두에서 흡인 여과한다. 이러한 응고과정을 재차 반복한 후 응고액 20 mL로 용기 및 침전물을 세척하여 여액을 합한다. 합친 여액은 액-액 분배법을 이용하여 분석성분을 분배, 추출한다.

응고법은 특수한 장치나 시약을 필요로 하지 않으며 과정이 용이하고 불순물 제거 효과도 우수하다. 그러나 수용성이 낮거나 산성에서 분해되기 쉬운 물질에는 적용하기 불가능할 수 있으므로 회수율 시험으로 확인한 후 이 방법의

사용여부를 결정하여야 한다.

2) Sweep co-distillation

이 방법은 비교적 휘발성이 있는 분석성분을 대상으로 색소나 유지를 제거하기 위하여 사용하는 정제법이다. 정제의 원리는 매우 간단하여 검체를 질소와 같은 비활성기체가 흐르고 있는 고온의 유리 또는 석영관에 주입하면 휘발성인 분석성분은 기체를 따라 관을 통과하고 비휘발성인 색소나 유지 등 간섭성분은 관내에 남아 있게 되는 원리이다. 휘발된 분석성분은 상온 혹은 저온에서 냉각 포집되고 소형의 흡착카트리지를 통과시켜 최종적으로 추가 정제한다.

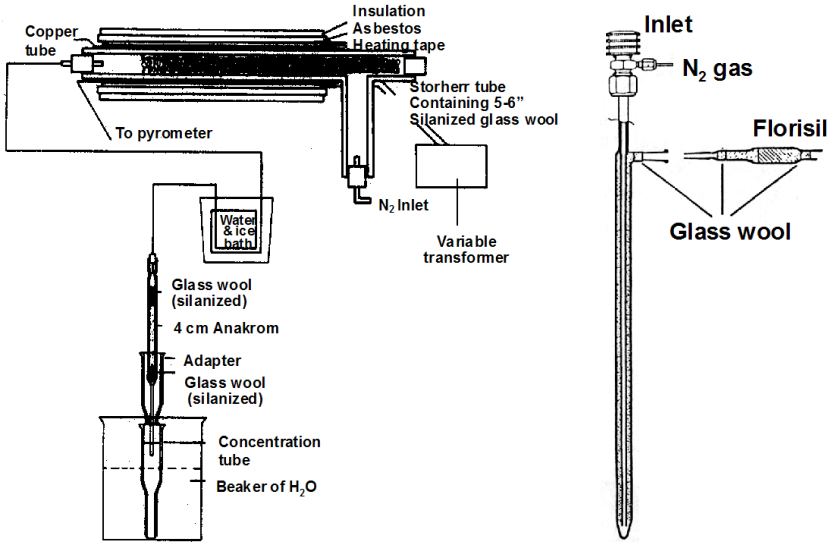


그림 6. Sweep co-distillator

왼쪽 : 비유지검체 중 유기인계 분석을 위한 Storherr 장치

오른쪽 : 유지검체 중 유기염소계 및 유기인계 분석을 위한 SGE사 Unitrex 장치

그림 6에 나타낸 바와 같이 두 가지의 장치가 사용되고 있는데 Storherr 장치는 주로 색소를 제거하기 위해서 사용되며 SGE 사의 Unitrex 장치는 이를 변개, 유지성분의 제거에 보다 많이 사용된다. 유지 또는 비유지 검체 중 유기인계

농약의 잔류분석법에서 주로 이용되고 있으며, 유사한 휘발성과 열에 대한 안정성을 나타내는 다른 농약의 잔류분석법에도 적용이 가능하다.

3) 화학적 처리법

화학반응을 이용하여 검체 추출액을 정제하는 방법은 일반적인 것은 아니며 대상성분 및 검체의 종류에 따라 선택적으로 이용된다. 특이 (特異) 간섭성분이 관찰되는 특정 검체에 대하여는 상당수의 화학반응을 이용한 정제법이 보고되어 있다. 예를 들어 식품검체는 아니나 하천이나 호수 밑 저니토 (sediment) 에는 환경 중 환원작용에 의하여 원소 황이 다량 존재하며 이 성분은 일상적 분배나 chromatography법으로는 제거할 수 없고 특히 비극성 농약들의 잔류분석을 심하게 방해한다. 이 경우 원소 황을 구리 분말이나 Raney nickel과 같은 금속과 반응시켜 침전시키고 여과하면 잘 정제된 추출액을 얻을 수 있다.

화학반응을 이용한 정제법에서 가장 중요하게 고려하여야 할 사항은 대상성분의 반응조건에서의 안정성이다. 위의 반응은 안정한 유기염소계 농약에 대해서는 적용할 수 있으나 유기인계 농약의 경우는 상당수 분해되므로 적용할 수 없다. 따라서 보고된 문헌이나 자료를 숙지하고 예비 실험을 통하여 안정성 여부를 확인하여야 한다.

한편 화학처리에 의하여 대상성분이 다른 화합물로 정량적으로 전환될 경우 오히려 전환 화합물을 분석 성분으로 하여 잔류분석을 수행하는 경우도 많다. 예를 들어 carbamate계 살충제인 oxamyl은 추출 후 가수분해 (saponification)하여 oxamyl oxime으로 전환하고 이를 GLC로 분석한다. Oxamyl oxime을 액-액 분배 추출하는 과정에서 다량의 비극성 불순물이 효과적으로 제거되므로 보통 추가적 정제과정이 필요 없다. 또한 thioether 형태의 황 원자를 포함하는 농약들은 대개 모화합물과 함께 sulfoxide, sulfone을 독성 대사산물로 함께 분석하여야 한다. 이 경우 검체 추출물을 m-chloroperoxybenzoic acid 시약으로 산화하여 전 대상 화합물들을 sulfone으로 전환, 분석하며 이 과정에서 불순물들이 효과적으로 제거된다.

검체 정제법은 검체에서 함께 추출되는 간섭성분의 종류와 양에 의하여 결정

되기 때문에 동일한 분석 성분이라 하더라도 검체의 종류에 따라 정제법이 상이한 경우가 많다. 즉 하나의 정제법으로 간섭성분의 종류와 양이 서로 다른 모든 검체 종류를 정제하기는 거의 불가능하다. 따라서 다양한 문헌을 검색함과 동시에 면밀한 내용 검토를 통하여 적절한 검체 정제법을 조합, 확립하는 것이 중요하다. 분석하고자 하는 검체가 어떤 검체군에 포함되는 가를 판단하고 이러한 검체군을 정제하는 보편적 또는 선택적 방법들을 숙지한 후 과정별로 정제 정도를 평가하여 효율적 정제법을 확립하는 것이 바람직하다. 미국 FDA에서 발간한 잔류농약분석법 (Pesticide Analytical Manual)은 여러 정제/추출법을 단계별로 제시하고 분석자 스스로가 선택, 조합하여 분석법을 확립하는 방식으로 서술되어 있는데 이러한 접근법은 숙달된 잔류분석자에게는 당연한 사항이다.

5. 기기분석

잔류농약 분석은 검체 중 극미량으로 존재하는 대상성분을 정성/정량 분석하는 과정이기 때문에 사용되는 이러한 분석요건을 충족시키는 분석기기만을 사용할 수 있다. 잔류분석용 기기는 이중 고감도를 최우선으로 하고 그 다음이 선택성, 재현성 및 실용성 (유지관리) 순으로 기기특성이 요구된다. 잔류농약 분석에서 주로 사용되는 기기분석법을 다음에 열거하였다.

잔류농약 주요 기기분석법
- 기체크로마토그래피법 (gas chromatography, GC)
- 고성능 액체크로마토그래피법 (high-performance liquid chromatography, HPLC)
- 자외/가시 흡광 분광광도법 (UV/VIS spectrophotometry)
- 형광 분광광도법 (fluorescence spectrophotometry)
- 기체크로마토그래피/질량분석법 (GC-Mass spectrometry, GC-MS)
- 액체크로마토그래피/질량분석법 (LC-MS)
- 박층크로마토그래피법 (TLC)
- 모세관 전기영동법 (capillary electrophoresis)
- 기타 (polarography 등)

이 중 가장 많이 사용되는 기기분석법은 GC와 HPLC이다. GC와 HPLC는 기기 자체에 내장된 column에 의한 화합물들의 분리 기능이 매우 우수하고 고감도의 선택성 검출기를 이용할 수 있어 잔류농약 분석과 같은 유기 화합물의 미량분석 (trace analysis)에 최적의 분석기기이다. 다만 머무름 시간 등 chromatograhic 특성에 의한 정성분석이 다소 미흡한 단점이 있다. 따라서 최근에 와서는 GC와 HPLC의 분리 기능을 이용하되 분자량이나 구조에 대한 정성적 기능이 탁월한 질량분석기를 결합시킨 GC-MS 및 LC-MS의 사용도 보편화되고 있다. GC-MS 및 LC-MS는 특히 미지 검체 중 검출된 대상성분을 재확인하여 분석결과를 검증하는 데에는 거의 필수적으로 요구되는 기기이다.

분광광도법이나 polarography와 같은 일부 전기화학법은 그 감도는 우수한 편이나 기기 내에 화합물 분리 기능이 없어 선택성이 열등하다. 이에 따라 검체

추출액의 정제도가 매우 높아야 하는 단점이 있어 단독 기기로서의 사용빈도는 낮다. 그러나 이들 분광광도법이나 전기화학법은 GC나 HPLC에서 검출기로서 매우 유용하게 사용되고 있다는 점을 유념하여야 한다.

TLC는 사용상 간편성의 이점이 있고 발색시약을 적절히 선택함으로써 잔류분석에 이용되고 있으나 감도나 선택성 측면에서 GC나 HPLC에 비하여 열등하므로 주로 정밀분석에 앞서 검색용 위주이다. 또한 분석기기보다는 검체 정제법으로서의 사용 빈도가 높다. 모세관 전기영동법은 이온 화합물을 대상으로 사용되며 paraquat와 같은 일부 화합물에 대해서는 높은 감도와 선택성을 나타낸다.

5.1 기체크로마토그래피법 (gas chromatography)

기체크로마토그래피는 분리관 내 이동상 (mobile phase)이 기체이며 고정상 (stationary phase)이 고체 또는 액체인 화합물의 물리적 분리 기술이다. 분리관 내로 주입되는 검체 혼합물 기체 중 서로 다른 화합물들은 고유의 물리적 특성에 따라 고정상에 대한 친화력에 차이를 나타내며 이에 따라 이동상/고정상간 분포비율이 달라져 서로 상이한 속도로 이동한다. 일정한 조건하에서 화합물들의 분리관을 통과하는 시간은 서로 상이하므로 정성적으로 화합물간의 분리가 일어나며 이들 물질들을 농도비례 검출기 (differential detector)를 이용하여 정량적으로 분석한다. GC는 고정상의 상태에 따라 고체인 gas-solid chromatography (GSC)와 액체인 gas-liquid chromatography (GLC)로 세분된다. GSC는 다공성 polymer 등을 고정상으로 하여 주로 기체나 휘발성이 높은 저분자 화합물을 분리 분석하며 일부 농약의 잔류분석에도 사용된다. GLC는 휘발성이 있는 다양한 화합물의 분리 분석에 매우 광범위하게 이용되며 잔류농약에서도 주로 GLC가 이용된다. 기기의 구성은 분리의 핵심인 분리관 (column), 검체주입구 (inlet, injection port), 검출기 (detector) 및 이동상 이송장치 (대개 고압 가스실린더 및 유량조절계)로 이루어지며 기타 온도조절 및 데이터 처리장치가 부속되어 있다.

1) 분리관 (column)

화합물간 분리가 일어나는 곳으로 GC의 심장부이다. GLC에서 분리의 원리는 주로 화합물들의 휘발성 (증기압) 차이 및 극성을 달리하는 고정상에 대한 친화력 차이이다. 화합물간 최적 분리를 위한 주요 인자로 칼럼효율 (column efficiency) 및 용매효율 (solvent efficiency)이 높아야 하는데 전자는 이동상 유속의 최적화이며 후자의 경우는 최적 고정상 (GLC에서는 liquid phase)의 선택에 의하여 결정된다.

칼럼효율은 chromatographic peak의 broadening을 의미하는데 칼럼효율이 높을수록 peak sharpness가 증가하여 분리효율이 높아진다. 칼럼효율은 chromatography를 분별 증류분리의 개념으로 해석하는 단(段) 이론 (plate theory)에 의하여 다음과 같은 식으로 표시된다.

$$N = 16\ (t_R/W)^2$$

$$HETP = L/N$$

$$HETP = A + B/\mu + C\cdot\mu \quad \text{(van Deemter equation)}$$

N : 이론단 (段)수 (theoretical plate number), t_R : 머무름시간 (retention time), W : 피크넓이 (peak width), HETP : 하나의 이론단(段)이 차지하는 길이 (height equivalent to a theoretical plate), L : 칼럼길이 (column length), A : 다경로 효과 (multipath effect), B : 분자확산 (molecular diffusion), C : 질량이송에 대한 저항성 (resistance to mass transfer), μ : 기체 선속도 (linear gas velocity)

주어진 칼럼에서 HETP 값이 작을수록 많은 이론단이 존재하게 되며 이에 따라 칼럼효율이 높아진다. van Deemter식에 의하면 이러한 HETP는 이동상 유속의 함수이며 HETP 값이 최소로 되는 최적 유속이 존재하게 된다. 즉, 그림 7에 나타낸 바와 같이 사용하는 분리칼럼에 대한 이동상 유속을 최적으로 조절함으로써 최고의 분리능을 얻을 수 있다.

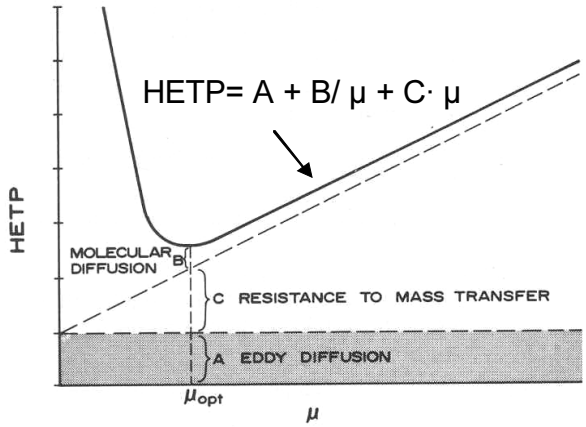


그림 7. 칼럼효율에 대한 van Deemter equation. μopt : 최적 유속

용매효율 (solvent efficiency)은 고정상에 대한 화합물들의 상이한 상호작용 정도를 의미한다. 예를 들어 동일한 증기압을 나타내는 두 화합물이 있을 때 고정상을 무시한다면 두 화합물은 이동상을 따라 동일한 속도로 이동할 것이다. 그러나 두 화합물의 극성이 서로 틀리고 고정상으로 극성의 liquid phase를 사용하였다고 가정하면, 극성이 상대적으로 높은 화합물은 극성 고정상과의 친화력으로 인하여 고정상으로의 분포정도가 보다 커지고 이에 따라 다른 화합물보다 이동속도가 느려지므로 분리가 가능하게 된다. 따라서 분석 대상성분의 특성을 고려하여 최적의 liquid phase를 선택하고 이동상의 유속을 조절함으로써 화합물간 최고의 분리능을 얻을 수 있다.

GC에서 사용되는 분리관은 충전제로 채워져 있는 충전칼럼 (packed column)과 모세관칼럼 (capillary column)의 형태로 대별된다. 충전칼럼은 유리나 스테인리스 스틸 재질로 제작된 내경 2~4 mm, 길이 50 cm~3 m의 나선형 (spiral) 또는 U자형의 관에 적절한 고정상을 충전한 형태이다. 충전제로는 GSC의 경우 Porapak™과 같은 다공성 polymer, GLC의 경우는 불활성의 담체 (solid support)에 silicon oil 등 다양한 특성의 고분자 액체 (liquid phase)를 1~10% 정도로 피복하여 사용한다. 모세관칼럼에 비하여 많은 양의 검체를 주입할 수 있고 재현성도 우수한 장점은 있으나 열분해나 흡착정도가 크고 무엇보다도 분리효율이 열등하여 최근에는 일부 GSC 및 단성분 잔류분석 시를 제외하고는 모세관칼럼이

주로 사용되고 있다.

모세관칼럼으로는 고순도 강화유리의 일종인 fused silica로 제작된 내경 1 mm 미만, 길이 10~100 m의 가는 관이 분리관으로 사용된다. 고정상은 충전되어 있는 것이 아니라 liquid phase를 분리관 벽면에 피복 (wall coated) 또는 화학적으로 결합 (chemically bonded)시킨 형태인데, 피복 (wall coated)의 경우 고온에서의 bleeding (liquid phase가 유출되는 현상)이 과다한 단점이 있어 최근의 칼럼은 거의 모두 화학적 결합 형태이다. 모세관칼럼에서는 충전제에 의한 다경로 현상이 없어 van Deemter equation은 HETP = B/μ + C·μ로 표시된다. 또한 충전제가 없으므로 분리관 내 이동상을 흘릴 때 일어나는 압력 강하 (pressure drop)가 적어 분리관 길이를 길게 할 수 있다. 따라서 모세관칼럼의 이론단수는 보통 충전칼럼의 수십 배에 달할 정도로 칼럼효율이 높다. 보통의 일상적 분석에는 15~30 m 길이의 칼럼으로 충분하며 특별히 고분리능이 요구될 때에는 60 m 이상의 칼럼도 간혹 사용된다.

모세관 칼럼은 내경에 따라 0.25 mm, 0.32 mm 및 0.53 mm 분리관으로 구분하는데 사용 용도 및 방법이 다소 상이하다. 내경이 작은 0.25 및 0.32 mm 모세관 칼럼은 분리능은 매우 우수하나 허용 검체량이 매우 적은 단점이 있다. 따라서 분석자가 주입한 검체량과 칼럼 내로의 실제로 주입되는 검체량을 분배하거나 휘발성 차이에 따른 화합물 군을 선별적으로 주입하는 전용의 검체주입장치 (capillary column injector)를 사용하여야 하며 재현성이 다소 낮다. 반면 내경 0.53 mm 칼럼은 분리능은 다소 열등하나 검체주입량을 보다 증가시킬 수 있어 분석자가 주입한 검체 전량을 칼럼내로 주입할 수 있다. 즉 충전칼럼과 동일한 직접 검체주입장치 (packed inlet)를 겸용할 수 있으며 재현성이 보다 뛰어나다. 따라서 분석법의 우선순위, 즉 분리능 (0.25 〉 0.32 〉 0.53 mm) 및 재현성 (0.53 〉 0.32 〉 0.25 mm)에 따라 적절한 내경의 칼럼을 선택하여야 한다. Liquid phase의 두께 (film thickness)는 15 m 칼럼의 경우 0.5~2 μm, 30 m 칼럼의 경우 0.1~1 μm 범위인데 각각 1~1.5 μm 및 0.25~0.5 μm가 가장 보편적으로 사용된다.

우수한 칼럼효율을 유지하면서 분석시간을 단축하여 분석효율을 높이기 위한 조건은 확산속도가 큰 기체를 이동상 (일명 carrier gas, 운반기체)으로 선정하고 최적 유속 범위로 조절하여 사용하는 것이다. Carrier gas의 종류에 따라 최고

칼럼효율 값의 변화는 거의 없으나 최적 유속의 범위가 다르다. 즉 분자량이 작은 기체를 사용할수록 최고의 칼럼효율을 유지하는 유속범위가 넓어져 빠른 유속을 사용, 분석시간을 단축할 수 있다. 이러한 측면에서의 최적의 기체는 수소 (hydrogen, 분자량 2)이나 반응성이 있어 일부 칼럼 및 연소형 검출기와는 함께 사용할 수 없다. 그 다음은 헬륨 (helium, 원자량 4), 질소 (nitrogen, 분자량 28) 순이며 질소는 값은 저렴하나 최고의 칼럼효율이 나타내는 유속의 범위가 좁아 분석의 효율이 낮다. 최적 유속은 충전 칼럼에서 칼럼 내경에 따라 다소 상이하나 질소의 경우 20~40 mL/min이고 helium의 경우 40~60 mL/min 범위이다. 모세관 칼럼의 경우는 유량보다는 선속도 (linear gas velocity)를 기준으로 표시하는데 가장 많이 사용되는 helium의 경우 실용적 최적 선속도는 30~50 cm/sec 범위이다.

용매효율을 최대화하기 위한 liquid phase의 선택 원리는 충전 및 모세관칼럼에서 동일하다. 가장 일반적인 선택 방법은 대상 화합물의 극성에 맞추어 극성 화합물-극성 liquid phase, 비극성 화합물-비극성 liquid phase로 조합하는 것이다. 이 경우 대상 화합물의 머무름 시간이 지연되므로 간섭성분과의 분리 가능성이 높아진다. 또한 분석성분의 작용기별 상세한 분리 특성을 최적화하기 위해서는 liquid phase별로 알려진 McReynolds constant를 이용하는 것이 바람직하다. McReynolds constant는 squalene를 기준 liquid phase로 하여 각각의 liquid phase 특성을 머무름 지표에 따라 수치화 한 것으로 작용기별 표준 화합물은 benzene, 1-butanol, 2-pentanone, 1-nitropropane 및 pyridine이다. 분석 대상 화합물에 포함된 작용기를 감안하고 간섭성분들의 특성을 추정하면 최대 분리가 가능한 liquid phase를 선택하는 것이 가능하다.

2) 검체주입구 (inlet)

대부분 액체 상태인 검체를 기체화하여 칼럼에 주입하기 위한 장치이다. 기체 검체의 경우는 loop injector 등 전용의 주입기를 사용하기도 한다. 액체 검체는 대개 미세주사기 (micro syringe)를 사용, 이동상의 흐름에 영향을 주지 않도록 스스로 재봉합되는 실리콘 고무 재질의 격막 (septum)을 투과시켜 주입되며 고온 조건에서 빠른 속도로 기체화되어 일부 또는 전부가 분리관으로 들어간다.

검체주입구의 구조는 사용하는 분리관의 종류에 따라 모세관용 주입기 (capillary inlet) 및 충전 칼럼용 주입기 (packed inlet)의 두 종류가 있다. 충전 칼럼용 주입기는 미세주사기로 투입한 검체의 기화분 전량이 칼럼으로 주입되는 구조로 충전칼럼과 내경 0.53 mm인 모세관칼럼의 검체 주입에 사용된다. 모세관용 주입기 (capillary inlet)에는 모든 모세관 칼럼을 사용할 수 있는데 split과 splitless injection의 두 가지 검체 주입방식이 있다.

Split 주입방식은 미세주사기로 주입한 검체를 기화시킨 후 일부만을 칼럼으로 도입시키는 방식이다. 기화된 검체는 두 갈래의 기체 통로 즉, 칼럼으로 흐르는 이동상 기체 (carrier gas)와 주입구 밖으로 배출되는 split vent용 기체의 유속에 따라 분배되어 일부만이 칼럼으로 주입된다. 그 비율은 split vent용 기체의 유속을 조절하여 대개 이동상 기체의 10~1,000배 범위로 변경할 수 있다. 즉, 실제로는 미세주사기로 주입한 검체의 1/10~1/1,000 만이 칼럼으로 주입되게 된다. 이러한 주입법은 실제로 칼럼에 주입되는 검체량이 적어 감도가 낮게 나타나는 농약성분의 잔류분석에는 적용할 수 없는 단점이 있다.

Splitless 주입방식에서는 split vent용 기체의 흐름을 막은 상태에서 미세주사기로 검체를 주입하면 검체는 기화한 후 전량 칼럼으로 도입된다. 이때 칼럼의 온도는 검체용매 끓는점의 10℃ 이하로 낮은 온도를 유지한다. 기화된 검체는 낮은 온도로 인하여 칼럼 선단에 좁은 범위 (flooded zone)로 다시 응축된다. 일정 시간 (30~90 초)이 지난 후 split vent용 기체를 흘리면 inlet내 용매 등 고휘발성 성분들은 배출되고 동시에 칼럼 온도를 상승시키면 칼럼 선단의 용매가 빠르게 이동하면서 휘발성이 낮은 성분들을 좁은 범위로 농축한다. 칼럼 온도를 점차 상승시키면 저휘발성 성분들이 서서히 이동하면서 분리가 시작된다. 이 방법은 주입용매보다 최소한 끓는점이 20℃ 이상인 저휘발성 성분에 대하여 적용이 가능한데 대부분의 농약은 용매보다 휘발성이 매우 낮은 성분들이므로 이러한 주입법의 사용이 가능하다. Splitless 방식은 주입검체 전량이 칼럼에 도입되므로 잔류농약 분석과 같은 미량분석에 적합하여 가장 많이 사용된다. 그러나 칼럼온도를 등온조건 (isothermal)으로 사용할 수 없으며 반드시 승온조건 (temperature-programming)이어야 한다는 단점이 있으며, split vent 유속 및 개폐시간 조절 등 기기 숙련도를 요구한다.

3) 검출기 (detector)

분리관을 통하여 carrier gas와 함께 기체 상태로 유출되는 화합물들을 검출하는 장치이다. GC용 검출기는 검출기의 반응 (response)이 용출되는 성분의 농도 (concentration)나 질량용출속도 (mass flow rate)에 비례하는 미분형 검출기 (differential detector)이다. 따라서 chromatogram 상 peak의 면적이 용출된 화합물의 총량과 비례한다.

검출기의 특성을 파악하는 것은 분석 목적에 따른 적절한 검출기의 선택 및 정성/정량 분석에 있어 매우 중요한 사항이다. 잔류분석을 위한 GC용 검출기에서 중요한 특성은 선택성 (selectivity, specificity), 감도 (sensitivity, detectability, response), 직선적 비례 구간 (linear dynamic range), 기타 운용 및 유지 보수성이다.

선택성은 검출기의 화합물별 반응 정도의 차이 즉, 동일한 양에 대한 화합물별 신호발생 정도의 차이를 의미하는데 이는 검출기의 동작원리 (operating principle)에 의하여 좌우된다. GC에서 이용되는 검출기 종류는 이러한 선택성에 따라 거의 모든 화합물에 대하여 반응을 나타내는 universal detector와 특정 화합물 부류에만 반응을 나타내는 specific detector로 구분된다. GC에서 가장 보편적으로 사용되는 flame ionization detector (FID)나 thermal conductivity detector (TCD)는 universal detector이며 electron capture detector (ECD), nitrogen-phosphorus detector (NPD) 및 flame photometric detector (FPD) 등은 specific detector이다. 잔류농약 분석에서는 검체 중 분석 대상 화합물의 양이 매우 작아 정제를 잘 한다하더라도 대상 화합물보다는 불순물의 양이 많다. 따라서 모든 화합물에 반응을 나타내는 universal detector를 사용할 경우 보통 간섭에 의하여 분석이 불가능하다. 따라서 FID나 TCD등의 universal detector를 사용하는 경우는 매우 드물며 잔류분석에서 주로 사용되는 검출기는 specific detector이다.

잔류농약 분석에서 분석화합물의 양은 매우 작으므로 검출기의 감도가 높아야 한다. 검출기의 감도는 검출할 수 있는 화합물의 최소량 (minimum detectable quantity, MDQ 또는 limit of detection, LOD)으로 표시되는데 이는 검출기의 화

합물에 대한 신호 대 검출기 자체의 잡음비 (signal to noise ratio, S/N)가 3 이상일 때의 화합물의 양으로 표시된다. 이러한 S/N비는 peak의 높이 (peak height)로 결정되기 때문에 chromatography에서의 머무름 시간에 따라 다소 변동될 수 있다. 즉 등온조건에서 머무름 시간이 길수록 화합물의 peak는 넓어지므로 특정 S/N비에서의 화합물의 MDQ는 커진다. 잔류 농약분석에 실용적으로 이용하기 위해서 요구되는 검출기의 화합물에 대한 감도는 최소한 ng 수준이하이다. 현재 널리 사용되고 있는 ECD, NPD 및 FPD의 대상 화합물에 대한 MDQ는 ng~pg 수준이다.

아무리 선택성과 감도가 우수하다 하더라도 대상 화합물의 농도 (또는 mass flow rate)와 검출기 반응치 와의 직선적 비례구간이 좁다면 정량분석 결과에 대한 오차가 발생하기 쉽다. 따라서 직선적 비례구간이 넓은 검출기를 선택하거나 비례구간내로 검체의 농도를 조절, 정량하는 분석자의 검출기 직선성에 대한 이해가 반드시 필요하다.

잔류농약 분석에서 가장 많이 사용되는 검출기를 특성별로 요약하면 표 9와 같다. ECD (electron capture detector, 전자포획검출기)는 친전자성 화합물에 대하여 높은 감도를 나타내는 선택성 검출기로 다음과 같은 원리에 의하여 동작한다. 즉 β-선원 (보통 방사성 동위원소 ^{63}Ni 사용)으로부터 방출된 고에너지 β-선이 carrier gas (질소나 Ar/methane)를 이온화하여 plasma화 한다. 이 중 thermal electron에 의하여 양 전극 간에는 일정한 전류 (standing current)가 발생한다. 친전자성 화합물이 유입되면 전자를 포획에 따른 standing current의 감소가 일어나며 이 감소분을 신호로서 검출한다. ECD는 할로겐을 함유하는 화합물, conjugated carbonyl, nitrile이나, nitrate기를 함유하는 화합물에 매우 높은 감도를 나타내어 과거 유기염소계 농약뿐만 아니라 현재 사용하고 있는 농약의 잔류분석에도 가장 널리 이용되고 있다, ECD에 감도를 나타내기 위한 최소 요건은 분자 내에 fluorine 원자 3개, chlorine 원자 2개, bromine이나 iodine 원자는 1개 이상이 함유되어 있어야 한다. 검체 비파괴 검출기이며 감응을 나타내기 위해서는 반드시 질소나 Ar/methane을 흘려야 한다. 즉 helium을 carrier gas로 사용할 경우에는 makeup gas로 질소 등을 사용하여야 한다. ECD는 비연소형 검출기이므로 오염 가능성이 높아 동작시 항상 세척용 purge gas를 일정량 흘려야 한다. 직선적 비례구간이 다른 검출기에 비하여 상대적으로 좁으므로

검체 분석 시에는 항상 비례구간 내에서 정량하여야 한다.

표 9. 잔류농약 분석에서 사용되는 GC용 주요 검출기 특성

검출기	대상 화합물	감도	직선적 비례구간	안정성
ECD	할로겐 화합물, conjugated carbonyl, nitrile, nitrate기 함유 화합물	pg	10^3	우수
FPD	인, 황 함유 화합물	ng~pg	10^4	우수
NPD	인, 질소 함유 화합물	ng~pg	10^4	보통

FPD는 flame emission 현상을 이용한 검출기이다. 수소연료가 풍부한 조건에서 carrier gas에 함유된 화합물을 연소하여 인은 HPO, 황은 S_2 형태에서 방출된 발광 spectrum 중 인은 526 nm, 황은 394 nm의 빛을 집속, 광전증배관(photomultiplier tube)으로 검출한다. 인과 황 함유 화합물 분석 시 별개의 광학 필터를 교체하여 사용한다. 선택성이 매우 우수한 검출기이므로 분리관을 열화시키지 않는 범위 내에서 검체정제를 최소화할 수 있는 장점이 있다. 동작의 안정성도 우수하여 사용하기 용이하나 초기 점화 시 상하의 2중 불꽃을 유지하도록 연소가스의 유속을 잘 조절하여하여야 한다. 직선적 비례구간은 넓은 편이고 인은 직선적이나 황의 경우에는 peak 면적의 제곱근에 비례한다.

NPD는 thermionic specific detector (TSD), alkali flame ionization detector (AFID), thermionic emission detector (TED) 등 많은 상용 명칭으로 불리는데 이는 초기 구조의 변경에 따른 것으로 현재의 구조는 대동소이하다. 즉 FID의 flame tip 위에 alkali salt (보통 Rb_2SO_4)를 올려놓고 연료 부족 상태의 flame plasma에서 alkali 금속을 이온화 ($A^+ \rightarrow A^o$)하는 구조로 되어 있다. Carrier gas에 함유된 인이나 질소화합물의 연소 시 발생한 radical (N의 경우 CN radical)의 전자친화력이 alkali 금속의 이온화 에너지와 일치하면 이온화되고 이로 인한 전류의 증가분이 신호화된다. 이 검출기는 인과 질소 화합물에 선택적이며 감도가 우수하나 안정성은 보통인 편이다. Alkali salt는 동작 중 alkali 금속이 증발하므로 약 600시간 정도의 수명 후 교체하여야 하며 흡습성이 있어 초기 장착 후 활성화 및 습기 차단 등 유지 관리에 분석자의 숙련도가 요구된다.

그 외 일부 잔류분석에 사용되는 GC용 검출기로는 강한 자외광을 조사하여 이온화시킴으로써 방향족 화합물, 할로겐 함유 불포화 탄화수소, 황가스 등에 선택적으로 감도가 높은 photoionization detector (PID)가 있다. 또한 FPD와 기본 원리는 동일하나 단속적인 불꽃 점화/소화 장치를 이용, carbon에 비하여 delayed emission되는 인, 질소, 황 등 13개 원소에 적용, 이들을 함유하는 화합물에 대하여 선택적이며 고감도인 pulsed flame photometric detector (PFPD)가 있다. 아울러 원자발광현상과 광학회절장치를 이용하여 각종 원소 함유 화합물을 선택적으로 검출할 수 있는 atomic emission detector (AED)도 이용 가능하다. 최근에는 chemiluminescence detector (CLD)가 이용 가능한데 대상 화합물은 질소 및 황 함유 화합물이며 원소에 따라 별개의 검출기가 상용화되어 있다. 질소 CLD는 NPD에 비하여 우수하고 황 CLD는 FPD의 sulfur mode 보다 감도 및 직선성에서 우수한 것으로 알려져 있다.

4) GC 분석 대상 화합물

GC를 이용하여 잔류분석을 수행할 수 있는 화합물 대상을 이해하는 것은 검체 추출 및 정제과정과도 밀접한 관련이 있으므로 매우 중요한 사항이다. 즉 검체 추출 및 정제과정의 선택은 해당 기기분석 시 제거하여야 할 간섭물질에 의하여 결정되므로 분석기기의 선택에 따라 잔류분석의 전체 과정이 좌우된다.

GC로 분석할 수 있는 화합물은 휘발성 유기 화합물들이다. 무기 화합물들은 극히 일부를 제외하고는 대개 휘발성이 없으므로 대상 화합물이 아니다. 여기서 휘발성이라 함은 보통 화학에서 언급하는 휘발성 수준은 아니다. GC로 분석이 가능한 화합물의 휘발성의 범위는 약 10^{-7} mmHg (10^{-9} Pa)까지도 확대될 수 있다. 따라서 일반적으로 비휘발성이라고 인식되는 화합물들도 상당수가 GC로 분석이 가능하다.

GC가 보통 100~300℃의 고온조건에서 분석하는 기기임을 감안할 때 분석이 어려운 화합물은 우선적으로 열분해가 일어나는 화합물들이다. 분자 내에 열에 취약한 작용기를 함유하고 있는 화합물들은 휘발성이 높더라도 기기분석의 재현성이 현저히 떨어져 분석하기 어렵다. 이러한 화합물은 극미량을 주입하였을 때는 peak가 나타나지 않다가 어느 량 이상이 주입되면 비로소 peak가 관찰되는

것으로 확인할 수 있는데, 표준검량선은 원점을 통과하지 않으면서 곡선으로 나타나는 경향이 있다. 또한 화합물이 너무 극성이면 분리관 내 일부 존재하는 활성기에 흡착되는 경향이 있어 peak tailing 현상이나 동일한 검체 주입 시에도 peak 면적이 크게 변동하는 현상이 관찰된다. 정상적 GC 조건에서 특히 몇 점의 검체 용액을 주입한 후 표준용액을 재주입하였을 때 검체 용액 주입전의 표준용액과 peak 면적이 과다하게 차이를 보인다면 이는 열분해나 흡착의 가능성이 높다.

GC로 분석하기 적합한 화합물들은 해리하지 않는 중성의 비극성 화합물들이다. 일반적으로 분자 내에 해리하는 특성을 나타내는 carboxyl기, phenolic hydroxyl기나 amino기를 갖고 있는 화합물들은 너무 극성이 크므로 GC로 잔류분석을 하기 어렵다. 또한 amide, imide, alcoholic hydroxyl기 등을 갖고 있는 화합물들은 열분해 정도, 분자 전체 극성에 대한 작용기의 기여도, 흡착 등의 인자를 고려하여 선별적으로 잔류분석이 가능하다.

5.2 고성능 액체크로마토그래피법 (HPLC)

액체크로마토그래피는 분리관 내 이동상 (mobile phase)이 액체이며 고정상 (stationary phase)이 고체 또는 액체인 화합물의 물리적 분리 기술로서 이동상이 액체인 점을 제외하고 기본 분리 이론은 기체크로마토그래피와 매우 유사하다. HPLC는 고전적 액체크로마토그래피 즉, 검체 정제과정에서 사용되는 column chromatography를 고성능화 하고 검출기를 부착, 분석기기화 한 것이다. 고성능화의 주요 사항은 분리관내 충전하는 고정상으로 10 μm 이하의 작은 입자의 사용과 이들 입자의 고압 충전, 그리고 액체인 이동상을 균일하게 흘리기 위한 고성능 고압펌프의 개발이었다. 그 결과 고전적 column chromatography의 이론단수가 수십~수백/m 불과하였던 것에 비하여 현재 사용되는 HPLC 칼럼의 이론단수는 5만~10만/m에 달하며 분리 효율의 획기적 향상과 더불어 고감도 검출기의 개발에 힘입어 복잡한 혼합물의 정교한 분리 및 분석이 가능하여졌다.

1) 분리 양식 및 대상 화합물

HPLC는 고정상의 상태에 따라 고체인 liquid-solid chromatography (LSC)와 액체인 liquid-liquid chromatography (LLC)로 세분된다. LSC는 주로 흡착제를 고정상으로 한 흡착크로마토그래피를 의미한다. LLC는 보통 분배크로마토그래피를 의미하며 현재 가장 많이 사용되고 있는 HPLC의 형태이다. 또한 HPLC는 이온교환 및 크기배제와 같은 추가의 분리원리를 적용하여 각각 ion-exchange chromatography (IEC) 및 size exclusion chromatography (SEC)로 세분된다. 이러한 4가지 양식의 HPLC 중 잔류농약 분석에서 가장 많이 사용되는 분리양식은 LLC이며 그 외 IEC와 LSC가 일부 사용되나 그 이용 빈도는 LLC에 비하여 적다.

표 10. HPLC의 분리 원리 및 양식

분리 원리	분리 양식	대상 화합물
흡착 (adsorption)	LSC (normal phase)	비극성 화합물 입체이성질체
분배 (partition)	순상 (normal phase) LLC	비극성 화합물
	역상 (reversed phase) LLC	극성 중성 화합물
	- 이온억압 (ion-suppression)	약이온성 화합물
	- 이온쌍 (ion-pair)	이온 화합물
	Hydrophilic-interaction (HILIC)	극성 화합물
	Hydrophobic-interaction (HIC)	극성 고분자 화합물
이온교환 (ion-exchange)	양이온 교환 (cationic IEC)	양이온 화합물
	음이온 교환 (anionic IEC)	음이온 화합물
크기 배제 (size exclusion)	겔 침투 (gel permeation, GPC)	지용성 고분자 화합물
	겔 여과 (gel filtration, GFC)	수용성 고분자 화합물

SEC 중 GPC는 대부분의 유용성 농약과 간섭물질들의 대부분이 저분자 화합물이므로 분리 원리에 적합하지 않아 거의 사용되지 않는다. 저능률의 GPC는 유지 등 고분자 간섭물질을 제거하기 위하여 검체 추출액의 정제 과정에 일부 사용된다. GFC는 GPC와 동일한 분리 원리이나 수용성 이동상을 사용, 단백질과 같은 수용성 고분자 화합물을 주 분리 대상으로 하기 때문에 잔류농약 분석

에서의 이용은 거의 없다. HILIC는 분배 원리 중 순상 LLC가 응용된 형태로 극성이 높은 수용성의 당류나 peptide 등의 분리에 주로 사용되는 양식이며 HIC는 분배 원리 중 역상 LLC가 응용된 형태로 단백질 등 고분자 화합물의 분리에 주로 사용되므로 잔류농약 분석에서의 응용 예는 거의 보고된 바 없다.

HPLC로 분석할 수 있는 화합물은 GC와는 달리 비휘발성 화합물들이다. 휘발성이 너무 강한 기체 또는 저분자 화합물들은 이동상 중에서 기화, bubble을 형성하여 이동상의 흐름 자체를 방해하기 때문에 HPLC로 분석하기 어렵다. HPLC는 GC와는 달리 상온 또는 대개 50℃ 이하의 저온 분석조건이므로 열분해에 취약한 화합물들의 분석에는 아무 문제가 없다. HPLC에서 주로 사용하는 reversed phase LLC 조건을 감안하면 적당한 머무름 시간을 나타내는 중간 극성~극성 화합물의 분석에 유리하며, 이온 및 해리하는 작용기를 보유한 분자들도 LLC 양식에서 ion-suppression이나 ion-pair 기술을 이용하거나 ion-exchange 양식으로 분리 분석할 수 있다. 무기 화합물들도 HPLC로 자주 분석되나 농약에서는 무기화합물의 종류가 유기화합물에 비하여 상대적으로 적어 그 이용은 적은 편이다. 최근 등록되는 농약들은 그 분자량이 과거 농약들보다 비교적 큰 편이어서 휘발성이 약하고 극성도 비극성 농약이 주류였던 것에 비하여 중간 극성~극성의 다양한 범위를 나타내므로 HPLC의 이용이 빠른 추세로 증가하고 있다.

2) 분배크로마토그래피 (partition chromatography)

HPLC에서는 흡착, 분배, 이온교환, 크기배제의 4가지 분리 원리를 다양하게 이용할 수 있는데 잔류농약 분석에서 주로 이용하는 원리는 분배이다. 주로 silica gel을 충전제로 사용하는 흡착크로마토그래피는 입체선택적 분리는 뛰어나나 극성 화합물을 용출시키기 위한 이동상 극성 증가 (용출강도 증가)에 한계가 있어 너무 이동상의 극성을 증가시키면 분리관의 regeneration이 불가능하다. 비극성 화합물의 분석에는 GLC가 보다 최적이며 HPLC가 주로 중간 극성~극성 화합물들을 분리 분석하기 위한 기기인 점을 감안하면 흡착크로마토그래피는 사용 빈도가 낮다. 이온교환크로마토그래피는 이온 화합물들의 분리에 적합하기는 하나 이온교환 현상은 에너지가 많이 요구되는 과정이므로 분리에 소요되는 시간이 길어지는 단점이 있다. 분배크로마토그래피에서도 이온 화합물

들을 분리하는 기법이 이용 가능하므로 이온교환크로마토그래피의 활용도는 크지 않다.

분배크로마토그래피에서는 서로 섞이지 않는 두 상 (phase), 즉 고정상과 이동상간 화합물들의 서로 다른 분배 (partition) 정도에 따라 분리가 이루어진다. 서로 섞이지 않는 고정상과 이동상은 극성 고정상-비극성 이동상 및 비극성 고정상-극성 이동상의 두 가지 조합이 가능하다. 극성 고정상-비극성 이동상 조합에서 극성 고정상에 보다 많이 분배된 용질 (화합물)을 용출시키기 위해서는 고정상에 가까운 보다 극성이 강한 이동상을 사용하여야 한다. 즉 이동상의 용질에 대한 용출강도는 극성이 증가하는 방향이며 이는 고전적 흡착 column chromatography에서 용출강도의 증가 방향과 같은 방향이므로 순상 (normal phase)라고 부른다. 반면에 비극성 고정상-극성 이동상 조합에서는 이동상의 용질에 대한 용출강도는 극성이 감소하는 방향이며 이는 고전적 흡착크로마토그래피에서 용출강도의 증가 방향과 반대이므로 역상 (reversed phase)라고 부른다. 극성 고정상-비극성 이동상 조합은 고전적 크로마토그래피와 유사하여 극성 화합물을 용출시키기가 어렵다. 현대 HPLC의 가장 큰 장점 중의 하나는 극성 화합물을 용이하게 용출, 분리하는 것이며 이는 비극성 고정상-극성 이동상 조합의 역상 크로마토그래피로 가능하다.

분배크로마토그래피에서 사용되는 고정상은 일부 polymer를 제외하고는 주로 silica를 support로 하여 비극성 액상물질을 피복하여 사용하여 왔다. 그러나 피복형의 경우 고정상이 이동상 용매에 의하여 일부 용해되거나 고압의 높은 유속을 사용할 경우 전단력 (shear force)에 의하여 벗겨지는 (stripping) 단점이 있다. 따라서 최근의 고정상은 silica 표면에 분리를 위한 작용기를 화학적으로 결합시킨 형태 (bonded phase)가 대부분이다. 화학적으로 결합시키는 작용기의 종류는 가장 많이 사용되는 순으로 역상의 경우 octadecyl (ODS, C_{18}), octyl (C_8), phenyl, cyanopropyl (CN, cyano, nitrile)기 등이며 순상의 경우 aminopropyl (NH_2), cyanopropyl, diol기 등이다. 이 중 cyanopropyl기는 순상 및 역상에서 모두 사용이 가능하며 phenyl기의 경우는 phenylpropyl, phenylethyl, α-methyl-phenylethyl 등의 ligand 형태로 사용된다. 이러한 작용기 중 절대적으로 많이 사용되는 작용기는 C_{18}인데 같은 C_{18}이라 하더라도 support로 사용되는 silica의 종류와 결합 방식, 그리고 ligand 변개에 따라 다양한 특성의 column이

사용되고 있으므로 신중한 선택이 필요하다.

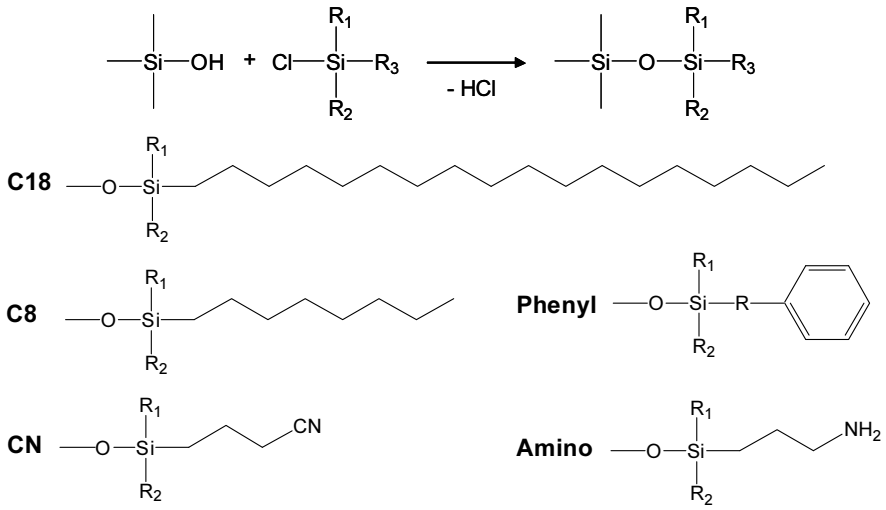
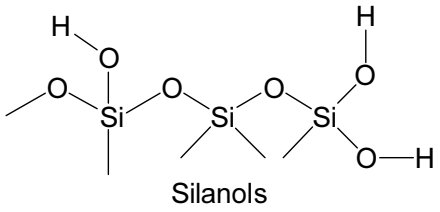


그림 8. Silica support 표면 반응에 의한 bonded phase HPLC column

먼저 천연 silica를 사용하지 않고 고순도의 합성 silica를 재료로 사용한 bonded phase column이 있다. 예를 들면 Waters 사의 NovaPak™이나 Merck사의 Lichrospher™는 천연 silica base이고 각 사의 Symmetry™나 Purospher™는 합성 silica base이다. 천연 silica에는 정제를 하더라도 금속이 일부 함유되어 있어 순수한 분배가 아닌 흡착, 이온교환 등의 부수적 효과가 나타날 수 있다. 특히 염기성 화합물에 대해서는 tailing 현상을 유발하므로 분석하고자 하는 대상 화합물에 따라 silica base의 종류를 확인하여야 한다.

다음으로는 silica 표면의 silanol기에 대한 사항이다. Silica 표면에 존재하는 silanol기는 약산성이며 친수성이어서 극성 화합물과 상호작용할 수 있고 또한 흡착의 특성을 나타내는데 bonded phase를 반응시키는 작용기이기도 하다. Silica 표면에서의 silanol 농도는 8~14 μmol/m^2 인데 bonded phase를 제조할 때 최대로 반응시킬 수 있는 silanol 농도는 4 μmol/m^{2}이다. 즉 입체장애로 인하여 모든 silanol을 반응시킬 수 없으므로 상당수의 silanol은 반응 후에도 반응하지 않은 상태로 존재한다.



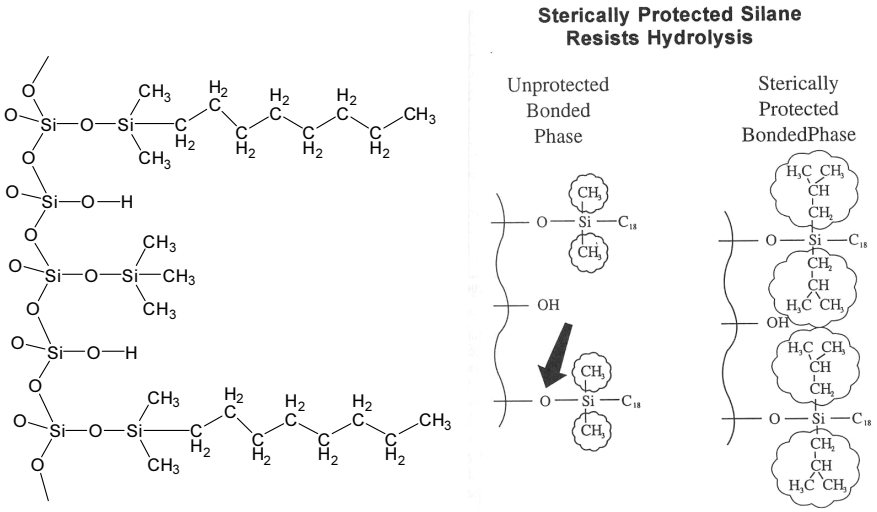


그림 9. Silica 표면 중 silanol 잔기를 최소화하기 위한 endcapping
왼쪽) C8 bonded phase의 endcapping,
오른쪽) endcapping ligand에 따른 가수분해에 대한 안정성

이러한 silanol 잔기 (residual silanol)들은 흡착, 약산성으로서 염기성 화합물에 대한 이온교환 특성, 그리고 mobile phase가 염기성일 경우 가용화에 따른 collapse 현상 등 분리에 악영향을 유발한다. 이를 방지하기 위하여 C_{18}이나 C_8 bonded phase 반응 후 입체장애가 보다 작은 methyl 이나 isobutyl기를 추가로 반응시켜 유리의 silanol 잔기를 최소화하는데 이를 endcapping이라고 한다. Endcapping된 C_{18}이나 C_8 column은 사용 pH 범위가 넓고 흡착, 이온교환 및 가용화 특성이 감소하는 장점이 있으나 endcapping 되지 않은 column과 상이한 분리 특성을 보이는 경향이 있으므로 이를 확인, 선택하여야 한다.

한편 endcapping 반응 정도가 커질수록 C_{18}이나 C_8 column 내부는 친유성 특성(hydrophobicity)이 커진다. Endcapping이 잘 된 column에 극성이 높은 화합물 분석을 위하여 이동상으로 100%에 가까운 물을 사용할 경우, 고정상의 높은 친유성으로 인하여 이동상인 물은 충전제를 적시지 못하게 되므로 모든 화합물이 dead time에 용출되거나 용량계수가 매우 작아지는 channeling 현상이 일어날 수 있는데 이를 hydrophobic collapse라고 부른다. 이를 방지하기 위하여 polar group ligand를 C_{18} 사슬 내에 반응시킨 column들이 있다. 예를 들면 Waters 사의 SymmetryShield RP18™이나 Xterra™ RP18 등이다. 이러한 칼럼들은 작용기 구조의 변화가 일어났기 때문에 당연히 일반 C_{18} 칼럼과는 다른 머무름 특성을 나타낸다.

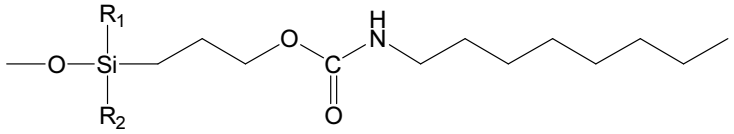


그림 10. Embedded polar group ligand의 삽입

따라서 역상 bonded phase에서 C_{18} 칼럼을 사용, 대상 화합물을 분리 분석하고자 할 때에는 대상 화합물의 특성, 머무름 효율, 사용 이동상 등을 고려하여 칼럼 선택에 신중을 기하여야 한다.

역상크로마토그래피의 장점은 해리하지 않는 중성 화합물뿐만 아니라 이온성 화합물도 광범위하게 분리 분석이 가능하다는 점이다. 즉 약하게 해리하는 화합물은 주로 ion-suppression (이온억압), 이온 화합물은 ion-pair 기법을 이용하는데 이는 특수한 칼럼을 이용하는 것이 아니라 이동상을 적절히 변형시키는 기술로 가능하다.

Ion-suppression의 원리는 ion-associated partition의 원리와 동일하다. Acetonitrile/물 또는 methanol/물의 혼합액과 같은 보통의 이동상을 사용하면 약산이나 약염기성 화합물들은 이동상 중에서 일부 해리, 해리/비해리 화학종의 혼재로 tailing이나 넓은 peak를 얻게 된다. 그러나 이동상에 적절한 완충용액을

가하여 pH를 약산이나 약염기성 화합물 pKa의 1.5 이상 차이를 보이도록 조절하면 대상 화합물의 해리가 억압되므로 단일 화학종의 sharp한 peak를 얻을 수 있다.

Ion-pair는 이동상에 ion-pair 시약을 첨가하는데 그 원리가 다소 복잡하다. Ion-pair 시약은 분자내에 hydrophobic한 group과 이온기가 함께 존재하는 화합물이다. 양이온 분석에는 counter ion으로 sodium alkylsulfonates, 음이온 분석에는 tetraalkylammonium halides를 주로 사용한다. 이동상에 분석 대상 이온과 반대의 ion-pair 시약을 첨가하면 hydrophobic group은 C_{18} stationary phase에 녹아 들어가고 고정상 표면에 ionic group이 배치되며 평형에 도달한다. 분석하고자하는 화합물은 주로 이온 교환 그리고 C_{18}의 분배에 의하여 분리가 일어나게 된다. 사용하는 ion-pair 시약의 alkyl chain 길이, 이동상의 pH 및 염 농도에 따라 머무름 시간이 변동되므로 적절한 머무름 특성을 나타내도록 조절이 가능하다.

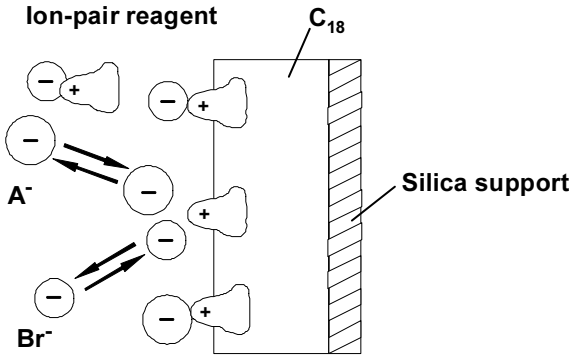


그림 11. Ion-pair chromatography의 분리 원리

HPLC 기기의 구성은 GC와 마찬가지로 분리의 핵심인 분리관 (column), 검체 주입장치 (injector), 검출기 (detector) 및 이동상 이송장치 (solvent delivery pump)로 이루어지며 기타 온도조절 및 데이터 처리장치가 부속되어 있다. 그러나 각 부분의 구조, 재질 및 특성은 GC와 판이하게 다르다.

3) 분리관 (column)

화합물간 분리가 일어나는 곳으로 GC와 마찬가지로 HPLC의 심장부이다. 화합물간 최적 분리를 위한 주요 인자로 칼럼효율 (column efficiency) 및 용매효율 (solvent efficiency)이 높아야 하는 것은 GC와 마찬가지이다.

HPLC에서의 칼럼효율은 chromatography를 분별 증류분리의 개념으로 해석하는 단 (段) 이론 (plate theory)에 의하여 HETP는 다음과 같은 식으로 표시되는데 GC 이론과는 다소 상이한 사항이 있다.

$$HETP = A \cdot \mu^{0.33} + B/\mu + C \cdot \mu + D \cdot \mu \quad \text{(Giddings theory)}$$

A : Eddy diffusion (와류확산)과 mobile-phase mass transfer (이동상 중의 물질 이동),
B : longitudinal diffusion (칼럼 축방향으로의 확산),
C : stagnant mobile-phase mass transfer (정체된 이동상 중의 물질 이동),
D : stationary-phase mass transfer (고정상 중의 물질 이동),
μ : 이동상 속도 (mobile-phase velocity)

Eddy diffusion (와류확산)은 다경로 현상으로 입자로 충전된 칼럼에서는 피할 수 없는 band broadening의 원인이다. 부정형 (irregular) 보다 구형 (spherical) 입자를 사용함으로써 이를 줄일 수 있다. Mobile-phase mass transfer (이동상 중의 물질 이동)는 입자 사이의 공간을 흘러가는 이동상이 입자 표면과의 마찰에 의하여 입자 표면에 가까울수록 유속이 느려지는 이동 속도의 차이인데 낮은 점도의 이동상을 사용하면 어느 정도 줄일 수 있다. Stagnant mobile-phase mass transfer (정체된 이동상 중의 물질 이동)는 이동상이 다공성 입자 내부에 침투함에 따라 나타나는 물질 이동의 차이인데 작은 입자를 사용할수록 내부 침투 길이가 짧아지므로 최소화할 수 있다. Stationary-phase mass transfer (고정상 중의 물질 이동)는 물질의 고정상 침투하는 정도에 따른 이동상으로의 분배 속도 차이를 의미하는데 고정상의 두께를 얇게 함으로써 줄일 수 있다. Longitudinal diffusion (칼럼 축방향으로의 확산)은 GC와 마찬가지로 시간이 경과함에 따라 이동상 중에서 물질의 확산이 커지는 현상이다. HPLC에서의 최적 유속은 GC에 비하여 $1/10^4$ 정도에 불과하기 때문에 분석 소요시간이

과다하게 소요되므로 실용적으로는 최적 유속보다 매우 빠른 유속에서 가동된다. 이 경우 이러한 확산 현상은 무시가 가능하다. 이상을 정리하면 가능한 한 넓은 표면적에 고정상을 얇게 결합시킨 작은 구형의 다공성 입자로 충전된 칼럼을 낮은 점도의 이동상을 유속을 낮추어 사용하면 최고의 칼럼효율을 얻을 수 있다.

잔류분석용 HPLC에서 사용하는 칼럼의 충전제는 2~5 ㎛ 범위의 구형 입자들이며 주로 사용되는 입자의 크기는 4~5 ㎛이다. 보다 작은 2~3 ㎛의 입자는 주로 짧은 칼럼의 충전제로 LC-MS 및 간섭물질이 적은 검체를 신속하게 분석하고자 할 때 일부 사용된다. 칼럼의 길이는 5~30 cm 범위인데 가장 보편적인 길이는 15~30 cm이다. 보다 짧은 길이의 칼럼을 사용하면 잔류분석에 필요한 분리능을 얻기 힘들고 더 긴 칼럼을 사용하면 이동상을 흘리는데 필요한 압력 (backpressure)이 과다하여 기기 안정성 및 degassing 측면에서 실용적이지 못하다. 칼럼 내경은 2~4.6 mm 범위로 3.9, 4.0 및 4.6 mm가 많이 사용되고 2~3 mm 내경의 칼럼은 2~3 ㎛의 입자로 충전, LC-MS 등에서 사용된다.

4) 이동상 및 이송펌프

중성의 잔류농약 화합물의 분석 시 가장 빈번히 사용되는 역상 분배크로마토그래피에서 일반적으로 사용되는 이동상은 acetonitrile, methanol과 물의 혼합액이다. 표준 유속은 내경 3.9~4.6 mm 칼럼 사용 시 0.8~1.5 mL/min 범위인데 backpressure 약 3,000 psi 이내에서 조절하는 것이 좋다. Acetonitrile은 methanol에 비하여 점도 및 극성이 낮아 backpressure가 적게 걸리고 보다 넓은 극성 범위의 화합물들을 분리할 수 있는 장점이 있다. 그러나 methanol에 비하여 phosphate와 같은 무기염류의 용해도가 낮은 단점이 있어 ion-suppression 등 이온성 화합물 분석 시 다소의 제한이 있을 수 있다. Methanol은 hydroxyl기를 함유하고 있어 acetonitrile 사용시 와는 다소 상이한 분리 양상을 보이므로 두 용매를 비교, 최적 용매를 선택하는 것이 바람직하다.

이동상으로 사용하고자 하는 용매는 사용 전 용매 중 함유된 기체를 제거(degassing)하는 작업이 필요하다. 그렇지 않으면 이동상으로 사용 중 기체가 bubble을 형성, 이동상의 이송을 방해한다. Degassing 방법은 단순 membrane 여과로도 충분한 경우가 있고 helium purge, 감압, ultrasonication 등의 방법이

있으며 전용의 degasser가 상용화되어 있기도 한데 사용하는 pump 및 gradient 방식에 따라 상이하다.

HPLC에서는 고압 하에서 이동상을 용출시키므로 안정된 크로마토그래피를 위하여 이동상 이송용 pump가 매우 중요하다. 최근의 HPLC용 pump는 대개 왕복식 (reciprocating) pump로 pulse를 제거하기 위하여 dual head 방식에 damper가 부착되어 있으며 최대 이송 압력은 6,000 psi이다. Pump의 유지관리에서 중요한 사항은 완충요액 등을 사용한 후에는 반드시 금속 염 등을 세척, 제거하여야 하고, 미생물의 번식을 방지하기 100% 물을 장기간 장착하지 않으며, 주기적으로 plunger seal을 교체하여 기기 손상을 최소화하는 것이다.

HPLC에서는 단일 조성의 이동상 조건으로 (isocratic) 분석을 수행할 수 있을 뿐만 아니라 이동상의 조성을 변화시키면서 검체를 분석할 수 있는데 이를 gradient elution이라고 한다. GC에서 temperature programming 법과 같이 분리의 효율이 향상되고 분석시간을 단축시키는 장점이 있다. Gradient 방식으로는 low-pressure mixing과 high-pressure mixing의 2 가지 방식이 있는데 전자는 1개 pump와 switching valve로 2~4 종의 용매를 교체 유입시키는 방식으로 저렴하나 완벽한 degassing을 요구하는 단점이 있다. 후자의 방식은 혼합하고자 하는 용매 수만큼 pump가 필요하나 사용의 편리성 및 안정성이 우수하다.

5) 검체주입장치 (injector)

HPLC에서 주로 사용하는 검체 주입장치는 6-port loop injector이다. 즉 검체 loading 시 정해진 부피의 sample loop (대개 20~500 μL)에 부분적 또는 전부 검체용액으로 채우며 이때 HPLC는 다른 경로를 통하여 연결되어 계속 가동하고 있는 상태이다. 검체 용액을 주입 (inject)하면 HPLC의 이동상 경로가 변경, sample loop를 통과하여 칼럼과 연결되도록 switching 된다. 상용화되어 있는 자동검체주입기 (autosampler)의 기본 원리도 이 범주를 벗어나지 않는다. 잔류분석용 HPLC에서 주입되는 검체용액의 양은 화합물의 감도와 검체 정제 정도에 따라 20~100 μL 범위인데 이 범위에서 칼럼효율은 크게 저하되지 않는다.

6) 검출기 (detector)

HPLC에서 주로 사용되는 검출기는 표 11에 나타내었다. 이 중에서 가장 사용 빈도가 높은 검출기는 자외가시광 흡광검출기 (UV/VIS absorption detector, UVD)이다. 주로 사용하는 파장 영역은 자외선 (ultraviolet) 영역이며 가시광 (visible) 영역은 광원으로 사용하는 중수소램프 (deuterium lamp)의 가시광 복사강도가 약하고 감도도 다소 낮아 가시광 영역 발색단 (chromophore)의 흡광계수가 높은 일부 화합물에서만 사용된다. UVD에는 단색광 (monochromatic) 및 다중광 (polychromatic)의 방식의 기기구조로 구분되는데 전자는 광원 → 단색광발생기 (monochromator) → 검체 용액 → 검출기 (1개의 photodiode 또는 photomultiplier) 방식으로 고전적으로 사용하는 UV/VIS 분광광도계와 동일한 구조이다. 단일 측정파장에서의 검출감도는 높으나 파장별 흡광도의 변화 즉 spectrum을 측정하기 위한 주사속도가 느린 단점이 있다. 측정파장이 이미 확립되어 있는 일상적 잔류분석에 적합하다. 다중광 방식은 photodiode-array detector (DAD)라고 불리는데 광원 → 검체용액 → polychromator → 검출기 (수백 개의 photodiode가 파장별로 배열) 방식으로 주사속도는 1초 이하로 매우 빠르나 검출감도는 전자에 비하여 상대적으로 낮다. 최적 파장을 선별하기 위한 분석법 개발에 적합하며 고감도가 요구되지 않는 잔류분석에도 사용 가능하다. 또한 감도는 더욱 낮아지나 검체를 2개 이상의 파장 (보통 최대 3개 파장)에서 동시에 측정할 수 있는 편리함도 있다.

UVD를 검출기로 이용한 잔류농약 분석에서, 일상적 검체 조제 과정을 거쳐 0.05 mg/kg 이하의 정량한계를 확보하기 위해서는 보통 대상 화합물의 분자흡광계수 (molecular absorptivity, ε)가 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$ 이상이어야 한다. 따라서 파장별 spectrum을 얻고 Beer-Lambert 법칙 (흡광도 absorbance = log (I_o/I) = ε bc, ε : absorptivity, b : light path, cm, c : 화합물의 농도)으로부터 흡광계수를 구하여 최적파장을 선정한다. 일반적으로는 발색단의 최대 흡광파장 (λ max)을 선정하나 검체 중 불순물에 의하여 간섭이 관찰될 때에는 흡광계수가 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$ 이상인 다른 파장을 선택하여도 무방하다. 잔류농약 분석에서의 측정파장은 가능한 한 220 nm 이상의 장파장을 설정하는 것이 유리하다. 유기화합물의 대부분은 분자 내 화학결합의 전자전이 (electronic transition)에 의하여 190~220 nm의 단파장을 흡수한다. 반면 장파장을 흡수하는 발색단, 예를 들어

conjugation 결합의 길이가 긴 구조의 화합물 수는 상대적으로 적다. 따라서 대상성분이 장파장의 발색단을 보유하고 있다면 장파장에서 측정할수록 불순물에 의한 간섭이 유발될 가능성이 적다. 또한 이동상으로 사용하는 용매들의 UV cut-off 파장과 멀리 떨어지게 되므로 기기의 잡음이 줄어들고 안정화되는 시간도 짧아진다.

표 11. 잔류농약 분석에서 사용되는 HPLC용 주요 검출기 특성

검출기	대상 화합물	감도*
자외/가시광 흡광검출기 (UV/VIS absorption detector, UVD)	발색단 함유 화합물	2 × 10-10 g/mL
형광검출기 (Fluorescence detector, FLD)	형광단 함유 화합물	1 × 10-11 g/mL
전기화학검출기 (Electrochemical detector, ECD)	산화/환원 화합물	1 × 10-12 g/mL

* 분석 적합 화합물 기준

UVD는 입사광량과 검체통과 후 광량의 차이를 기준으로 화합물을 검출하는데 반하여 형광검출기는 형광으로 방출되는 빛 자체를 검출하기 때문에 UVD 보다 감도가 높다. 예를 들어 색깔의 농담으로 그 차이를 구별하는 것보다 흰색 바탕에 특정 색이 존재할 때 보다 민감하게 색깔을 인식할 수 있는 것과 같은 이치이다. 또한 자연계 물질 중 형광을 방출하는 화합물의 수는 UV를 흡수하는 화합물의 수에 비하여 매우 적으므로 대상성분이 형광단 (fluorophore)을 보유하고 있다면 매우 선택적으로 분석을 수행할 수 있다. 동일한 이유로 형광검출기의 대상이 되는 농약의 성분 수도 제한적이므로 그 이용 빈도는 UVD에 비하여 상당히 낮은 편이다. 물질의 형광파장은 들뜬 분자의 relaxation 후 광방출 되기 때문에 흡수파장 보다 긴 파장으로 나타난다. 형광검출기는 분자의 들뜸(excitation)을 주로 특정파장의 광에너지로 공급하고 광 조사방향의 직각방향에 검출기를 배치하여 bandpass filter 등을 이용, 특정파장의 형광을 검출하는 구조로 되어 있다. 측정 시 흡수파장과 형광파장은 20 nm 이상의 간격을 두어야 입사 산란광에 의한 잡음을 최소화할 수 있다.

전기화학검출기는 산화/환원되는 quinone류 등의 화합물들을 검출하는데 매우 선택적으로 사용될 수 있다. 감도도 높으나 대상이 되는 농약성분의 수가 극히 적어 활용도는 낮은 편이다.

5.3 기체크로마토그래피/질량분석법 (GC-MS)

GC-MS는 기존의 GC에 질량분석기를 결합, GC의 취약한 정성 기능을 획기적으로 향상시킴과 동시에 고감도 정량도 가능하도록 고안된 분석기기이다. GC-MS는 크게 GC 부분, 질량분석기 부분, 그리고 이들을 결합시키는 interface 부분으로 구성되어 있는데 GC 부분은 기존 GC와 동일하며 MS 부분도 기존 질량분석기와 동일한 구조로 되어 있다. GC-MS를 효율적으로 사용하기 위해서는 각 기기부분에 대한 지식과 더불어 연속적으로 용출되는 carrier gas 중의 성분을 도입하고 이온화하는 interface 부분에 대한 이해가 필요하다.

1) 검체도입부 (sample inlet)

GC-MS에서의 검체도입부 (sample inlet)는 GC column으로부터 용출되는 carrier gas 중의 성분을 질량분석기의 이온화 (ionization) chamber에 도입하는 interface 부분이다. Interface의 종류에는 direct interface와 jet separator의 두 종류가 있다. Direct interface는 주로 capillary column에서 사용하는데 carrier gas 유속은 5 mL/min 이하이어야 한다. 그 이상의 유속을 사용하는 내경 0.53 mm의 capillary column이나 packed column을 사용하려면 carrier gas의 기체성분을 제거하는 jet separator를 사용한다.

2) 이온화 (ionization source)

도입된 검체의 질량분석을 하기 위한 이온화 방법으로 가장 보편적인 것은 electron impact (EI) 이다. 대개 70 eV의 electron beam으로 도입된 중성의 검체 화합물을 피폭시키며 대개 분자 양이온 (M^+)과 분자의 일부가 떨어져 나간 fragment의 양이온이 생성된다. 이 중 분자이온은 직접적으로 분석성분의 질량수를 나타내므로 가장 중요한 이온이다. Fragment ion은 분자 내 원자단 및 화

학결합 등 구조적 정보를 제공하는데 그 패턴은 일종의 지문과 같은 화합물 고유의 정성적 특성이다. 생성되는 분자 양이온의 상대적 양은 화합물의 안정도에 따라 상이한데 피폭 electron의 에너지를 다소 조절한다 하더라도 M^+의 비율은 그다지 높지 않다.

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2\ e^-$$

M^+의 비율을 높이기 위한 soft ionization 방법으로는 chemical ionization (CI), negative chemical ionization (NCI) 및 fast atom bombardment (FAB) 등이 있다. CI에서는 methane 등의 reagent gas를 사용, 이온화된 reagent gas가 분자를 이온화하도록 하며 EI에 비하여 분자이온, 주로 $(M+1)^+$의 비율이 높고 spectrum이 단순하다. 그러나 (M+reagent gas)와 같은 추가의 ion이 생성되고 사용법이 까다로운 단점도 있다.

$$CH_4 + e^- \rightarrow CH_4^+ + 2\ e^-$$
$$CH_4^+ + CH_4 \rightarrow CH_5^+ + CH_3$$

3) 질량분석기 (mass analyzer) 및 검출기 (detector)

이온화된 분자 및 fragment ion들은 질량분석기 내 자장 (magnetic field) 또는 전장 (electric field)에 의하여 전하 대 질량비 (mass to charge ratio, m/z)를 기준으로 분리된다. 질량분석기로는 quadrupole, ion-trap, double focusing, time of flight (TOF) 방식들이 있는데 가장 보편적으로 사용되는 것은 quadrupole과 ion-trap 방식이며 double focusing은 고분리능, TOF는 고분자를 위한 방식이다. Quadrupole 및 ion-trap 방식은 분리능이 최대 2,000 dalton으로 그다지 높지 않으나 농약들의 분자량이 대개 500 이하인 점을 감안하면 잔류분석에 충분한 분리능이라고 할 수 있다.

Quadrupole 분석기는 4개의 hyperbolic rod로 구성되어 있는 구조인데 각 봉에는 직류전위차가 서로 다르게 걸려 있으며 빠른 속도로 변환되는데 라디오파에 해당하는 주파수로 연동되어 있다. 특정 주파수 조건에 해당하는 m/z를 갖는 이온만이 4중 극자를 통과하며 나머지는 봉을 때리면서 소멸한다. 주파수를 빠른

속도로 주사하면 각 m/z에 해당되는 이온들이 차례로 검출기에 도달하므로 원하는 화합물의 mass spectrum을 얻을 수 있다. Ion-trap 분석기는 GC-MS를 위하여 고안된 quadrupole 분석기의 단순화 형으로 하전 화학종들의 안정성을 제공하는 ring electrode가 라디오파에 해당하는 주파수로 연동되는 구조이다. Ion-trap 분석기는 감도는 높으나 mass spectrum이 표준의 quadrupole spectrum과 다소 상이한 양상을 나타낸다. 질량분석기를 통과한 이온들은 보통 electron multiplier에 의하여 검출된다.

4) GC-MS를 이용한 기기분석 과정

GC-MS를 이용하여 잔류농약 분석을 수행하기 위해서는 다음과 같은 과정이 필요하다. 먼저 분자이온을 충분히 포함하는 m/z 범위로 MS 조건을 설정하고 대상화합물의 주입량이 10~100 ng이 되도록 표준용액을 GC-MS의 GC에 주입, total-ion chromatogram (TIC)을 얻는다. TIC는 분자와 fragment 이온의 총합 신호를 기준으로 작성되는 chromatogram인데 m/z 당 측정시간이 짧으므로 낮은 S/N (signal to noise ratio)으로 인하여 감도가 낮아 직접 잔류분석에 사용하기 어렵다. 따라서 우선적으로 분석화합물의 머무름 시간에 해당하는 peak로부터 mass spectrum을 추출한다. Mass spectrum으로부터 abundance가 높으면서 분석화합물의 구조를 잘 반영할 수 있는 fragment 이온을 선정한다. 이때 분자 이온이 가장 바람직하나 보편적으로 사용되는 EI에서 분자이온은 abundance가 약하여 선택할 수 없는 경우도 많다. 일반적으로 분자이온의 m/z에 가장 가깝고, 떨어져 나간 원자단이 확인된 abundance가 높은 fragment 이온들을 선정하는데 감도 저하를 최소화하기 위하여 2개를 초과하지 않는다. MS 조건을 selected ion monitoring (SIM) mode로 변경한 후 검체를 분석한다. SIM mode에서는 총 주사시간을 abundance가 높은 선택된 ion만을 검출하므로 상대적 S/N비가 높아 매우 높은 감도로 화합물을 분석할 수 있다. 또한 GC-MS에서의 머무름 시간과 화학적 구조가 동시에 반영되므로 정성 분석의 확실성이 높게 된다.

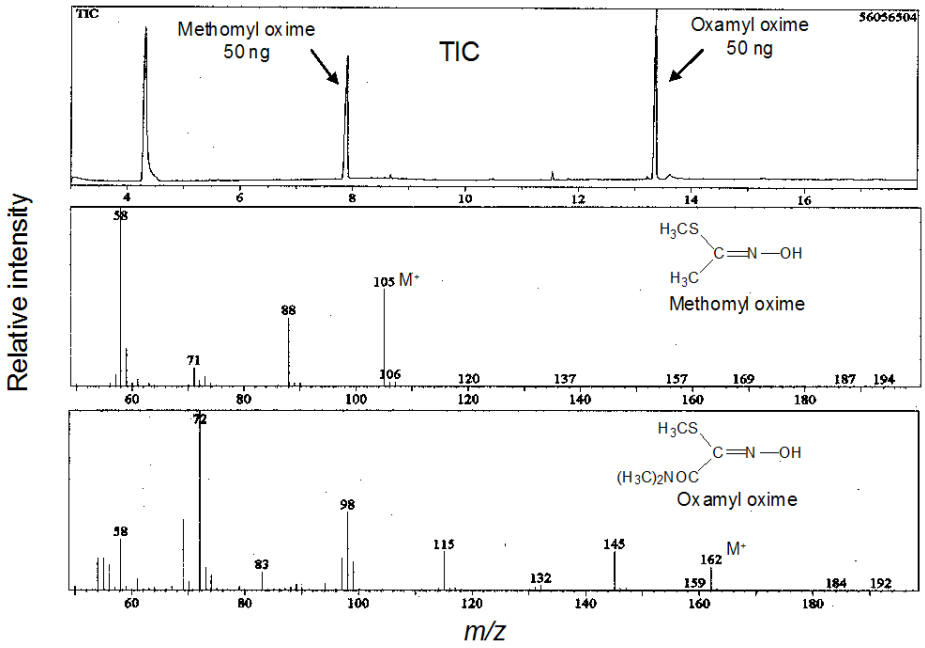


그림 12. Methomyl oxime과 oxamyl oxime의 TIC 및 mass spectra.
기기조건 : Shimadzu QP5050A GC-MS, DB-17MS, 0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm film thickness, programmed from 45℃ (2 min) to 220℃ (5 min) at 10℃/min, interface 280℃, injection port 220℃, carrier helium 2 mL/min, splitless injection, sample size 1 μL, mass range 50~200, electron impact 70 eV.

GC-MS SIM을 이용한 현미 중 살충제 methomyl 및 oxamyl 분석의 예는 그림 12 및 13과 같다. Methomyl과 oxamyl은 생체 중에서 모화합물과 함께 독성대사산물인 oxime으로 존재하므로 이를 잔류분석 성분에 포함시켜야 된다. 따라서 분석법은 모화합물도 oxime으로 변환시켜 총 oxime으로 분석한다. 먼저 methomyl oxime과 oxamyl oxime의 표준용액을 주입하여 TIC를 얻고 각 해당 peak의 mass spectrum을 관찰한다. Methomyl oxime의 경우에는 분자이온의 abundance가 높으므로 m/z 105와 88을 SIM용 이온으로 선정한다. Oxamyl oxime의 경우도 유사하게 m/z 162와 145를 선정한다. 이때 abundance가 높더라도 m/z 58, 72 등의 fragment는 대상화합물과의 구조 연관성이 상대적으로 적어 다른 불순물 구조로부터도 유래할 수 있으므로 SIM용 이온으로 적합하지 않다. SIM mode로 분석하면 그림 13에서와 같이 0.15 mg/kg의 낮은 잔류량에

서도 간섭 없이 충분한 감도로 분석할 수 있다.

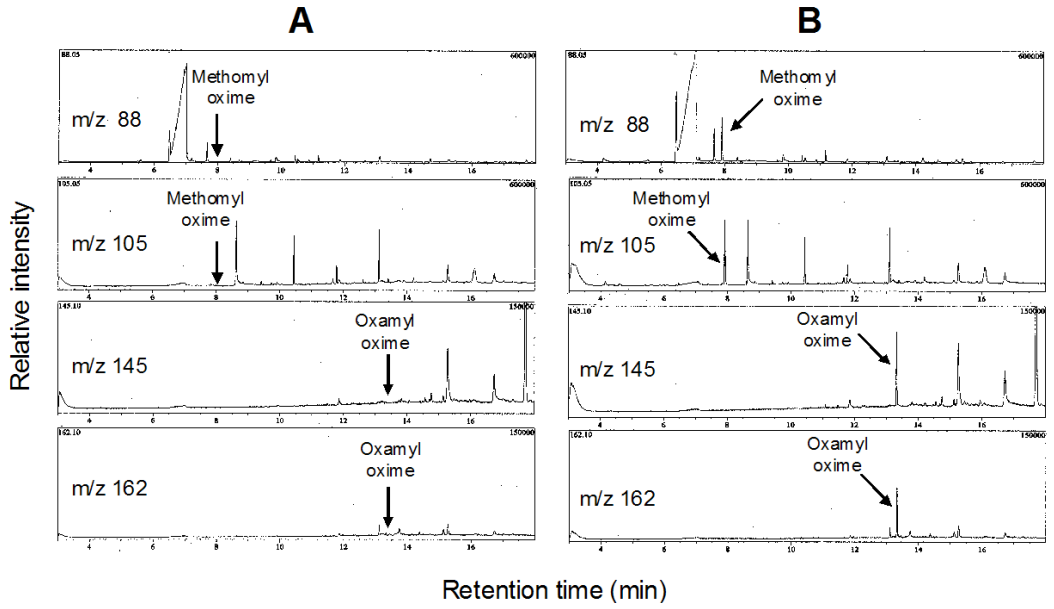


그림 13. GC-MS SIM을 이용한 현미 중 methomyl 및 oxamyl 분석.
A, 무농약 현미검체; B, methomyl과 oxamyl을 각각 0.15 mg/kg 처리한 검체

5.4 액체크로마토그래피/질량분석법 (LC-MS)

LC-MS는 GC-MS와 유사한 개념의 분석기기로 기존의 HPLC에 질량분석기를 결합, HPLC의 취약한 정성 기능을 획기적으로 향상시킴과 동시에 고감도 정량도 가능하도록 고안된 분석기기이다. LC-MS도 크게 HPLC 부분, 질량분석기 부분, 그리고 이들을 결합시키는 interface 부분으로 구성되어 있는 점은 GC-MS와 유사한데 interface 부분과 이온화 부분은 상당히 다르다.

1) 검체도입부 (sample inlet) 및 이온화 (ionization)

LC-MS가 GC-MS와 가장 다른 점은 검체도입부 (sample inlet)와 이온화 (ionization)가 일어나는 interface 부분이다. LC 용출액은 액체이고 이동상 속도가 0.1~1 mL

범위이므로 용출량은 0.1~1 g/min에 해당하는데 이 양은 기체인 GC에 비하여 백만 배 이상으로 과다한 양이다. 질량분석기가 감당할 수 있는 검체량이 최대 μg 수준인 점을 감안하면 이러한 양이 일시에 질량분석기에 도입되었을 경우 질량분석기의 이온화부분은 일시에 오염되어 버린다. 따라서 LC-MS의 interface는 분석물질인 용질의 손실 없이 이동상을 효과적으로 제거하는 것이 관건이다. 기기 생산회사 마다 다소의 방식 차이는 있으나 대개 Z, M, 또는 W 등의 spray interface 방식으로 용매를 제거한다. 또한 이 과정 중에서 이온화과정을 수행, 이온화된 성분만이 질량분석기로 도입되도록 설계되어 있다. 가장 많이 사용되는 interface 방식은 electrospray ionization (ESI) 및 atmospheric-pressure chemical ionization (APCI)이다. ESI에서는 다음의 4 단계에 의하여 이온화된다. 즉, 먼저 1) HPLC 용출액을 안개 상으로 nebulization하여 용매 방울형태를 형성한다. 양단간 3~4 kV가 걸려있는 고온의 금속 모세관 중에서 통과시키면 2) 용매 방울에 고전압에 의한 하전화가 일어나고 3) 하전된 방울은 coulomb repulsion에 의하여 작은 방울로 쪼개지면서 고온에 의하여 용매가 날라 가고 4) 최종적으로 분석성분의 이온화가 일어난다. 이러한 이온화는 분자 내에서 protonation ($(M+H)^+$, positive ion-mode) 또는 deprotonation ($(M-H)^-$, negative ion-mode)의 형태로 나타나게 되므로 ESI에 적합한 분자의 특성은 극성이 높거나 또는 이온 화합물들이다. 또한 단일 이온화가 일어나는 비교적 분자량이 적은 (대개 분자량 1,000 이하) 화합물이 분석 상 유리하다. ESI는 사용할 수 있는 이동상의 유속에 제한이 있으며 보통 사용하는 유속은 0.1~0.3 mL/min 범위이다. APCI는 interface의 구조가 ESI와 거의 유사하나 이온화 방법 및 대상 화합물의 종류가 다르다. APCI에서는 고온상태에서 nebulizer gas를 사용하여 HPLC 용출액을 분사한다. 용출액 방울은 건조되면서 gas 상태로 corona discharge와 같은 고에너지 원을 통과하게 되는데 여기서 용매분자들이 이온화되어 chemical ionization의 reagent gas와 같은 역할을 수행하게 된다. Positive-ion mode에서는 protonated solvent ion, negative-ion mode에서는 O_2^-나 그 수화물 등이 이러한 이온화제 역할을 수행하며 분석 성분을 이온화시켜 질량분석기로 도입되게 한다. APCI는 ESI와는 달리 비극성 성분에 적합하며 이동상의 유속은 0.5~2.0 mL/min 범위로 보통의 HPLC 유속을 그대로 사용할 수 있는 장점이 있다. 보통의 경우 분자이온은 positive ion-mode에서 $(M+H)^+$, negative ion-mode에서 $(M-H)^-$의 형태로 나타나나 이동상에 ammonium과 같은 modifier를 사용할 경우 adduct ion이 생성되는 경우도 있다.

ESI와 APCI는 GC-MS의 EI와는 달리 soft ionization 방법이다. 따라서 mass spectrum에서 분자이온 $(M+H)^+$나 $(M-H)^-$의 abundance가 높고 그 외 fragment ion은 그다지 많이 관찰되지 않는다.

2) 질량분석기 (mass analyzer)

LC-MS에서의 질량분석기는 GC-MS와 마찬가지로 quadrupole과 ion-trap analyzer가 가장 보편적이다. LC-MS에서는 분자이온 $(M+H)^+$나 $(M-H)^-$의 높은 abundance를 이용, SIM mode에서 잔류분석을 수행하기는 용이하나 fragment ion의 종류나 abundance가 적기 때문에 구조적 정성이 다소 미흡할 수 있다. 이를 위하여 single quadrupole과 더불어 triple quadrupole (보통 MS-MS 또는 tandem MS라고도 불린다.)의 사용도 빈번하다.

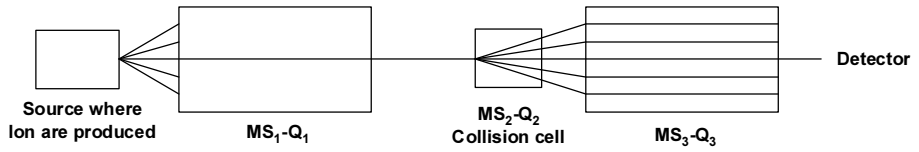


그림 14. Triple quadrupole mass spectrometer의 기본 구조

즉, 3개의 quadrupole set로 구성되어 있다, 두 번째 set는 분리기로서의 역할을 수행하는 것이 아니다 첫 번째 set로부터 분리한 ion을 focussing하여 세 번째 quadrupole set로 전달하는 역할을 담당한다. 첫 번째 quadrupole analyzer에서 주로 분리되는 분자이온 $(M+H)^+$나 $(M-H)^-$를 세 번째 quadrupole set로 다시 분리하면 EI spectrum과 유사한 결과를 얻어 보다 상세한 구조적 정보를 얻을 수 있다. 또한 selected-decomposition (reaction) monitoring (SDM 또는 SRM) mode를 사용하면 single quadrupole의 SIM 보다 더욱 선택적인 잔류분석을 수행할 수 있는 장점이 있다. 즉 첫 번째 set로부터의 분자이온을 precursor ion으로 지정하고, 세 번째 set에서 얻은 abundance가 높은 fragment ion을 product ion으로 설정하면 두 이온과 일치되는 분석성분만이 선택적으로 검출되므로 간섭이 거의 없는 분석결과를 얻을 수 있다. 질량분석기를 통과한 이온들은 GC-MS와 마찬가지로 보통 electron multiplier에 의하여 검출된다.

3) LC-MS를 이용한 기기분석 과정

LC-MS를 이용하여 잔류농약 분석을 수행하는 과정은 GC-MS와 유사하다. 먼저 화합물의 특성을 고려하여 ESI(+), ESI(-), APCI(+), APCI(-) 중 예상되는 이온화 방식을 선정하고 HPLC로 예비실험을 수행하여 머무름 시간을 최적화한다. 분자 이온을 충분히 포함하는 m/z 범위로 MS 조건을 설정하고 대상화합물의 표준용액을 주입, total-ion chromatogram (TIC)을 얻는다. 분석화합물의 머무름 시간에 해당하는 peak로부터 mass spectrum을 추출한다. Mass spectrum으로부터 분자 이온이나 abundance가 높으면서 분석화합물의 구조를 잘 반영할 수 있는 fragment 이온을 선정한다. 이때 감도 저하를 최소화하기 위하여 선정 이온의 개수는 2개를 초과하지 않는다. MS 조건을 selected ion monitoring (SIM) mode로 변경한 후 검체를 분석한다. Triple quadrupole형 LC-MS에서는 SIM을 사용할 수도 있고 보다 선택적인 SDM mode도 사용할 수 있다.

6. 정성 및 정량 분석

대부분의 화학분석에서는 정성과 정량 분석을 동시에 수행하여야 비로소 하나의 분석결과로서 의미를 갖게 된다. 정성분석만으로도 화합물의 존재 유무를 판별할 수는 있으나 정량분석은 반드시 정성분석을 수반하여야 가능하다. 정성분석 (qualitative analysis)이란 미지 혹은 의심이 되는 물질을 동정 또는 확인하는 과정이고 정량 분석 (quantitative analysis)은 정성 분석을 통하여 확인된 물질의 양을 결정하는 과정이다. 잔류농약 분석은 수많은 미지의 간섭물질이 상존하는 검체 중에서 극미량으로 존재하는 잔류농약 성분을 정성/정량하는 과정이므로 정성적으로 오인의 확률이 제한된 수의 불순물만이 존재하는 다른 화학분석에 비하여 높은 편이다. 또한 매우 낮은 농도에서 정량이 수행되므로 충분한 주의가 기울여지지 않을 경우 큰 분석 오차가 발생할 수 있다.

6.1 정성 분석 (qualitative analysis)

정성분석은 화합물 고유의 물리화학적 특성을 비교하거나 구조 해석을 통하여 동질성을 확인하는 분석과정이다. 잔류농약 분석에서 주로 이용하는 GC나 HPLC를 중심으로 정성적 확인법을 살펴보면 크로마토그래피적 방법과 비(非) 크로마토그래피적 방법으로 구분할 수 있다.

1) 크로마토그래피적 정성법

고정상과 이동상으로 이루어진 일정한 크로마토그래피 조건에서 화합물의 이동속도는 물리적 특성을 직접적으로 반영하므로 머무름 시간은 중요한 정성적 지표이다. 머무름 시간 (retention time, t_R)은 검체 주입시점부터 용출되는 화합물의 최대 농도가 관찰되는 시점인 peak의 꼭지점 (maxima)에 도달하는데 소요되는 시간으로 정의되는데 가장 손쉽게 보편적으로 사용하는 정성적 수단이다. 즉, 표준화합물을 동일한 조건에서 주입하였을 때 관찰된 머무름 시간과 미지 peak의 머무름 시간이 일치하였다면 동일한 물리적 특성을 나타내었으므로 같은 화합물이라고 정성하는 것이다. 이러한 겉보기 머무름 시간에는 실제 분리과정이 일어나지 않으면서도 소요되는 시간, 다시 말하면 이동상이 분리관 선단

에서 출구까지 이동하는데 소요되는 시간인 불감시간 (dead time, t_o)이 포함되어 있으므로 이를 뺀 순 머무름 시간 (corrected 또는 adjusted retention time, $t_R - t_o$)을 사용하면 보다 정확한 정성을 할 수 있다. HPLC에서는 머무름 특성지표로 용량계수 (capacity factor)를 사용하는 경우가 많다. 용량계수 $k' = (t_R - t_o)/t_o$는 순 머무름 시간을 불감시간의 배수로 표시하는데 크로마토그래피 조건의 미세한 변화를 일부 보정할 수 있어 보다 정확한 정성 지표이다. 불감시간은 GC나 HPLC에서 머무름 특성이 거의 없는 gas (methane 등)나 thiourea 등의 화합물을 주입하여 측정한다.

머무름 특성을 이용한 정성법 중에서 가장 정확한 방법은 상대적 머무름 시간 (relative retention time, α)을 지표로 이용하는 것이다. 기준 화합물을 설정하고 각 대상 화합물의 머무름 시간을 기준 화합물에 대하여 상대적으로 표시하면 주어진 크로마토그래피 조건에서 아주 일정한 머무름 지표가 된다. 기기 동작 중 크로마토그래피 상태는 아무리 동일한 조건으로 설정하였다 하더라도 미세하게 변화될 수 있으므로 머무름 시간상에 다소의 오차가 발생할 수 있다. 이 경우 기준 화합물의 머무름 시간 또한 연동하여 변화하게 되므로 상대적 비율은 일정한 값을 갖는다. 특히 모니터링을 위한 다성분 분석법의 경우 화합물 peak의 오인을 피하기 위하여 이러한 상대적 머무름 시간에 의한 정성법은 필수적이라 할 수 있다. 상대적 머무름 시간과 용량계수와의 관계는 다음과 같다.

상대적 머무름 시간 (α) = $(t_{R2} - t_o)/(t_{R1} - t_o) = k_2'/k_1'$
(t_{R1} : 기준 화합물의 머무름 시간, k_1' : 기준 화합물의 용량계수)

그 외 과거에 사용되었던 동족체 (homolog series) 머무름 시간의 log-plotting에 의한 근사적 미지화합물 확인법 등은 불확실성 때문에 현재에는 사용되지 않는다.

2) 비(非) 크로마토그래피적 정성법

비(非) 크로마토그래피적 정성법은 크로마토그래피에서의 머무름 특성이 아니라 용출 성분의 다른 물리화학적 특성을 비교하여 정성하는 방법이다. 가장 간단하게 용출성분의 검출기에 대한 상대적 반응성은 보조적 정성 지표로 사용

될 수 있다. GC나 HPLC에서 검출기를 변경하였을 때 표준화합물과 같은 머무름 시간을 나타내면서 검출기에 대한 반응정도도 동일한 비율로 변화하였다면 보다 정확한 정성 분석이 된다. 예를 들어 분자 내에 인과 nitro group을 동시에 가지고 있는 parathion의 GC를 이용한 잔류분석의 경우, 1 개 칼럼에 ECD와 NPD를 dual detector로 연결하여 사용하였을 때 표준화합물과 동일한 머무름 시간을 나타내는 peak가 동시에 동일한 비율의 검출기 반응성을 나타낸다면 거의 parathion이라고 확신할 수 있을 것이다.

특별한 추가의 기기를 이용하지 않고 유용하게 정성할 수 있는 방법 중의 하나는 유도체 형성법 (derivative formation)법이다. Chromatogram 상에서 표준화합물과 동일한 머무름 시간을 갖는 peak가 분석성분과 동일하다면 동일한 화학반응도 일어나게 될 것이다. 따라서 검체 용액에 대상 화합물의 작용기에 대하여 이미 알려져 있는 유도체 형성반응을 시키고 크로마토그래피에 재주입한다. 만일 대상 화합물이 맞는다면 유도체로 변환되었으므로 다른 머무름 특성을 갖는 peak로 나타나게 된다. 또한 앞서 정성한 peak는 감소 또는 소멸되었을 것이다. 유도체 형성법은 보다 적극적 정성 수단으로 의심되는 peak의 재확인 과정에 매우 효과적인 방법이다.

6.2 정량 분석 (quantitative analysis)

정성분석에 의하여 동정이나 확인된 성분은 검체 중 함유된 양을 결정하기 위하여 정량하여야 한다. 일반적으로 이용되는 GLC나 HPLC법에서 정량분석의 첫 번째 단계는 peak 면적의 측정이다. 즉, GLC나 HPLC의 검출기는 미분형 검출기이므로 검출기의 반응 (response)이 용출되는 성분의 농도 (concentration)나 질량용출속도 (mass flow rate)에 비례한다. 따라서 chromatogram 상 peak의 면적이 용출된 화합물의 총량과 비례한다.

Peak 면적을 계산하는 방법은 최근에는 디지털화된 전자면적계산계 (integrator)를 거의 예외 없이 사용하고 있다. Baseline 상에서 분리되는 peak의 면적 계산에는 이러한 방법이 가장 정확하다. 그러나 겹치는 peak나 rider peak 면적의 계산 시에는 내장된 기본 인식 기능만을 사용할 경우 인식 오류에 따른

커다란 오차가 발생할 수 있다. 각 전자면적계산계에는 이러한 오류를 최소화하는 교정 계산 기능이 내장되어 있으므로 이를 숙지하고 정확히 지정, 사용하여야 한다. 또한 짧은 머무름 시간을 나타내는 sharp한 peak에 대해서는 peak 높이로 근사하는 방법이 여전히 유효하므로 수동 계산이 필요한 경우 활용이 가능하다.

Peak 면적이 구해지면 표준화합물의 peak 면적에 대한 대응 단위량에 표정(검량)하여 정량하게 된다. 즉, peak 면적 ∝ 표준화합물량 = k·표준화합물량의 비례계수 k를 구하는 표정화 과정을 거쳐 검체 중 대상 화합물량을 정량하게 된다. 표정에는 외부표준법과 내부표준법이 가장 많이 사용된다.

1) 외부표준법 (external standardization)

외부표준법은 절대검량선법 (absolute calibration)이라고도 불리는데 잔류농약 분석에서 가장 보편적으로 사용되는 방법이다.

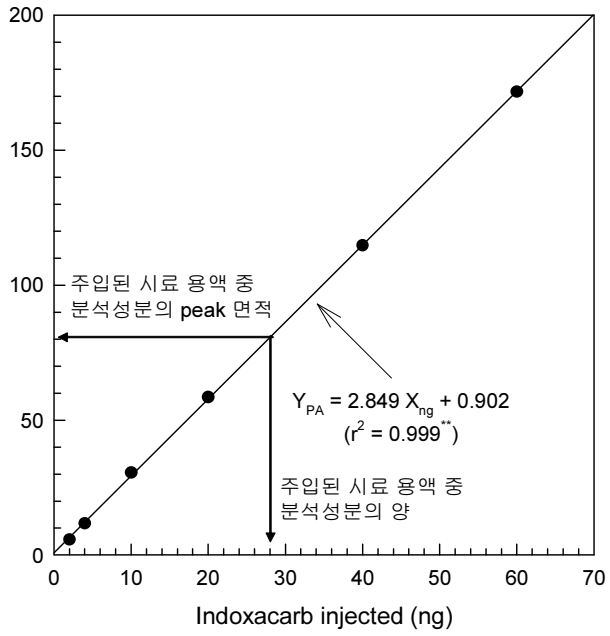


그림 15. 살충제 indoxacarb의 HPLC/UVD 분석시 검량선

이미 알고 있는 농도 (양)의 표준물질을 주입하여 나타난 peak 면적과 표준물질의 양에 대한 검량식 (calibration curve)을 산출하고 검량식에 따라 정량을 수행하는 방법이다. 검량선 작성의 예는 그림 15에 나타내었다. 즉, 분석 대상 성분인 살충제 indoxacarb의 표준용액을 농도별로 조제하고 각 일정량을 동일한 HPLC 조건하에서 주입, 주입량 대비 peak 면적에 대한 회귀식을 구한다. 검량선 작성 시와 동일한 기기 분석조건에서 주입된 검체 용액 중 분석성분의 양을 검량식에 대입하여 산출한다.

이러한 외부표준법은 표준검량선 작성 시와 검체 분석 시의 기기조건이 완전히 동일하였을 때 적용이 가능하다. 대부분 잔류분석에서는 이러한 조건이 만족하도록 기기를 조작하여야 한다. 즉, 주기적으로 검량선을 작성하여 검체 분석조건의 동질성을 확인하여야 한다.

2) 내부표준법 (internal standardization)

내부표준법은 실제 검체용액 중에 포함되어 있지 않은 별도의 표준물질 (내부표준물질, internal standard)을 검체용액 중에 첨가, 미리 작성된 정량표준물질/내부표준물질간 검량선에 의하여 정량하는 방법이다. 기기 가동 중 검체주입량이나 검출기 감도 변화 등에 거의 영향을 받지 않으므로 가장 정확한 정량법이다.

내부표준법에 의한 검량선 작성의 예는 그림 16에 나타내었다. 분석 대상성분은 농도별로, 내부표준물질은 일정량이 함유되도록 일련의 표준혼합용액을 조제하고 각 일정량을 동일한 기기 조건하에서 주입하여 분석성분 peak의 면적과 내부표준물질 peak의 면적을 얻는다. 분석성분/내부표준물질 주입량비를 x축, 분석성분 peak 면적/내부표준물질 peak 면적비를 y축으로 하여 회귀식을 구한다. 검체 용액에 표준혼합용액과 동일한 양의 내부표준물질이 함유되도록 검체용액을 조제하고 검량선 작성 시와 동일한 기기 분석조건에서 주입하여 분석성분/내부표준물질 면적비를 측정한다. 검량선에 의하여 검체 용액 중 분석성분/내부표준물질의 양을 계산하고 이미 알고 있는 내부표준물질 양을 곱하여 분석성분의 양을 산출한다.

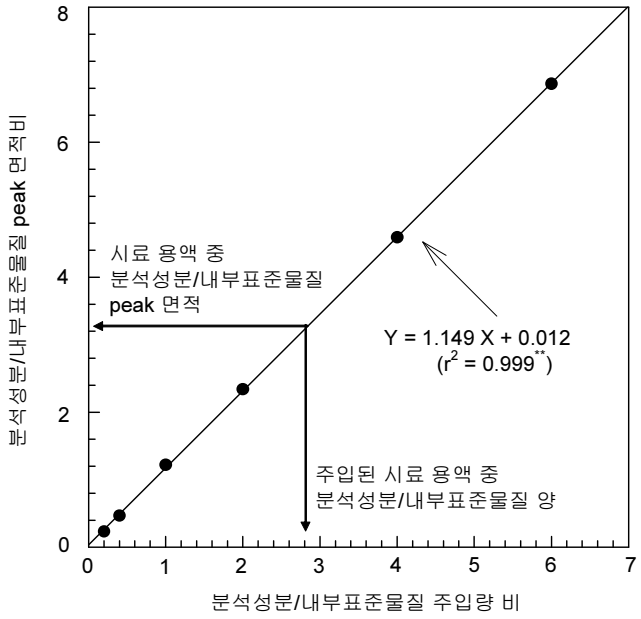


그림 16. 내부표준법 검량선의 예

내부표준법에서 사용되는 내부표준물질은 검체용액 중 다른 peak와의 분리, 정량하고자 하는 성분 부근에 용출되는 특성, 구조적 유사성, 검출기에 대한 반응 유사성 등의 요구조건이 있어 그 선정이 쉽지 않다. 또한 잔류분석 시에는 대개 많은 수의 간섭 peak가 관찰되므로 분석성분에 인접한 머무름 시간에 내부표준물질 peak가 삽입될 수 있는 경우가 흔하지 않다. 그럼에도 불구하고 내부표준법을 적용할 수 있다면 가장 정확한 정량이 가능하다.

6.3 잔류분의 재확인 (confirmation)

앞서 언급한 바와 같이 잔류농약 분석은 수많은 미지의 간섭물질이 상존하는 검체 중에서 극미량으로 존재하는 잔류농약 성분을 정성/정량하는 과정이므로 정성적 오인의 확률이 다른 화학분석에 비하여 매우 높은 편이다. 따라서 잔류농약 분석 특히 모니터링과 같이 미지의 검체 중 다성분을 화합물 군별의 정제과정으로 분석할 경우에는 대상성분으로 인식된 peak에 대하여 추가적 정성을

요구하고 있다. 주요 재확인 방법을 열거하면 다음과 같다.

잔류농약 분석에서의 재확인 방법
– GLC 및 HPLC에서 특성이 상이한 추가 분리관의 이용
– p-Value
– TLC
– GLC와 HPLC의 교호 이용
– 화학적 유도체 형성
– GC-MS 및 LC-MS

이러한 재확인의 기본 원칙은 이미 분석의 원리로 사용한 것과는 다른 물리적 특성을 이용, 정성하여야 한다는 것이다. 가장 간단한 재확인법은 GLC나 HPLC에서 특성이 상이한 추가의 분리관을 사용, 기 인식된 peak를 재확인하는 방법이다. 예를 들면 GLC에서 methypolysiloxane 계통의 분리관을 이용하여 분석하였다면, 추가로 cyanopropylphenylpolysiloxane이나 phenylpolysiloxane 등이 주로 함유된 분리관을 사용한다. 대상성분의 상대적 머무름 특성이 상이할수록, 다성분의 경우 성분들의 용출 순서가 상이할수록 재확인의 신뢰성은 향상된다. HPLC에서 일상적인 C_{18} 칼럼을 사용하였다면 embedded polar group ligand가 삽입된 C_{18} 칼럼을 추가로 사용한다.

p-Value 법은 표준 화합물 용액과 검체 용액을 동일한 조건에서 분배한 후 재분석하여 분배계수를 비교하는 방법이다. 표준화합물과 동일한 물질이라면 동일한 분배비율 만큼 peak 넓이가 줄어든다는 점에 착안한 것인데 간단한 방법이나 신뢰성은 다소 떨어진다. TLC는 보통 분리의 원리가 흡착이므로 GC와 HPLC의 일반적 분리 원리와는 상이하여 재확인법으로 적용이 가능하나 검출감도가 낮은 단점이 있어 일부 경우에만 사용된다.

GLC와 HPLC의 교호 이용은 GLC나 HPLC로 분석한 검체 용액을 재차 HPLC나 GLC로 기기를 바꾸어 재분석하는 방법으로 분리 및 검출기의 원리가 상이하여 바람직한 방법이나 검체의 정제조건이 유사하여야 하는 제한성이 있다. 화학적 유도체 형성은 적극적 재확인 방법이며 동일 기기를 사용한다는 편리함은 있으나 대상 화합물에 유도체 형성이 가능한 작용기가 존재해야 하는 단점이 있다.

가장 정성적이며 추가적 검체 조제 없이 수행할 수 있는 재확인법은 GLC에는 GC-MS, HPLC에는 LC-MS를 이용하는 방법이다. 고가의 장비를 사용해야 하는 단점을 제외하고는 실용적으로 가장 편리하고 신뢰성이 확보되는 방법이다.

재확인 과정에서 추가적 방법에 의하여 정성을 수행한 후 정량하였을 때 1차적 정량치와 상이한 결과가 나타날 수 있다. 두 분석치 중 높은 정량치는 하나의 peak에 2가지 이상의 성분들이 혼재하였다는 것을 의미하며 잔류농약 분석과 같은 미량분석에서는 드문 일이 아니다. 이 경우에는 낮은 정량 결과가 신뢰성이 있으므로 최종 분석결과로는 최소 정량치를 선택한다.

7. 분석법의 검증

잔류농약 분석은 수많은 미지의 간섭물질이 공존하는 검체 중에서 극미량으로 존재하는 잔류농약 성분을 정성/정량하는 과정이므로 정성적으로는 오인의 가능성이 있고 정량적으로는 큰 분석 오차가 발생할 여지가 상존한다. 또한 분석대상 화합물 대부분이 독성 화합물이므로 분석결과에 법적, 행정적 책임이 수반되는 경우도 많다. 따라서 검체분석에 적용하는 잔류농약 분석법은 그 분석법의 한계 및 효율에 대한 철저한 검증 (method validation)을 요구받는다. 아울러 분석법은 추출, 정제, 기기분석 및 재확인 등 복잡한 과정을 거쳐 수행되기 때문에 시약 및 사용기구, 실험실 환경, 분석자의 자질 및 숙련도에 따라 분석결과가 심각한 영향을 받을 수 있다. 이러한 측면에서 공공목적의 분석결과를 위해서는 분석조건을 충족시킬 수 있는 자격에 대한 평가 (quality assurance study) 결과를 검체 분석에 앞서 선결적으로 요구하기도 한다.

7.1 분석법의 검출 및 정량한계

분석법의 검출 및 정량한계 설정은 우선적으로 분석기기의 감도에 의하여 좌우된다. 분석기기의 검출한계 (limit of detection, LOD)는 short-term noise의 2~3배의 신호 (signal)를 발생시키는 화합물의 양으로 결정되는데 국제적으로 통용되는 S/N 비는 일반적으로 3이다. 검출한계에서는 검출 또는 불검출만을 판정할 뿐이며 분석결과를 수치화할 수 없다. 왜냐하면 기기 조건의 변화에 따라 매우 큰 오차가 발생하므로 수치화할 경우 분석결과 해석의 오류 가능성을 피할 수 없기 때문이다. 정량한계 (limit of quantitation, LOQ)는 분석결과를 수치화할 수 있는 최저한계를 의미하는데 국가 및 기관에 따라 보통 S/N 6~10 범위의 화합물의 양이며 일반적으로 10을 적용하는 것이 보편적이다.

분석기기의 검출 및 정량한계가 결정되었다고 해서 분석법의 검출 및 정량한계를 검체량/검체용액의 비에 근거하여 단순히 산출되는 것은 아니다. 잔류농약 분석 시에는 검체 중 미지의 간섭물질이 상존하기 때문에 체계적인 정제과정을 거쳤다하더라도 간섭물질이 완전히 제거되었다고 확신할 수 없다. 따라서 분석법의 검출 및 정량한계는 검체 용액 중 간섭의 정도에 따라 영향을 받는다.

간섭이 전혀 관찰되지 않았다면 분석기기의 검출 및 정량한계로부터 분석법의 검출 및 정량한계를 단순 산출할 수 있으나 간섭이 존재하면 간섭을 충분히 상쇄할 수 있도록 검출 및 정량한계를 높이거나 새로운 분석법을 확립하여야 한다. 국제적으로 정량한계에서 간섭 정도가 30%를 초과하여서는 분석법의 정량한계가 인정되지 않는다.

국내에서의 잔류농약 분석법 기준에서는 분석기기의 검출한계를 GLC나 HPLC의 경우 S/N≥3, 분광광도법의 경우 S/N≥2인 화합물의 양으로 규정하고 있다. 또한 분석법의 검출한계는 식품의 경우 0.05 mg/kg 이하를 만족하면서 동시에 잔류허용기준의 1/2~1/10까지 검출하도록 규정하고 있다. 토양의 경우는 농약을 표준량으로 살포하였을 때 예상되는 환경 중 농도 (predicted environmental concentration, PEC)의 최소한 1/50까지 검출하도록 요구하고 있다. 정량한계에 대해서는 아직 구체적으로 명문화된 규정은 없으나 대체적으로 국제기준을 수용하고 있다. 유럽연합에서 규정하고 있는 분석법의 정량한계는 표 12에 나타낸 바와 같이 보다 구체적이다.

표 12. 식품에 대한 잔류농약분석법의 정량한계 기준

잔류허용기준 (mg/kg)	분석법의 정량한계 (mg/kg)
0.1 초과	0.1 이하
0.1	0.05 이하
0.05	0.02 이하
0.05 미만	잔류허용기준의 1/2 이하

** Guidance Document on Residue Analytical Methods, European Commission SANCO/825/00 rev.7-2004*

분석기기의 검출 (S/N=3) 및 정량한계 (S/N=10)를 측정하고 검체 용액 중의 간섭이 없다면 분석법의 검출 및 정량한계는 다음 식에 의하여 계산된다.

분석법의 검출 및 정량한계 = (A/B) × (C/D) (mg/kg 또는 mg/L)
A : 분석기기의 검출 및 정량한계 (ng), B : 검체 주입량 (μL),
C : 최종검체 용액의 부피 (mL), D : 분석검체량 (g)

예를 들어 어떤 농약성분의 GLC/ECD 상 정량한계가 0.1 ng이고 이때 2 μL를 주입하였다고 가정한다. 또한 25 g의 식품검체를 추출, 정제하여 최종적으로 10 mL로 조제하였다면 정량한계는 0.1 ng/2 μL × 10 mL/25 g = 0.02 mg/kg으로 산출된다. 분광광도법의 경우는 (A/B) 대신 검출 및 정량한계에 해당하는 농도를 대입하면 된다.

7.2 회수율 및 분석오차

잔류농약 분석법은 감도뿐만 아니라 분석의 정확성 및 재현성에 대해서도 검증이 요구된다. 분석의 정확성 (accuracy) 및 재현성 (repeatability 또는 reproducibility)은 일반적으로 회수율 (recovery) 시험으로 검증한다. 회수율 시험이란 대상 농약 성분이 검출되지 않는 식품 및 환경검체에 일정량의 대상성분을 처리하고 검증하고자 하는 분석법을 수행하여 처리량 대비 분석결과를 비교하여 분석법의 정확성을 평가하는 절차이다. 아울러 처리 수준별 반복된 분석결과를 통하여 분석법의 재현성 즉 분석오차를 산출, 검증한다.

여기서 유념하여야 할 사항은 회수율 시험은 분석의 전 과정에 대하여 정확성을 입증하는 과정이지만 검체의 추출 효율 전체를 반영하지는 못한다는 점이다. 일반적으로 회수율 시험에서 검체는 대상성분 처리 후 수시간~수일 내에 분석과정에 공시되는데, 회수율 검체 중 대상성분의 침투 및 존재 상태가 포장검체 중 실제 잔류분 (aged residue)의 존재형태와 다를 수 있다. 그러므로 회수율 시험에서 추출효율이 충족되었다고 해서 포장검체 중 실제 잔류분도 동일한 정도로 회수된다고 담보할 수는 없다. 이를 위해서는 방사성 동위원소로 표지된 대상화합물을 이용한 추적자 실험 (tracer study)이 필수적이나 경비 및 표지 화합물 입수 등의 어려움으로 분석법 검증 때마다 적용하기는 힘들다. 따라서 새로운 분석법 확립하거나 기존 분석법을 개선하고자 할 때, 추출법만은 화합물 특성별로 이미 그 효율이 추적자 실험 등을 통하여 입증된 추출법의 범주를 벗어나지 않아야 한다. 각 농약 특성별 주요 추출법은 이 절의 검체 추출편을 참고하기 바란다.

국내에서의 회수율 시험 기준은 분석 성분의 처리 수준을 검출한계의 5~10

및 50~100배 농도의 2수준에서 각각 3반복으로 수행할 것을 요구하고 있다 (농촌진흥청, 농약 잔류성 시험기준 및 방법). 즉, 분석법의 검출한계가 0.05 mg/kg 이라면 낮은 수준은 0.25~0.5 mg/kg, 높은 수준은 2.5~5.0 mg/kg 수준이 되도록 검체에 분석 성분의 표준용액을 각각 3반복 처리하고 회수율 시험을 수행할 것을 요구한다. 또한 이때 무처리 검체를 대조구로 분석하여야 한다.

표 13. 잔류분석법 검증을 위한 회수율 시험 규정

Data set	국제식품규격위원회 (CAC)		OECD/EC	
	처리 수준	반복수	처리 수준	반복수
Full	무처리	5	무처리	2
	LOQ	5	LOQ	5
	LOQ의 5~8배	4	LOQ의 10배 또는 MRL	5
	LOQ의 90~100배	4	-	
Reduced	무처리	1	무처리	1
	LOQ	3	LOQ	3
	LOQ의 10~12배	3	LOQ의 10배 또는 MRL	3
	LOQ의 90~100배	3	-	

* CAC (Codex Alimentarius Commission), LOQ (limit of quantitation, 정량한계), MRL (maximum residue limit, 잔류허용기준)

국제 기준은 이보다 엄격하여 분석법의 적용성에 따라 회수율 시험 규모를 구분, 적용한다. 표 13에 나타낸 바와 같이 분석법을 새로이 개발/확립하였거나 기존 분석법을 크게 변경하고자 할 때에는 정식 회수율 시험 전체 (full data set)를 요구한다. 기존 사용 분석법을 그대로 사용하거나 유사 검체 군에 적용하고자 할 때에는 축소 회수율 시험 (reduced data set)을 요구하고 있다.

측정된 회수율의 범위와 분석오차 결과에 근거하여 분석법의 정확성 및 재현성을 평가한다. 잔류농약 분석법으로 검증되기 위해서는 일정한 범위의 회수율과 분석오차를 만족하여야 한다. 국내의 경우 허용되는 회수율 범위는 70~120% 이며 분석오차 즉, 반복 회수율 수치 간 변이계수 (coefficient of variance, CV) 또는 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD)는 20% 이하이다. 국제 기

준은 표 14에 나타낸 바와 같이 분석성분의 처리수준에 따라 허용범위가 상이하게 설정되어 있다.

표 14. 잔류분석법 검증을 위한 회수율 및 분석오차 허용범위

처리 수준 (mg/kg)	회수율 허용 범위 (%)	분석오차 최대 허용치 (%)
≤0.001	50~120	35
〉0.001~≤0.01	60~120	30
〉0.01~≤0.1	70~120	20
〉0.1~≤1.0	70~110	15
〉1	70~110	10

** Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003*

잔류농약 분석은 여러 단계의 과정으로 구성되어 있는 복잡한 화학분석이며 각 단계 마다 세심한 주의가 기울여 지지 않으면 신뢰성 있는 분석 결과를 얻기 힘들다. 대부분의 분석 과정 중 대상성분은 전혀 보이지 않으며 분석자는 수행하고 있는 작업이 제대로 수행되고 있는지를 판단하기도 힘들다. 또한 검증된 분석법이라도 실험실 조건, 환경 변화, 분석자의 자질에 따라 분석 결과에 심각한 오차 및 오류가 발생될 수 있다. 따라서 각 분석 단계마다 과정, 사용 재료 및 기구, 그리고 기기의 원리를 충분히 이해하고 제한된 허용 범위를 인식하여 치밀하게 분석 작업을 진행하는 자세가 요구된다.

8. 식품공전 분석법 해설

8.1 식품공전 잔류농약분석법의 범례 및 기준

제 8장에서 기술하는 분석법은 다음과 같은 범례 및 기준을 따를 경우 별도로 명시하지 않는다. 범례에 속하지 않는 특기 사항은 별도로 분석과정에 상세히 기술한다.

1) 분석용 검체

- **분석용 검체형태** : 분석과정에 공시되는 검체는 채취 후 식품공전의 "분석용 검체 전처리 기준" 에 따라 조제된 검체를 의미한다. 즉 세절 또는 분쇄한 형태로서 분석과정에 따라 규정된 양의 무게를 추출용기에 달아 넣음으로써 분석과정이 개시되는 최종 분석용 검체로 정의한다.

- **검체 구분** : 검체는 유지함량 (기준함량 2%)에 따라 유지 및 비유지 검체로 구분한다. 또한 수분함량 (기준함량 75%)에 따라 함수 및 건조 검체로 구분한다. 과실 및 채소와 같은 비유지 함수 (含水) 검체는 칭량 (秤量) 후 직접 추출과정을 수행한다. 건조 검체는 규정된 검체 량을 칭량한 후 습윤화 과정을 거쳐 추출과정을 수행한다. 습윤화 과정은 대표적 검체인 현미 및 콩을 기준으로 하였을 때 검체 20 g 당 각각 20 mL 및 40 mL의 물을 가한 후 가볍게 혼합하고 30분간 방치하여 수행한다. 다른 건조 식품검체의 경우 위의 범위 내에서 검체별 유사성을 감안, 첨가하는 물량을 조절하여 습윤화하는 것으로 규정한다.

2) 검체 추출

- **추출 용기** : 추출용기는 유리제 또는 stainless steel제 (SUS 316 기준) 밀폐용기를 사용한다. 밀폐용 마개나 gasket은 반드시 PTFE (Teflon™)나 최소한 silicon rubber와 같은 무용출 비활성 재질을 사용하는 것으로 한다. 반응성이 없는 추출용매를 사용할 경우 Al-foil을 liner로 사용할 수 있다.

- **추출 방법** : 진탕법은 왕복 (reciprocal) 또는 회전 (gyrotatory) 형태의 진탕기에서 200 rpm으로 추출하는 것을 기준으로 하되 추출시간을 명시한다. 마쇄 추출법은 blender (3,600 rpm 이상)나 homogenizer (top-drive 형, 10,000 rpm 이상)에서 2분간 추출하는 것을 원칙으로 한다. 그 외 추출방법은 별도로 명시한다.

- **여과 과정** : 여과는 여지를 사용한 흡인여과법을 우선적으로 사용한다. 추출물의 보다 미세한 여과를 위하여 여지는 pore size가 일상적인 10~20 μm보다는 2~5 μm인 것을 사용한다. 미세 분말이 많거나 유지 함량이 높아 여과하기 곤란한 검체의 경우에는 Hyflo Super Cel이나 Celite 545와 같은 여과보조제 (filter-aid)를 여지 위에 0.5~1 cm 정도를 깔아 사용한다. 그러나 여과보조제에서 일부의 간섭물질이 용출될 수 있으므로 실용적 여과속도가 확보되는 한 가급적 여과보조제를 사용하지 않는 것을 원칙으로 한다. Alkali 조건의 추출용매를 사용하여 여지가 손상되거나 간섭물질이 용출될 염려가 있을 경우에는 유리섬유필터 (glass-fiber filter)를 사용하며 이 경우 별도로 명시한다.

- **추출물의 세척** : 추출과정을 1회만 수행할 경우에는 추출용기 및 여지 내 검체 잔류물을 추출용매와 동일한 용매로 세척하여 앞서의 여액과 합한다. 이때 세척용매의 양은 추출용매 100 mL 당 30~40 mL로 설정하며 50 mL를 초과하지 않는다. 추출과정을 2회 이상 수행할 경우에는 이러한 세척과정은 수행하지 않고 1회 이후의 추출과정이 세척을 함께 수행하는 것으로 한다.

- **농축 과정** : 추출액의 농축은 일반적인 감압회전증발기 (rotary vacuum evaporator)를 사용하여 수류 감압조건에서 농축하는 것을 전제로 하며 온도를 명기한다. 수분이 함유된 유기용매 추출액을 감압 농축할 경우 진공도를 조절하여 돌비 (bumping) 현상이 일어나지 않게 하는 조건을 유지한다. 또한 유기용매만을 증발시킴으로써 일부의 수용액이 잔존하게 되는 농축 조건을 의미하며 완전 건고시킬 경우에는 이를 명시한다. 그 외 상압에서 사용하는 질소기류 농축이나 Kuderna-Danish 농축기 사용 등의 다른 방법을 사용할 경우에는 이를 별도로 기술한다. 질소기류 농축은 Turbo-Vap™과 같은 특수한 가속 장치를 사용하지 않는 일반적인 질소기류 분사에 의한 농축을 말한다.

3) 액-액 분배

- **분액여두** : 분액여두는 유리제로 PTFE-stopcock가 부착된 squibb 형을 원칙으로 하며 grease를 사용하는 유리제 stopcock는 채용하지 않는다. 분배액의 총량이 여두 용량의 50~80% 범위가 되도록 적절한 용량의 분액여두를 선택한다.

- **여액의 이송 및 진탕** : 여액을 분액여두로 옮긴 후 여액 용기를 소량의 추출용매 (약 2~3 mL 범위)나 분배용매로 재차 씻어 추출액을 정량적으로 이송하는 것을 원칙으로 한다. 분배 추출과정은 혼합액을 100 stroke 이상 격렬하게 진탕하는 것을 의미하며 층 분리 등이 불량할 경우 보다 완만한 조건을 사용하되 진탕 횟수를 증가시켜 분배 효율이 동등하여야 한다. 진탕 후 충분한 시간 동안 (5분 이상) 정치, 완전한 층 분리를 확보하여야 한다.

- **분배 용매** : 포화식염수는 소정의 유리용기에 sodium chloride를 용해도 이상의 과량으로 달아 넣고 증류수를 가하여 격렬하게 진탕, 방치한 후 상징액(上澄液)을 취하여 사용한다. *n*-Hexane 포화 acetonitrile (하부) 및 acetonitrile 포화 *n*-hexane (상부)은 분액여두에 동량의 *n*-hexane과 acetonitrile을 가하고 2분 이상 격렬하게 진탕, 방치한 후 상하부의 층을 개별 분리하여 사용한다.

- **탈수 과정** : 분배액 중 소량으로 존재하는 수분을 제거하기 위하여 분배액을 중성의 건조제를 통과, 여과시키거나 분배액 중에 첨가한 후 일정시간 방치하고 여과한다. 건조제 사용량은 가장 많이 사용하는 anhydrous sodium sulfate의 경우, *n*-hexane 및 dichloromethane 100 mL 당 각각 10~20 g 및 20~30 g 범위이다. 사용한 건조제는 충분한 양의 분배용매로 재차 씻어 (건조제 20 g 당 5 mL 이상) 앞서의 분배액과 합하는 것을 전제로 한다. 건조제나 세척용매를 과다하게 사용할 경우 이 들 중에 함유된 불순물이 농축되어 상대적으로 간섭 정도가 커진다는 점을 인식, 적절한 양의 건조제와 세척용매를 사용한다.

- **농축 과정** : 검체 추출액의 농축과정과 동일하나 대개 증발 건고하는데, 건고란 감압 농축기상에서 유기용매가 완전 휘발한 즉시 (just to dryness) 증류플라스크를 탈착하는 것을 의미한다. 휘발성이 강한 분석 대상성분이 함유된

분배액을 감압 농축할 경우 완전 건고하지 않거나 keeper solution을 사용하는데 이 경우에는 별도로 기술한다.

- **농축 잔류물 (액)의 재용해** : 추출액을 건고한 경우 정해진 양의 용매를 플라스크 벽면을 따라 정확히 가하여 마개를 막고 재용해 한다. 초음파 세척기 상에서 진동 용해할 경우에는 별도로 명시한다. 잔류물을 별도의 용기에 전량 이송하고자 할 때에는 일정량의 용매를 일부로 나누어 2회 이상 재용해한 후 정량적으로 옮긴다. 완전 건고하지 않은 상태에서 추출용매보다 휘발성이 낮은 용매로 교체할 경우에는 2~5 mL 정도의 농축액에 10~20 mL의 교체하고자 하는 용매를 가한 후 다시 감압 농축한다.

4) Column chromatography (흡착)

- **분리의 원리** : 고전적인 크로마토그래피의 형태로 보통 유리관에 고정상을 충전하고 이동상을 상부로부터 흘려보내는 크로마토그래피 형태로서 특별히 명시하지 않을 경우 가장 많이 사용되는 흡착크로마토그래피를 지칭한다.

- **충전제** : 고정상용 흡착제로 사용하는 Florisil은 60~100 mesh로서 시약회사에서 미리 600~700℃로 활성화시켜 판매하는 잔류분석용을 사용한다. Silica gel은 column chromatography용으로서 판매되는 70~230 mesh 크기의 입자를 사용한다. 그 외의 흡착제를 사용할 경우에는 별도로 명시한다. Florisil과 silica gel은 사용 전에 약 130℃에서 5시간 이상 가열하여 활성화시킨 후 사용함을 전제로 하며 활성화 시키지 않거나 deactivation하여 사용할 경우에는 별도 기재한다. 제조사나 제조번호가 상이한 Florisil이나 silica gel 시약을 교체할 경우 표준 화합물의 용출 특성이나 lauric acid value 측정 등으로 흡착제의 사용량이나 용출용매의 용출 강도를 조절, 항상성을 유지하여야 한다.

- **Column 규격 및 충전제 량** : Florisil과 silica gel의 경우 사용하는 흡착제 량은 5, 10 및 20 g이 표준이며 이에 대응하는 column의 내경은 각각 11, 15 및 22 mm로 한다. 사용하는 column은 유리제이어야 하며 PTFE-stopcock이 장착된 것을 사용한다.

- **충전법** : 건식과 습식 충전법 중 건식 충전법을 우선적으로 사용하는 것을 원칙으로 한다. Column 충전은 다음과 같은 과정에 의하여 수행한다. 먼저 column 하부에 sintered glass가 장착된 column을 사용하거나 glass wool로 막은 후 정해진 양의 충전제를 가하고 가볍게 진동시켜 다진 다음 약 1 cm 높이로 anhydrous sodium sulfate를 추가로 충전, 사용한다.

- **Pre-washing** : 충전된 column은 검체용액 주입 전 *n*-hexane 등 비극성 용매를 흡착제 1 g 당 5 mL를 흘려보내어 pre-washing을 수행하는 것을 원칙으로 한다. Pre-washing 유무와 사용되는 용매는 명시한다.

- **용출 용매** : 용출 용매로 사용하는 용매 중 ethyl ether는 2%의 ethanol이 보존제로 함유되어 있는 것을 전제로 한다. Petroleum ether (30~70℃)는 대부분 *n*-hexane으로 대체가 가능하나 그 용출 양상을 검증한 후 사용한다. *n*-Hexane의 경우는 85% 이상의 *n*-hexane이 함유된 것을 사용한다. 사용하는 용매는 잔류분석용 또는 동등한 등급을 사용하며 특히 용출 강도에 영향을 미칠 수 있는 첨가제를 확인하여 사용한다.

- **용출 속도** : pre-washing을 포함한 용출 용매는 내경 11, 15 및 22 mm column에서 각각 2~5, 5~10 및 10~20 mL/min의 유속이 되도록 용출 속도를 조절한다. 너무 늦으면 확산, 너무 빠르면 물질 이송의 불충분으로 분리가 불량해지므로 유의한다.

- **용출액의 농축 및 재용해** : 액-액 분배과정에서의 농축 및 재용해 과정과 동일하게 수행한다.

5) Solid-phase extraction (SPE)

- **SPE cartridge** : 상용으로 판매하는 cartridge를 그대로 사용하며 충전제 종류 및 양 그리고 cartridge 용량 등의 규격을 명시한다. Bulk 포장 중 일부만을 사용한 후에는 나머지는 반드시 밀봉, desiccator에서 보관하도록 한다. 또한 정해진 분석과정에서는 제조번호가 동일한 제품을 사용하며 상이할 경우에는 용출 양상을 재차 검사하여 동질성을 확인한다.

- **활성화 및 용출 속도** : SPE cartridge는 활성화하여 사용하며 용매 및 양은 명시한다. 활성화 과정을 포함하여 충전제 500~1,000 mg의 경우 1~2 mL/min 범위를 유지한다.

- **용출액의 농축 및 재용해** : 액-액 분배과정에서의 농축 및 재용해 과정과 동일하게 수행하며 질소 기류 농축 시에는 이를 명시한다.

6) GLC 기기분석

- **Column** : 반드시 분석법에서 지정한 분리용 column을 사용한다. 호환 column을 사용하고자 할 때에는 liquid phase 종류 및 film 두께, column 내경 및 길이 등 column 규격 상 동질성을 확인한다. 참고로 J&W, Supelco 및 Restex 사의 DB-5, SPB-5 및 RTX-5는 서로 호환 가능한 liquid phase이다.

- **검체 주입** : packed inlet을 이용한 직접주입법, capillary inlet을 이용한 split 및 splitless 주입법을 정확히 구분하여 적용한다. 특히 내경 0.53 mm column의 경우 packed 및 capillary inlet 겸용이므로 이를 확인한다.

- **온도** : 분석법 상에서 허용하는 대상 화합물의 머무름 시간 범위는 최적 carrier gas 유속 조건에서 column 온도를 가감하여 조절한다. 참고로 isothermal의 경우 온도를 20℃ 상승시키면 머무름 시간은 약 1/2로 감소한다. 특별한 명시가 없을 경우 inlet 온도는 column 온도 + (20~50℃)로 하되, peak sharpness와 열분해를 고려하여 peak 대칭성이 우선적으로 확보되는 조건으로 설정한다. Detector온도는 inlet 온도 + (20~50℃) 범위로 300℃를 초과하지 않도록 조절한다.

- **Gas 및 유속** : 분석법에서 carrier gas는 helium 사용을 원칙으로 하며 가급적 질소는 사용하지 않는다. 그 외 argon/methane 등을 사용할 경우에는 별도로 기재한다. Carrier gas 유속은 column 내경별 최적 선속도 범위로 설정하여야 한다. Makeup gas는 분석법에서 특별한 명시가 없을 경우 각 기기별 추천 유속을 조사하여 사용한다.

- **Peak 면적 측정** : 대상성분의 peak 면적은 하드웨어/소프트웨어적 integrator를 사용하되 반드시 baseline correction mode를 확인한다. Rider peak나 fused peak의 경우 baseline correction을 변경 설정하여 peak 면적 계산의 오류를 최소화하는 것을 전제로 한다. 빠르게 용출되는 peak에 대해서는 peak 높이로 peak 면적을 대신 할 수 있으나 이때에는 반드시 동일한 감도조건에서 검량 및 분석이 수행되어야 한다.

7) HPLC 기기분석

- **Column dimension** : 분석법에서 특별히 명시하지 않을 경우 사용하는 column은 내경 3.9~4.6 mm, 길이 15~30 cm 범위를 사용한다. 이 때 이동상의 flow rate는 1.0 mL/min를 표준으로 하며 backpressure가 2,000 psi 이하인 조건에서 0.8~1.5 mL/min 범위로 가감, 대상 화합물의 머무름 시간을 분석법에서 허용하는 범위로 조절할 수 있다.

- **Column 충전제의 silica-base** : 분석법에서 특별히 명시하지 않을 경우 반드시 5 μm 이하의 spherical particle을 사용하며 10 μm, 부정형 입자는 사용하지 않는다. 가급적 천연 선별 silica 보다는 금속 불순물 함량이 낮은 합성 silica를 사용한다.

- **Bonded phase** : 분석법에서 bonded phase 종류는 명시하나 동일한 octadecylsilyl (C_{18}) 이라 하더라도 다음과 같은 특성 차이가 있으므로 분석법에 적합하도록 신중히 선정하여야 한다. 즉 C_{18} ligand내 hydrophilic-group embedding 여부와 silica-base의 endcapping 정도를 감안한다. Low endcapping의 경우 ionizable nitrogenous compound에 tailing 현상이 발생하며 high endcapping의 경우 이동상이 100% 수용액에 근접하였을 때 hydrophobic collapse 현상이 발생할 수 있다. 또한 hydrophilic-group embedding과 endcapping 정도에 따라 머무름 특성의 변화가 있으므로 대상 화합물 특성의 특성을 감안하여 최적 phase를 선정한다.

- **Column 온도** : 분석법에서 특별히 명시하지 않을 경우 40±5℃ 범위로 한다. 하계 실내온도의 영향으로 30℃는 실용적으로 유지하기 어려우며 50℃의 경

우 열분해 및 해리의 가능성이 있으므로 사용을 피한다.

- **Degassing** : 이동상은 반드시 사용 전 degassing 하여야 하며 기기운용 중 필요하다면 degasser를 장착하여 baseline drift를 최소화한다.

- **Peak 면적 측정** : GLC 기기분석 시와 동일하게 적용한다.

8) 정성 및 정량

- **정성** : GLC 기기분석에서는 머무름 시간, HPLC에서는 머무름 시간이나 용량계수 (capacity)를 표준 화합물과 분석성분을 비교, 동일함을 확인함으로써 정성한다. 다성분 분석의 경우에는 기준 화합물과의 상대 머무름 계수를 추가로 확인한다. 머무름 시간의 차이가 미세하여 혼동을 유발할 경우 표준화합물과의 co-chromatography에 의하여 머무름 시간을 확인한다.

- **검량법** : 분석법에서 특별히 명시하지 않을 경우 외부표준법을 표준으로 사용한다. 표준용액을 농도별로 5수준으로 조제하고 검량선을 작성하여 직선적 비례구간을 설정한다. 일상적 분석에서는 기기의 감도 및 머무름 특성 변화가 미미하다면 직선적 비례구간 내에서 40~60%의 full scale deflection (FSD)를 발생하는 1개 농도의 표준용액으로 검량선 작성을 간략화 할 수 있다. 내부표준법을 사용하는 경우 이를 명시한다.

- **잔류량 산출** : 검체 중 잔류량은 잔류분 정의에 명시된 성분을 기준으로 산출한다. 대상성분과 분석성분이 동일하다면 분석성분량으로부터 직접 잔류량을 산출한다. 분석성분이 대상성분의 변환체나 ion과 같은 일정 부분이라면 화학식량 차이에 따른 환산계수를 적용하여 잔류량을 산출한다. 분석성분과 대상성분이 상이하다하더라도 유도체 변환분석법이 대상성분의 표준용액을 기준으로 설정되었다면 대상성분 기준으로 상대적으로 비교하여 잔류량을 산출한다.

9) 잔류분의 재확인

- **Alternative column법** : 일상적으로 잔류분을 재확인하는 방법으로만 사용함을 전제로 한다. 즉 동일 부류의 검체에 대하여 GC-MS나 LC-MS에 의한 재확인 과정이 선행적으로 수행되었을 경우 추가의 검체에 대하여는 머무름 특성이 상이한 alternative column을 사용하여 일상적 재확인과정을 수행할 수 있다.

- **GC-MS법** : GLC로 분석한 동일 검체의 대상성분에 대하여 SIM mode로 재확인 과정을 수행한다. 사용하는 GC-MS는 single quadrupole 및 ion-trap analyzer을 기준으로 모두 사용이 가능하며 표준화합물과 검체 중 대상성분의 존재 여부를 비교한다.

- **LC-MS법** : HPLC로 분석한 동일 검체의 대상성분에 대하여 SIM (selected ion monitoring) mode로 재확인 과정을 수행한다. GC-MS와 마찬가지로 LC-MS는 single quadrupole 및 ion-trap analyzer를 기준으로 모두 사용이 가능하며 표준화합물과 검체 중 대상성분의 존재 여부를 비교한다. 기기 여건이 허락될 경우 triple quadrupole 이나 ion-trap의 SDM (selected decomposition monitoring) mode 사용도 가능하다.

10) 잔류분석법의 검증

- **회수율 시험** : 분석법은 주기적으로 그 분석효율 및 정밀성을 회수율 시험으로 검증함을 전제로 한다. 또한 정량한계에 대한 주기적 검증도 수행되어야 한다. 아울러 분석을 수행하는 분석 요원에 대해서도 자질 검증을 분석법 운용의 기본 전제 조건으로 한다.

- **분석법 운용** : 기기의 감도 변화, column의 분리 효율, column chromatography나 SPE의 용출 특성 등 분석법 적용에 영향을 미치는 요소에 대해서는 주기적으로 항상성을 검증함을 원칙으로 한다.

8.2 다종농약다성분 분석법

8.2.1 잔류농약 분석법 4.1.2.2

다종농약다성분 분석법-제2법
(Multi class pesticide multiresidue methods)

1) 분석법 대상 농약 : 비해리 극성 및 비극성 농약

GC 분석 대상 (154종)

1 Acrinathrin(ECD)
2 Aldrin(ECD)
3 Anilofos(NPD)
4 Azinphos-methyl(ECD, NPD)
5 α, β, ɣ, δ-BHC(ECD)
6 Bifenthrin(ECD)
7 Bromacil(ECD)
8 Bromopropylate(ECD)
9 Cadusafos(NPD, FPD)
10 Captafol(ECD)
11 Captan(ECD)
12 Carbophenothion(ECD, NPD)
13 Chinomethionat(ECD)
14 Chlordane(ECD)
15 Chlorfenapyr(NPD, FPD)
16 Chlorobenzilate(ECD)
17 Chlorothalonil(ECD)
18 Chlorpyrifos(ECD, NPD)
19 Chlorpyrifos-methyl(ECD, NPD)
20 Cycloprothrin(ECD, NPD)
21 Cyflufenamid(ECD)
22 **Cyfluthrin(ECD)***
23 **Cyhalothrin(ECD)***
24 **Cypermethrin(ECD)***
25 Cyproconazole(NPD)
26 Cyprodinil(NPD)
27 DDT(ECD)
28 **Deltamethrin(ECD)***
29 Diazinon(ECD, NPD)
30 Dichlofluanid(ECD, NPD)
31 Dicloran(ECD)
32 Dicofol(ECD)
33 Dieldrin(ECD)
34 Diethofencarb(NPD)
35 Dimepiperate(ECD, NPD, FPD)
36 Dimethenamid(NPD)
37 Dimethoate(ECD, NPD)
38 Dimethylvinphos(NPD, FPD)
39 Diniconazole(ECD)
40 Diphenamid(NPD)
41 Diphenylamine(NPD)
42 Dithiopyr(ECD)
43 Edifenphos(ECD, NPD)
44 α-Endosulfan(ECD)
45 β-Endosulfan(ECD)
46 Endosulfan-sulfate(ECD)
47 Endrin(ECD)
48 EPN(ECD, NPD)
49 Esprocarb(ECD, NPD)
50 Ethion(ECD, NPD)
51 Ethoprophos(ECD, NPD)
52 Etoxazole(NPD)
53 Etrimfos(ECD, NPD)
54 Fenamidone(ECD, NPD)
55 **Fenarimol(ECD, NPD)***
56 **Fenazaquin(NPD, FPD)***
57 **Fenbuconazole(ECD)***
58 Fenitrothion(ECD, NPD)
59 Fenobucarb(NPD)
60 **Fenothiocarb(NPD)***
61 Fenoxanil(ECD, NPD)
62 Fenoxycarb(NPD, UVD)
63 **Fenpropathrin(ECD, NPD)***
64 **Fenthion(ECD, NPD)***
65 **Fenvalerate(ECD)***
66 Fipronil(NPD, FPD)
67 Flonicamid(ECD)
68 Fluazinam(ECD)
69 Fludioxonil(NPD)
70 Flupyrazofos(NPD, FPD)
71 Flusilazole(NPD)
72 Flusulfamide(ECD)
73 Flutolanil(ECD)
74 **Fluvalinate(ECD)***
75 Folpet(ECD)

76 Fosthiazate(NPD, FPD)
77 Fthalide(ECD)
78 Furathiocarb(NPD)
79 Heptachlor epoxide(ECD)
80 Heptachlor(ECD)
81 Imazalil(ECD)
82 Indanofan(ECD)
83 Indoxacarb(ECD)
84 Iprobenfos(NPD, FPD)
85 Iprodione(ECD)
86 Iprovalicarb(ECD)
87 Isazofos(NPD)
88 Isofenphos(NPD)
89 Isoprothiolane(NPD, FPD)
90 Kresoxim-methyl(NPD)
91 Malathion(ECD, NPD)
92 Mecarbam(ECD, NPD)
93 Mefenacet(ECD)
94 Mepronil(NPD)
95 Metconazole(NPD)
96 Methidathion(ECD)
97 Methoxychlor(ECD)
98 Molinate(NPD)
99 **Myclobutanil(ECD, NPD)***
100 Nitrapyrin(ECD)
101 Nonachlor(ECD)
102 **Nuarimol(ECD)***
103 Ofurace(ECD)
104 Oxadixyl(ECD)
105 **Paclobutrazol(ECD, NPD)***
106 Parathion(ECD, NPD)
107 Parathion-methyl(ECD, NPD)
108 Penconazole(ECD, NPD)
109 Pendimethalin(ECD, NPD)
110 **Permethrin(ECD)***
111 Phenthoate(ECD)
112 Phosalone(ECD, NPD)
113 Phosmet(ECD)
114 Phosphamidone(ECD, NPD)
115 Pirimicarb(NPD)
116 Pirimiphos-ethyl(NPD)
117 Pirimiphos-methyl(NPD)
118 Probenazole(ECD)
119 Prochloraz(ECD)
120 Procymidone(ECD, NPD)
121 Profenofos(ECD, NPD)
122 Propisochlor(ECD, NPD)
123 Prothiofos(NPD)
124 Pyraclofos(NPD)
125 Pyrazophos(ECD, NPD)
126 **Pyridaben(NPD)***
127 Pyridalyl(ECD, NPD, FPD)
128 Pyrimidifen(ECD)
129 Pyriminobac-methyl(NPD)
130 Quinalphos(NPD)
131 Quintozene(ECD)
132 Simeconazole(NPD)
133 **Tebufenpyrad(NPD)***
134 Tebupirimfos(ECD, NPD, FPD)
135 Tefluthrin(ECD)
136 **Terbufos(NPD)***
137 Terbutylazine(ECD, NPD)
138 Tetradifon(ECD)
139 Thiazopyr(ECD, NPD)
140 Thifluzamid(ECD, NPD)
141 Thiometon(ECD, NPD)
142 Tolclofos-methyl(ECD, NPD)
143 Tolylfluanid(ECD, NPD)
144 Tralomethrin(ECD)
145 Triadimefon(ECD, NPD)
146 Triazophos(NPD)
147 Triflumizole(ECD, NPD)
148 Triflumuron(ECD)
149 Vinclozoline(ECD, NPD)
150 Zoxamide(ECD, NPD)
151 Bromobutide(NPD)
152 Metrafenone(ECD)
153 Piperophos(NPD, FPD)
154 Dichlorvos(NPE, FPE)

HPLC 분석 대상 (68종)

직접 분석법

1 Acetamiprid(HPLC-UVD)*
2 Azafenidin(HPLC-UVD)
3 Azoxystrobin(HPLC-UVD)
4 Benzoximate(HPLC-UVD)*
5 Boscalid(HPLC-UVD)
6 Cinosulfuron(HPLC-UVD)
7 Clothianidin(HPLC-UVD)*
8 Cyazofamid(HPLC-UVD)
9 Cyhalofop-butyl(HPLC-UVD)
10 Cymoxanil(HPLC-UVD)
11 Dimethomorph(HPLC-UVD)
12 Ethaboxam(HPLC-UVD, 310nm)
13 Fenpyroximate(HPLC-UVD)*
14 Fenhexamid(HPLC-UVD)
15 Flufenacet(HPLC-UVD)
16 Flufenoxuron(HPLC-UVD
17 Fluquinconazole(HPLC-UVD
18 Flumioxazine(HPLC-UVD)
19 Forchlorfenuron(HPLC-UVD)
20 Ferimzone(HPLC-UVD)
21 Fluacrypyrim(HPLC-UVD)
22 Hexaflumuron(HPLC-UVD)
23 Imibenconazole(HPLC-UVD)
24 Lufenuron(HPLC-UVD)
25 Mepanipyrim(NPD, HPLC-UVD)
26 Methabenzthiazuron(HPLC-UVD)
27 Methoxyfenozide(HPLC-UVD)
28 Novaluron(HPLC-UVD)
29 Oxaziclomefon(HPLC-UVD)
30 Pentoxazone(HPLC-UVD)
31 Pyraclostrobin(HPLC-UVD)
32 Pyrazolate(HPLC-UVD)
33 Pyrimethanil(HPLC-UVD)
34 Pyributicarb(HPLC-UVD)
35 Pyriproxyfen(HPLC-UVD)
36 Pyroquilon(HPLC-UVD)
37 Spirodiclofen(HPLC-UVD)
38 Tebufenozide(HPLC-UVD)
39 Teflubenzuron(HPLC-UVD)
40 Tiadinil(HPLC-UVD)
41 Thenychlor(HPLC-UVD)
42 Thiacloprid(HPLC-UVD)*
43 Thiamethoxam(HPLC-UVD)*
44 Tricyclazole(NPD,HPLC-UVD)
45 Trifloxystrobin(HPLC-UVD)
46 Amisulbrom(HPLC-UVD)
47 Flubendiamide(HPLC-UVD)
48 Pyribenzoxim(HPLC-UVD)
49 Chlorantraniliprole(HPLC-UVD)
50 Metamifop(HPLC-UVD)
51 Quinoclamine(HPLC-UVD)
52 Chromafenozide(HPLC-UVD)

Post-column 유도체 분석법

1 Aldicarb(HPLC-FLD)
2 Bendiocarb(HPLC-FLD)
3 Butocarboxim(HPLC-FLD)
4 Carbaryl(HPLC-FLD)
5 Ethiofencarb(HPLC-FLD)
6 Isoprocarb(HPLC-FLD)
7 Methiocarb(HPLC-FLD)
8 Methomyl(HPLC-FLD)*
9 Metolcarb(HPLC-FLD)
10 Oxamyl(HPLC-FLD)*
11 Promecarb(HPLC-FLD)
12 Propoxur(HPLC-FLD)
13 Thiodicarb(HPLC-FLD)
14 2,3,5-Trimethacarb(HPLC-FLD)
15 3,4,5-Trimethacarb(HPLC-FLD)
16 Carbofuran(HPLC-FLD)

주) 이 시험법을 이용하여 위의 분석 대상성분 중 * 표시된 농약이 식품에서 검출될 경우

정량분석은 아래의 시험법에 따른다.

4.1.3.5 Deltamethrin, Bioresmethrin, Cyhalothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Tralomethrin, Fenvalerate, Fenpropathrin, Fluvalinate, Flucythrinate 및 Permethrin

4.1.3.6 Dinotefuran, Acetamiprid, Imidacloprid, Clothianidin, Thiacloprid 및 Thiamethoxam

4.1.3.11 Fenthion, Phorate 및 Terbufos

4.1.3.14 Benzoximate, Clofentezine, Fenazaquin, Fenothiocarb, Fenpyroximate, Hexythiazox, Pyridaben 및 Tebufenpyrad

4.1.3.15 Methomyl 및 Oxamyl

4.1.3.23 Difenoconazole, Fenarimol, Fenbuconazole, Hexaconazole, Myclobutanil, Nuarimol 및 Paclobutrazol

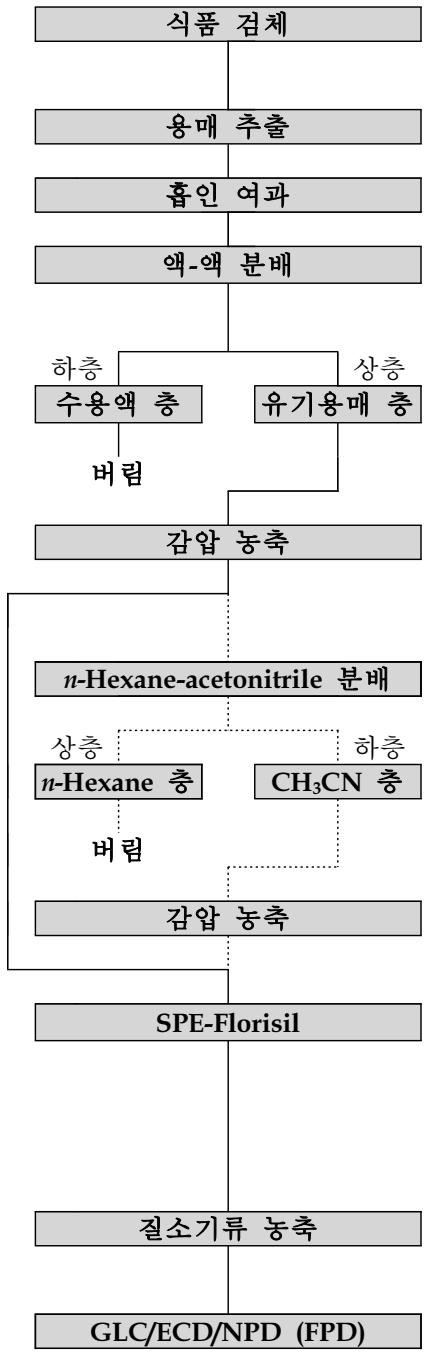
4.1.4.105 Quinalphos

3) 분석법 개요

균질 습윤화 검체에 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물에 과량의 NaCl을 가하여 진탕 후 정치, 분리된 두 층 중 상층의 acetonitrile 추출액 일부를 취하여 농축 건고한다. 곡류 및 콩류 등 유지검체는 *n*-hexane-acetonitirle partition법에 의하여 유지 및 비극성 불순물을 제거한다. 추출액을 GLC 분석용 농약은 흡착 크로마토그래피법인 SPE-Florisil법, HPLC 분석용 농약은 약이온교환 크로마토그래피법인 SPE-NH_2법으로 추가 정제한다. GLC는 narrow-bore capillary column을 승온조건으로 운용하여 화합물들을 고분리능으로 분리하고 해당 화합물의 구조에 따라 ECD/NPD 및 FPD를 검출기로 사용한다. HPLC는 octadecylsilyl (C_{18}) column을 역상으로 농도구배조건으로 사용, 화합물들을 최대한 분리하고 직접 UVD로 분석한다. Carbamate계 농약 성분들은 HPLC column 용출액을 가수분해한 후 발생되는 methylamine을 *o*-phthaldehyde/2-mercaptoethanol 시약과 반응, 형광유도체를 형성하는 post-column reaction 장치를 부착한 HPLC를 사용하며 검출기로는 형광검출기(FLD)를 사용한다.

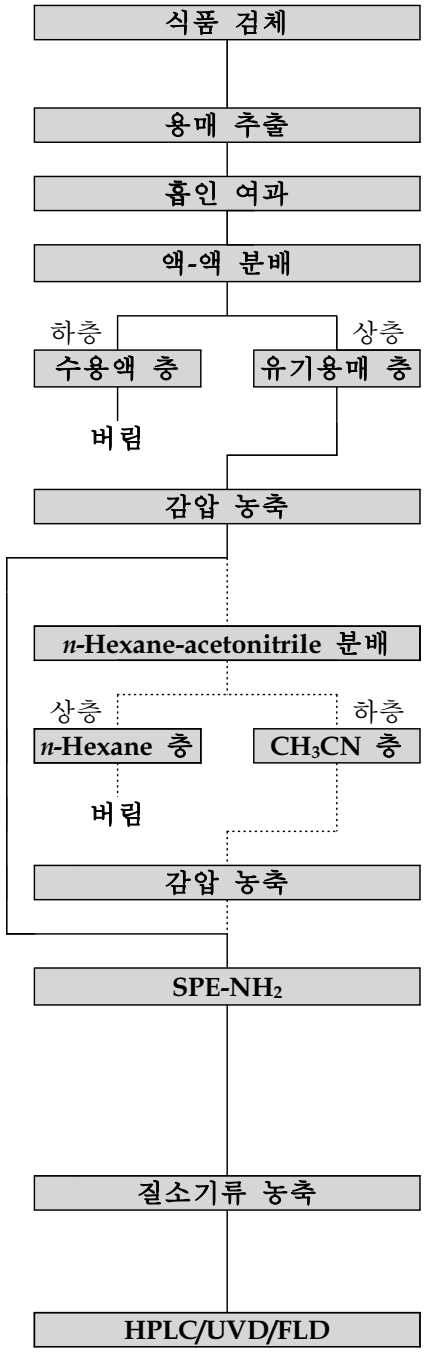
4) 검체 추출 및 정제 과정

① GC 측정 대상성분



- 검체 50g (차 10g), 곡류 및 콩류의 경우 물 30mL, 차의 경우 물 40mL를 가하여 2시간 습윤화
- Acetonitrile 100mL를 정확히 가하여 추출
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 150mL 용량의 PTFE-lined cap 부착 bottle에서 수행
- NaCl 15g 첨가
- 1분간 격렬하게 진탕 후 정치하여 층 분리
- Acetonitrile 층 20mL (검체 10g, 차는 2g 해당량)를 정확히 취함
- Acetone에 녹인 2% dienthylene glycol 0.2mL 첨가
- 40℃ 농축 건고
- **곡류, 콩류, 종실류 등 유지 검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- Acetone에 녹인 2% dienthylene glycol 0.2mL 첨가
- 40℃ 농축 건고
- Acetone/*n*-hexane (20/80) 4mL에 재용해
- SPE-Florisil 500mg 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (activation) → 버림
- Acetone/*n*-hexane (20/80) 5mL → 버림
- 검체용액 4mL + acetone/*n*-hexane (20/80) 5mL → 받음
- 내부표준물질 첨가
- 40℃ 질소기류 하에서 농축 건고
- Acetone/*n*-hexane (20/80) 2mL에 재용해

② HPLC 측정 대상성분



- 검체 50g (차 10g), 곡류 및 콩류의 경우 물 30mL, 차의 경우 물 40mL를 가하여 2시간 습윤화
- Acetonitrile 100mL를 정확히 가하여 추출
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 150mL 용량의 PTFE-lined cap 부착 bottle에서 수행
- NaCl 15g 첨가
- 1분간 격렬하게 진탕 후 정치하여 층 분리
- Acetonitrile 층 20mL (검체 10g, 차는 2g 해당량)를 정확히 취함
- 40℃에서 농축 건고
- **곡류, 콩류, 종실류 등 유지 검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- Methanol/dichloromethane (1/99) 4mL에 재용해
- SPE-NH_2 (aminopropyl) 1000mg 카트리지
- Dichloromethane 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 4mL + methanol/dichloromethane (1/99) 7mL → 받음
- 내부표준물질 첨가
- 40℃ 질소기류 하에서 농축 건고
- Methanol (UVD 대상농약은 acetonitrile) 2mL에 재용해
- Membrane filter (PTFE, 0.45μm)를 통과시켜 미세 여과
- FLD는 post-column 반응기 부착 HPLC 사용

4-1) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
질소·인검출기 (NPD)
불꽃광도검출기 (FPD)
분리용 칼럼 : DB-5 및 DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)

GC-ECD

칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃(DB-17의 경우 270℃)에서 10분 이상 (DB-17의 경우 15분 이상) 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, split (50 : 1)

GC-NPD

칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃(DB-17의 경우 270℃)에서 10분 이상 (DB-17의 경우 15분 이상) 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless

GC-FPD

칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 250℃에서 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 220℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless

4-2) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : Post-column derivatization system
형광검출기 (FLD)
자외부흡광검출기 (UVD)

HPLC-FLD (post-column derivatization system 포함)

분리용 칼럼 : Nova-Pak C_{18} (3.9 mm i.d. × 150 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : Gradient, methanol/물 (30/70, v/v)에서 methanol/물 (70/30, v/v)으로 23분간 농도균배한 후 5분 이상 흘려보낸다.
이동상 유량 : 0.5 mL/min
Post reaction pump 유량 : 0.5 mL/min 또는 기타 최적조건
(NaOH 0.25 mL/min, OPA 0.25 mL/min)
검출기 파장 : Emission 455 nm/Excitation 340 nm

HPLC-UVD

분리용 칼럼 : Nova-Pak C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : Gradient, acetonitrile/물 (20/80, v/v)에서 acetonitrile/물 (80/20,v/v)으로 40분간 농도균배한 후 10분 이상 흘려보낸다.
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 254 nm

5-1) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 mm, 0.25 μm)
칼럼온도 : 100℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 15분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
Interface 온도 : 280℃
주입량 : 1 μL, split (10 : 1)
Solvent delay time : 5분
캐리어가스 및 유량 : helium, 0.9 mL/min

5-2) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- 본 분석법은 농약 살포내역이 불분명한 미지 식품검체에 대하여 잔류농약의 함유 여부를 검색 (screening) 할 목적으로 사용되는 다종농약다성분 분석법이다. 본 분석법은 분석조작 1회당 검색이 가능한 농약수가 위의 표에 나타낸 바와 같이 대단히 많으므로 분석효율은 매우 높으나 각각의 성분에 대한 분석의 정밀도나 신뢰성은 다소 열등한 단점이 있다. 즉 다종농약다성분 분석법에서는 대상성분들을 물리화학적 특성 범위별로 크게 그룹핑하고 그룹별로 검체 추출, 정제 및 기기분석과정에 의하여 검체 분석을 수행하므로 1개 분석 대상성분마다 최적의 분석법을 적용하는 것이 불가능하다. 따라서 각 대상성분의 특성에 최적화된 검체 추출, 정제 및 기기분석조건이 적용되는 개별 분석법에 비하여 분석 감도, 정밀성 및 신뢰도가 떨어질 수밖에 없다는 점을 본 분석법 적용 전에 미리 인식하여야 한다. 또한 정제과정이 특화되어 있지 않아 간섭물질의 제거범위가 개별 분석법에 비하여 좁으므로 검체의 종류별로 혼입되는 간섭물질의 종류 및 양이 크게 변화할 수 있다. 즉, 검체 종류별로 분석 성분들에 대하여 간섭 정도가 상이하므로 크로마토그래피적 머무름 특성만을 이용하여 확인된 분석 성분의 정성적 확률이 열등하다. 따라서 본 분석법에 의하여 검출된 성분에 대해서는 반드시 재확인과정을 수행하도록 한다. 특히 허용기준 등에 근접한 잔류량을 나타내어 실험적 오차 등이 법적 판정에 영향을 미치는 경우에는, 동일 검체에 대하여 검출된 성분에 특화된 개별 분석법을 재적용, 추가 분석함으로써 분석결과의 정밀성을 입증하도록 한다.

- 본 분석법은 해리하지 않는 중성의 비극성 및 극성 농약성분들을 주 분석 대상으로 한다. 산성 및 염기성의 해리 화합물 중 약하게 해리하는 일부 염기성 화합물을 제외하고는 본 분석법으로 분석되지 않는다.

- 비극성 및 중간 극성의 휘발성 중성 화합물들은 GLC로 분석하며 화학구조 중 포함되어 있는 작용기에 따라 검출기로는 ECD (halogen, nitrile, nitro, conjugated carbonyl 기 등을 포함하는 화합물), NPD (질소나 인을 포함하는 화합물) 그리고 FPD (인이나 황을 포함하고 있는 화합물)를 적용한다. 검출기에 반응성을 나타내는 작용기가 두 종류 이상인 화합물은 2종 이상의 검출기로 분석이 가능하며 검출기별 반응 비율을

비교, 간단한 재확인 과정을 수행할 수 있다. NPD와 FPD 모두로 분석이 가능한 인 함유 화합물에 대해서는 검출기의 선택성과 안정성을 고려할 때 FPD를 사용하여 분석하는 것이 단연 신뢰성이 높다. 황을 함유하는 화합물에 대하여 FPD를 사용할 때에는 광학필터를 일반적 phosphorus용 filter가 아닌 sulfur filter를 착용, 사용하여야 하며 염광 현상에서 sulfur는 S_2의 형태로 발광하므로 peak 면적의 제곱근이 분석물질의 양과 직선적으로 비례함을 유의하여야 한다.

- GLC 분리용 column으로는 다성분 간의 분리를 최대화하기 위하여 0.25 mm 내경의 고분리능 capillary column을 사용하며 liquid phase로는 극성이 상이한 5% phenylsiloxane (DB-5, HP-5, SPB-5 등)과 50% phenylsiloxane (DB-17, HP-17, SPB-17 등)이 함유된 methylsiloxane을 liquid phase로서 함께 사용한다. 전자는 비극성, 후자는 중간 극성을 나타내어 화합물의 극성에 따라 머무름 특성이 서로 상이하므로 검체 용액을 극성이 상이한 분리용 column에 재주입, 변화된 머무름 특성을 기준으로 기검출된 잔류분을 재확인할 수 있다. 검체 주입법으로는 capillary column용 injector에서 ECD의 경우 split, NPD나 FPD의 경우 splitless를 사용한다. ECD의 경우 검출기의 감도는 높으나 선택성 및 오염 가능성이 높아 실제 column으로 주입되는 검체량을 줄이는 split법을 사용하며, 검출기 동작 원리상 연소에 의하여 오염성이 상대적으로 적은 반면 감도가 비교적 낮은 NPD와 FPD는 실제 검체 주입량을 최대로 하는 splitless법을 사용한다. Split 주입의 경우에는 split vent와 carrier gas의 유속 비율을 분석시간 내내 50:1로 일정하게 조절하는 것이 중요하다. 이때 vent valve는 항상 개방된 상태로 유지한다. Splitless 주입의 경우에는 검체 주입 후 30초~1.5분간 vent valve를 폐쇄된 상태로 유지하였다가 그 이후 개방하는데 최적 폐쇄시간을 결정하는 것이 분리나 재현성 측면에서 중요하다. Split vent의 최적 유속은 각 기기회사에서 제시한 조건에 따르면 큰 문제는 없다.

- 중간 극성~극성의 화합물, 휘발성이 낮거나 열에 대한 안정성이 열등한 화합물들은 HPLC에 의하여 분석하며 검출기로는 자외흡광검출기 (UVD)를 사용한다. 대상 화합물별로 최대 흡광파장은 상이하나 빠른 검색을 위하여 254 nm의 1개 파장에서 측정한다. 검출된 화합물이 254 nm와는 별개의 최대 흡광파장을 가지고 있을 경우에는 측정 파장을 변경하여 검체를 재주입, 파장별 반응정도를 비교함으로써 간편 재확인용으로 사용할 수 있다. 사용하는 UVD는 monochromatic 방식을 우선적으로 사용한다. Polychromatic 방식의 photodiode-array형 UVD는 2개 이상의 파장에서 동시에 측정하거나 일정 파장 범위를 scanning, 분광학적 정성을 보다 정확하게 수행할 수 있는 장점은 있으나 감도가 monochromatic 방식에 비하여 1/5~1/10 정도로 열등하다.

- HPLC에서 사용하는 분리용 column은 최소 5 μm 이하의 구형입자로 충전된 octadecylsilyl (C_{18}) column을 사용하며 이동상은 acetonitrile과 물 혼합액을 농도구배조건으로 사용하여 분리능을 최대화한다. 분석법에서 제시된 Nova-Pak™ C_{18} column은 작용기가 polar group이 포함되어 있지 않은 순수 C_{18} ligand이며 silica base는 endcapping되어 있는 형태이다. 유사 C_{18} column을 사용할 때에는 이러한 충전제 특성에 유의하여 분리용 column을 선정하여야만 분석법에서 제시한 것과 동일한 분리 양상을 얻을 수 있다.

- Carbamate계 성분에 대해서는 HPLC에 의하여 분석하되 post-column 유도체 형성법을 이용한다. 즉, 그림 1의 반응식에 나타낸 바와 같이 대상성분을 가수분해하여 methylamine을 방출시키고 이를 *o*-phthaldehyde/2-mercaptoethanol 시약으로 고리화 반응시킨다. 형성된 화합물은 강한 형광성을 나타내므로 형광검출기를 이용하여 분석한다. 이 방법은 carbamate계 성분에 대해서 적용되는 국제 표준적 방법으로서 고감도와 선택성이 우수한 정량방법이다.

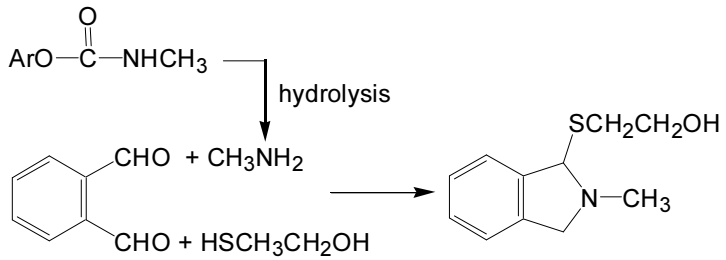


그림 1. Carbamate계 농약 분석을 위한 post-column deivatization 반응

- Post-column 유도체 형성 장치가 부착된 HPLC의 모식적 기기 구성을 그림 2에 나타내었다. 즉, HPLC column 상에서 모화합물 형태로서 분리된 각 성분들은 순차적으로 column 출구로 유출되며 별도의 pump에 의하여 공급되는 NaOH와 혼합, 가수분해되어 methylamine을 방출한다. 방출된 methylamine은 다시 별개의 pump에 의하여 공급되는 *o*-phthaldehyde/2-mercaptoethanol 시약과 혼합되고 가열, 형광유도체를 형성하게 되며 순차적으로 형광검출기 (fluorescenece detector, FLD)로 유입된다. Column 용출액 중 가수분해에 의하여 1차 amine을 방출하지 않는 간섭물질들은 대부분 형광성이 없으므로 형광검출기에서 반응을 나타내지 않는다. 또한 형광검출기는 UVD에 비하여 수배~수십배 감도가 높으므로 대상 화합물들은 고감도로 검출된다.

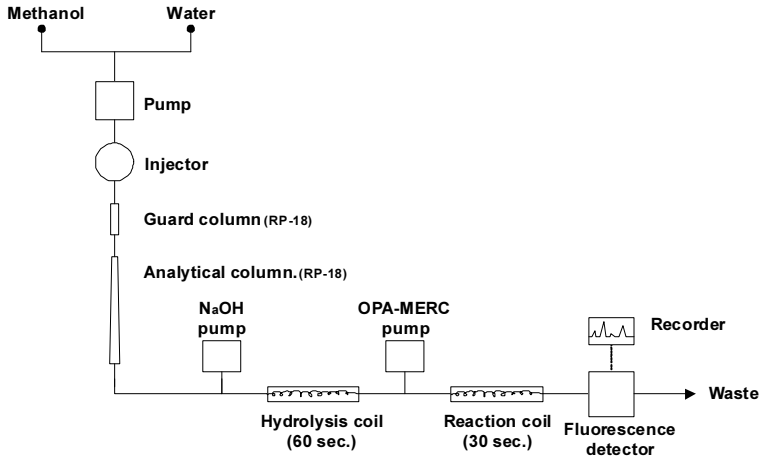


그림 2. Post-column 유도체 형성 HPLC의 기기구성

- 분석법에서 검체의 추출에는 acetonitrile을 사용한다. Acetonitrile은 중성 농약성분에 대해서 표준적으로 사용되는 추출용매이며 acetone 보다는 비극성 간섭물질의 용출이 비교적 적고 methanol 보다는 비극성 농약에 대한 추출효율이 높다. 액-액 분배는 acetonitrile 추출액에 함유된 수분에 NaCl을 거의 포화될 정도로 가하여 수용액 층으로 분리시키고 acetonitrile 층만을 분취함으로써 이루어진다. 이 때 수용액 층에 분포하는 무기 및 극성이 높은 간섭물질들이 제거된다. 이러한 액-액 분배법은 비극성~극성의 대상성분을 모두 회수하기 위한 최소한의 분배 정제법으로 다른 개별 분석법에서 사용하는 특화된 액-액 분배법에 비하여 당연히 간섭물질의 양은 많다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략이 가능하다.

- 검체추출액의 최종 정제는 크로마토그래피법을 이용하며 GLC 분석용 검체의 경우는 SPE-Florisil에 의한 흡착 크로마토그래피법, HPLC 분석용 검체의 경우는 SPE-NH_2를 사용한 약음이온교환 크로마토그래피법에 의하여 정제한다. SPE-Florisil의 경우 용출용매의 강도가 강하여 일부의 극성 간섭물질만이 제거된다. SPE-NH_2는 작용기가 *n*-propylamine이며 약이온교환수지로 작용한다. 용출용매가 methanol/dichloromethane (1/99)이므로 비극성~극성의 중성 화합물은 모두 용출된다. 해리성 화합물 중 염기성

화합물은 그대로 용출되며 약산성 화합물은 NH_2기의 반대 이온이므로 column에서 포집, 제거된다. 이러한 SPE 사용 시에는 적은 충전제 양으로 인하여 overloading 현상이 발생, 분리효율이 저하되어 정제가 불충분할 수 있으므로 과다한 검체량을 적용하는 것은 가급적 피한다.

- 본 분석법에서는 추출액의 정제도가 다른 개별분석법에 비하여 떨어지므로 GLC나 HPLC 분리용 column에 guard column을 부착하여 사용하며 특히 HPLC에서는 필수적이다. GLC column의 경우 일정 수의 검체 분석 후에는 guard column을 교체하거나 선단부 일부를 절단, 오염된 부분을 제거하고 다시 conditioning하여 분리효율을 검정한 후 사용하며 필요시에는 column 전체를 교체한다. HPLC의 경우 일정 수의 검체 분석 후 guard column 만을 주기적으로 교체하면 분석용 column을 계속적으로 사용할 수 있다.

- 대상 화합물들의 잔류분은 GC-MS SIM을 이용하여 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다. 분석 대상성분을 GC-MS로 재확인할 때 monitoring 하는 SIM channel의 수를 과다하게 설정하면 신호/잡음비가 낮아져 일상적 분석법과 대등한 감도에서 재확인과정을 수행할 수 없다. 따라서 성분별 SIM channel 설정 수는 3개 이내로 제한하는 것이 적정 감도를 위하여 필요하다. 또한 대부분 molecular ion의 relative abundance가 낮아 SIM에 분자이온을 포함시킬 수 없으므로 정성 확인율을 유지하기 위해서는 분자구조를 충분히 반영하는 fragment ion을 적어도 2개 이상 monitoring 하는 것이 필수적이다.

- LC-MS를 이용하여 잔류분을 재확인하고자할 때에는 우선적으로 대상 화합물별 최적 이온화방식을 결정한다. 즉 화합물에 따라 ESI (electrospray ionization)이나 APCI (atmospheric-pressure chemical ionization) 그리고 positive/negative 이온의 형성 용이성이 상이하다. LC-MS에서는 soft ionization 방법을 이용하므로 대개 $(분자\pm1)^{\pm}$ 이온의 생성비율이 높다. 그러나 이동상의 성분에 따라 adduct ion이 abundant ion이 되는 경우도 있으니 유의하여야 한다. SIM을 이용하여 재확인하고자 할 경우에는 대개 $(분자\pm1)^{\pm}$ 이온을 주 이온으로 설정하며 기타 사항은 GC-MS와 거의 동일하다. Tandem LC-MS에서 SRM (selected reaction monitoring)을 이용할 경우에는 대개 precursor ion을 $(분자\pm1)^{\pm}$ 이온으로 설정하고 적어도 2개 이상의 product ion을 monitoring하여 정성 확인율을 확보한다.

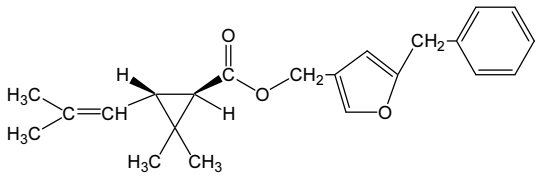
8.3 다성분 분석법

8.3.1 잔류농약 분석법 4.1.3.5

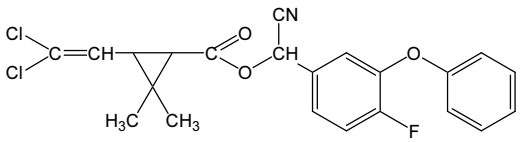
델타메쓰린(Deltamethrin), 바이오레스메스린(Bioresmethrin), 싸이할로쓰린(Cyhalothrin), 싸이플러쓰린(Cyfluthrin), 싸이퍼메쓰린(Cypermethrin), 트라로메스린(Tralomethrin), 펜발러레이트(Fenvalerate), 펜프로파스린(Fenpropathrin), 푸르발리네이트(Fluvalinate), 푸르시트리네이트(Flucythrinate) 및 퍼메쓰린(Permethrin)

1) 대상 농약의 특성

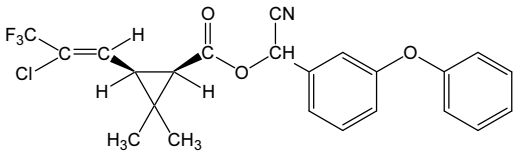
- 분자구조

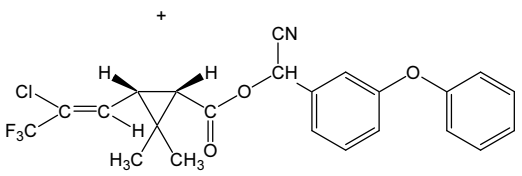


Bioresmethrin

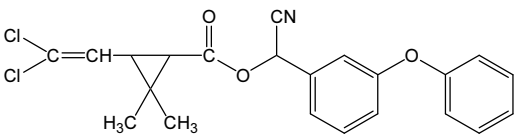


Cyfluthrin

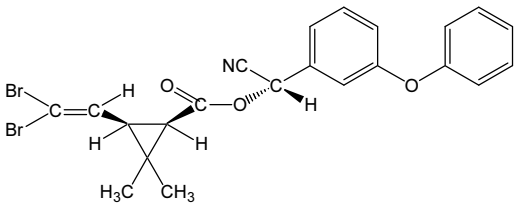




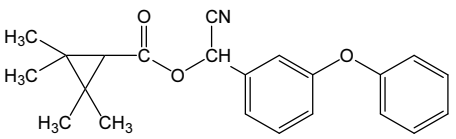
Cyhalothrin



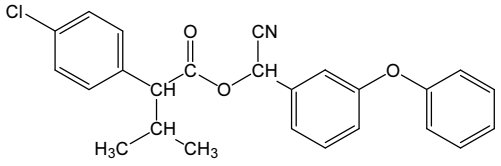
Cypermethrin



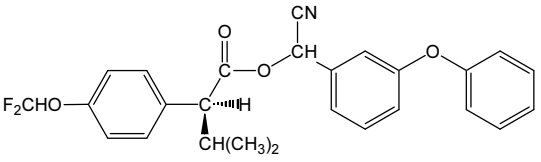
Deltamethrin



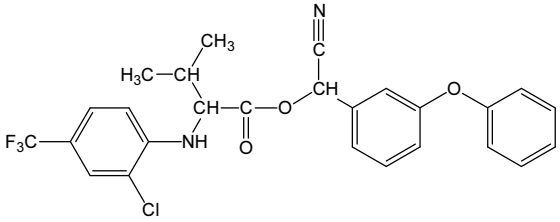
Fenpropathrin



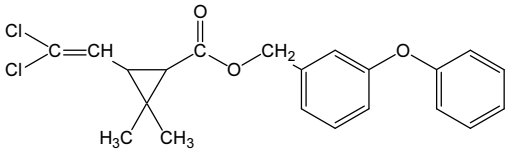
Fenvalerate



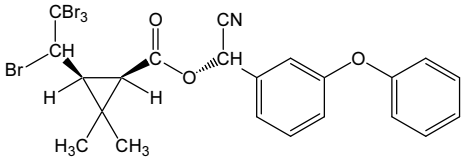
Flucythrinate



Fluvalinate



Permethrin



Tralomethrin

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Bioresmethrin	5-benzyl-3-furylmethyl (1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl) cyclopropanecarboxylate
Cyfluthrin	(RS)-α-cyano-4-fluro-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dicholrovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Cyhalothrin	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Cypermethrin	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Deltamethrin	(S)-α-cyno-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Fenpropathrin	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3,-tetramethylcyclopropanecarboxylate
Fenvalerate	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (RS)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate
Flucythrinate	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (S)-2-(4-difluoromethoxyphenyl)-3-methylbutyrate
Fluvalinate	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro-α, α, α-trifluoro-p-tolyl)-D-valinate
Permethrin	3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3RS)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Tralomethrin	(S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3S)-2,2-dimethyl-3-[(RS)-1,2,2,2-tetrabromoethyl]cyclopropanecarboxylate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Bioresmethrin	$C_{22}H_{26}O_3$	338.4	338.2
Cyfluthrin	$C_{22}H_{18}Cl_2FNO_3$	434.3	433.1
Cyhalothrin	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	449.9	449.1
Cypermethrin	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	416.3	415.1
Deltamethrin	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	505.2	503.0
Fenpropathrin	$C_{22}H_{23}NO_3$	349.4	349.2
Fenvalerate	$C_{25}H_{22}ClNO_3$	419.9	419.1
Flucythrinate	$C_{26}H_{23}F_2NO_4$	451.5	451.2
Fluvalinate	$C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$	502.9	502.1
Permethrin	$C_{21}H_{20}C_{l2}O_3$	391.3	390.1
Tralomethrin	$C_{22}H_{19}Br_4NO_3$	665.0	660.8

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Bioresmethrin	4.7 이상	〈0.3	18.6 (25℃)	비해리성
Cyfluthrin	5.9~6.0	0.002	1.4×10^{-5}~9.6×10^{-4} (20 ℃)	비해리성
Cyhalothrin	6.9	0.005	1.0×10^{-3} (20℃)	비해리성
Cypermethrin	6.6	0.004	2.0×10^{-4} (20℃)	비해리성
Deltamethrin	4.6	〈0.0002	1.2×10^{-5} (25℃)	비해리성
Fenpropathrin	6.0	0.014	7.3×10^{-1} (20℃)	비해리성
Fenvalerate	5.0	〈0.01	1.9×10^{-2} (20℃)	비해리성
Flucythrinate	4.7	0.096	1.2×10^{-3} (25℃)	비해리성
Fluvalinate	4.3	0.001	9.0×10^{-8} (20℃)	비해리성
Permethrin	6.1	0.006	1.5×10^{-3}~2.5×10^{-3} (20℃)	비해리성
Tralomethrin	5.0	0.080	4.8×10^{-6} (25℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bioresmethrin	0.03	1.0	-	-	-	-	-
Cyfluthrin	0.04	0.01~2.0	0.5~2.0	0.1~2.0	0.5	0.05	0.1
Cyhalothrin	0.002	0.05~0.2	0.2~1.0	0.2~2.0	0.2	0.02~0.5	0.02~0.05
Cypermethrin	0.02	0.05~1.0	0.5~2.0	0.05~20	0.05	0.2~2.0	0.05
Deltamethrin	0.01	0.1	0.02~2.0	0.2~1.0	-	0.05~0.5	0.01
Fenpropathrin	0.03	-	0.5~5.0	0.2~5.0	-	1.0	-
Fenvalerate	0.02	2.0	0.5~2.0	0.05~2.0	0.05	0.1~2.0	0.05~0.1
Flucythrinate	0.02	0.05	-	-	-	-	0.05
Fluvalinate	0.01	-	-	-	-	-	0.01
Permethrin	0.05	0.05~2.0	0.05~5.0	0.1~5.0	0.05~0.2	0.05~5.0	0.05~0.2
Tralomethrin	0.0075	0.1	0.02~2.0	0.2~1.0	-	0.05~0.5	0.01

2) 분석법 개요

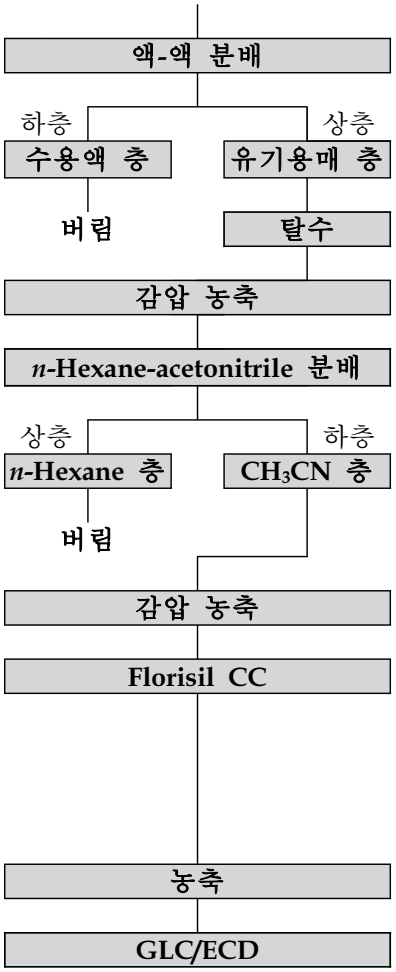
함수 또는 습윤화 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-hexane 추출액을 탈수, 감압 농축한다. 유지검체는 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 제거한다. 추출액을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

식품 검체
- 검체 20g
- 곡류 및 콩류의 경우 물 20mL을 가하여 1시간 동안 습윤화

용매 추출
- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출

흡인 여과
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용



- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 450mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해
- SPE-Florisil, 1000mg (6mL 용량의 카트리지)
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- *n*-Hexane 추출액 4mL (검체 8g 해당량)
- Dichloromethane/*n*-hexane (5/95) 10mL → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (40/60) 10mL → 받음
- 40℃ 질소기류 하에서 농축
- Isooctane 4mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC), bioresmethrin은 GC-MS로 측정
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : B-5, DB-17 및 SPB-1701 capillary column 또는 이와 동등한 것
0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm
캐리어가스 및 유량 : helium, 15 mL/min
칼럼온도 : 210℃에서 검체를 주입하고 40분간 유지 (DB-5)
230℃에서 검체를 주입하고 40분간 유지 (DB-17)
225℃에서 검체를 주입하고 40분간 유지 (SPB-1701)

주입부 온도 : 260℃
검출기의 온도 : 280℃
주입량 : 2 μL, 직접주입법 (packed inlet)
분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Bioresmethrin	0.05	Fenvalerate	0.001
Cyfluthrin	0.01	Flucythrinate	0.01
Cyhalothrin	0.003	Fluvalinate	0.01
Cypermethrin	0.01	Permethrin	0.01
Deltamethrin	0.005	Tralomethrin*	-
Fenpropathrin	0.003		

* Tralomethrin은 deltamethrin로 열전환, 정량.

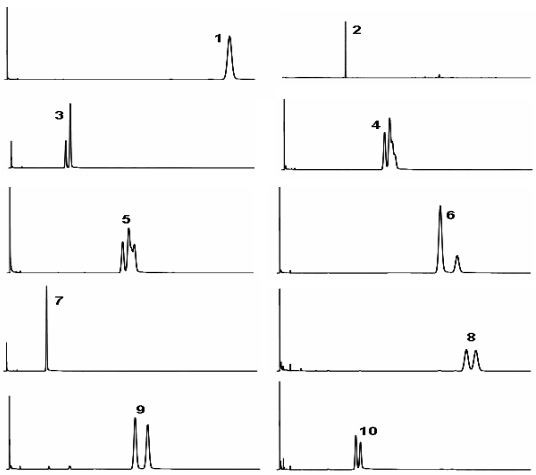


그림 1. 가스크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램 (DB-5)

1, deltamethrin (tralomethrin) (37.2분) 0.2 ng;
2, bioresmethrin (18.2분) 0.1 ng;
3, cyhalothrin (9.4분, 10.1분) 0.2 ng;
4, cyfluthrin (16.9분, 17.8분, 18.2분, 18.6분) 0.3 ng;
5, cypermethrin (19.1분, 20.1분, 20.5분, 21.0분) 0.5 ng;
6, fenvalerate (25.7분, 29.5분) 0.3 ng;
7, fenpropathrin (6.8분) 0.1 ng;
8, fluvalinate (30.1분, 32.4분) 0.3 ng;
9, flucythrinate (21.3분, 23.3분) 0.3 ng;
10, permethrin (13.0분, 13.7분) 0.3 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm
캐리어가스 및 유량 : helium, 2mL/min
칼럼온도 : 80° 에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 25℃/min의 비율로 220℃로 상승시키고 5분간 유지하고, 2℃/min의 비율로 280° 로 상승 시킨 후 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
Interface 온도 : 300℃
주입량 : 1 μL, splitless (purge time 0.9분)
분자량 범위 : 100~400

표 1. GC-MS 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Bioresmethrin	18.2	338.4	171*, 143**, 128, 123, 166
Cyfluthrin	27.8, 28.3, 28.5, 28.7	434.3	163, 206, 226, 127
Cyhalothrin	22.1, 22.7	449.9	181, 197, 209, 141, 449
Cypermethrin	29.6, 29.8, 30.0, 30.8	416.3	163, 181, 127, 209
Deltamethrin (Tralomethrin)	36.4	505.2	181, 253, 209, 172, 152
Fenpropathrin	20.0	349.4	181, 265, 125, 141, 208
Fenvalerate	32.8, 33.8	34.9.4	125, 167, 152, 181, 225, 419
Flucythrinate	30.0, 30.8	451.5	451, 199, 157, 181, 225
Fluvalinate	33.6, 34.0	502.9	250, 181, 208, 152, 502, 234
Permethrin	25.5, 26.1	391.9	183, 163, 127, 115

*정량 이온, **확인 이온

6) 분석법 해설

- 대상 화합물들은 합성제충국계열의 살충제들로 분자구조 내 cyclopropane ring과 nitrile group이 결합되어 있는 탄소 등에서 2~3개의 chiral center를 가지고 있어 다수의 입

체이성질체가 존재한다. 실제 사용되는 합성제충국제는 대부분 입체이성질체의 혼합물 형태로 사용되고 있으며 이들 중 enantiomer를 제외한 부분입체이성질체 (diastereoisomer)는 chromatography 상에서 일부 또는 전부 분리가 가능하다. 따라서 분석법은 농약별로 함유된 이성질체를 합한 총량을 기준으로 잔류량을 분석하도록 설계되었다.

- 대상 화합물들은 Log P_{ow}가 4 이상인 비극성 화합물들이다. 또한 증기압은 다소 낮으나 열에 대한 안정성이 있어 충분히 GLC에서의 분석이 가능한 화합물이며 bioresmethrin을 제외한 성분들은 분자 내에 halogen과 nitrile기를 보유하고 있어 ECD에 높은 감도를 나타낸다.

- 분석법은 개별 분석법의 특성상 정량하고자 하는 화합물별 분석의 재현성을 극대화하기 위하여 내경 0.53 mm의 capillary column을 분리용 column으로 사용하며 검체 주입은 packed inlet에 직접주입법을 이용한다. 합성제충국제는 입체이성질체가 다수 존재하여 하나의 column으로 모든 분석 대상성분을 완전 분리할 수는 없으나 DB-5와 DB-1701 column, 그리고 DB-17과 DB-1701 column을 조합함으로써 모든 성분에 대한 정량 분석과 재확인이 가능하다.

- 추출 용매로는 비극성 농약의 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 acetone 및 acetonitrile의 적용성을 검정한 결과, 함수율이 70% 이상이고 지방함량이 2% 미만인 현미, 사과, 고추, 배추 및 감자 검체의 경우는 두 용매 모두 적용이 가능하였다. 그러나 고지방 검체인 콩류 검체의 경우 acetone에 비하여 다소 극성인 용매인 acetonitrile로 추출하였을 때 검체가 잘 혼합되지 않고 응집되는 경향을 보여 추출용매의 검체내 침투성이 낮을 것으로 예상되므로 acetone을 추출용매로 선정한다.

- 추출액을 조정제하기위한 분배법으로는 대상농약들이 비극성인 점을 감안하여 수용성 유기용매 추출액을 포화식염수/물로 희석한 후 직접 비극성 용매인 *n*-hexane으로 분배하는 방법이 사용되며 분석과정의 편리성과 더불어 우수한 분배효율을 나타낸다.

- *n*-Hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 유지나 왁스의 제거에 주로 이용되는 정제법으로 고유지 검체인 현미 및 콩류 검체에서는 그 적용이 필수적이다. 저유지검체인 배추, 사과 및 감자 등의 검체에서는 그 정제정도가 미미하므로 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정의 생략도 가능하다.

- SPE 사용시 적은 충전제 양으로 인하여 overloading 현상이 발생, 분리효율의 저하로 정제가 불충분할 수 있다. 본 분석법에서는 SPE-Florisil에 현미 검체 12 g에 해당하는 검체추출물을 적용하더라도 SPE-Florisil column의 overloading의 현상은 관찰되지

않으나 과다한 검체량을 적용하는 것은 가급적 피한다.

- Tralomethrin은 열분해에 취약하여 GLC 과정 중에 deltamethrin으로 일부 전환된다. 이러한 전환률은 일정하지 않으므로 GLC/ECD 정량이나 GC-MS 재확인시 deltamethrin을 추가로 정량 또는 확인한다.

- 대표 농산물 6종의 무처리 검체에 합성제충국제를 각각 2수준 3반복으로 처리하고 상기 검체조제 및 기기분석과정을 수행하여 회수율을 산출한 결과, 분석성분, 처리수준 및 농산물 검체종류에 관계없이 회수율 및 분석오차는 잔류분석기준인 70~120% 범위와 10%이내를 만족한다. 무처리 검체에서 성분별 분석에 간섭하는 방해물질은 관찰되지 않으며 정량한계는 0.003~0.05 mg/kg 수준이다.

- 합성제충국제 분석 대상성분수가 많아 GC-MS로 재확인할 때 monitoring 하는 SIM channel의 수를 과다하게 설정하면 신호/잡음비가 낮아져 일상적 분석법과 대등한 감도에서 재확인과정을 수행할 수 없다. 따라서 성분별 SIM channel 설정 수는 3개 이내로 제한하는 것이 적정 감도를 위하여 필요하다. 또한 molecular ion의 relative abundance가 낮아 SIM에 분자이온을 포함시킬 수 없으므로 분자구조에 따른 정성 확인률을 유지하기 위해서는 적어도 2개 fragment ion을 monitoring 하는 것이 필수적이다.

표 2. 농산물중 회수율 및 정량한계

분석성분	처리농도 (mg/kg)	회수율(%) 쌀	대두	사과	고추	배추	감자	정량한계 (mg/kg)
Bioresmethrin*	0.5	91.3±5.6	93.0±2.1	90.0±2.1	85.3±1.1	88.2±3.5	90.3±3.1	0.05
	2.5	100.1±2.3	98.9±5.6	95.7±6.3	92.6±2.5	90.2±5.6	97.1±2.6	
Cyfluthrin	0.1	88.2±8.9	87.0±5.7	90.1±7.8	103.2±8.1	100.7±6.1	98.7±7.8	0.01
	0.5	95.3±5.6	96.5±5.5	93.0±2.0	100.3±2.3	90.0±8.8	87.9±5.8	
Cyhalothrin	0.03	95.2±6.8	90.3±8.0	96.5±7.0	102.6±5.2	99.1±2.4	104.7±3.5	0.003
	0.15	90.0±4.8	83.2±2.9	85.3±6.0	103.6±4.6	91.7±3.1	105.2±6.3	
Cypermethrin	0.1	87.9±0.7	98.7±8.8	95.3±5.2	98.6±7.4	85.6±4.8	97.7±8.3	0.01
	0.5	95.0±8.8	101.3±9.0	103.5±4.3	96.1±2.9	93.1±2.3	90.4±4.5	
Deltamethrin	0.05	100.1±5.9	103.2±5.9	102.5±2.6	98.9±7.8	89.6±2.3	101.8±3.5	0.005
	1.0	105.7±2.2	101.5±4.1	100.1±2.3	105.2±1.3	100.5±9.1	95.8±4.2	
Fenpropathrin	0.03	103.2±5.1	99.3±4.7	93.1±5.6	100.0±5.9	96.4±7.9	90.6±8.4	0.003
	0.15	105.5±1.0	101.0±6.9	100.9±5.7	107.1±2.1	92.9±4.1	103.4±3.1	

표 2. 농산물중 회수율 및 정량한계 (계속)

분석성분	처리농도 (mg/kg)	회수율(%)						정량한계 (mg/kg)
		쌀	대두	사과	고추	배추	감자	
Fenvalerate	0.1	87.5±3.2	82.7±8.0	83.5±8.9	88.1±6.3	98.2±2.9	89.3±2.9	0.001
	0.5	94.5±6.9	91.0±2.1	90.3±5.8	89.7±8.8	91.2±5.2	89.5±7.4	
Flucythrinate	0.1	103.2±5.6	105.6±4.0	102.9±3.2	94.2±1.0	92.6±6.3	101.9±7.0	0.01
	0.5	101.5±8.0	100.1±2.9	96.7±3.2	99.3±0.8	91.5±6.4	90.1±6.3	
Fluvalinate	0.1	90.0±4.3	92.9±5.3	93.5±6.3	103.7±3.2	97.2±8.6	101.8±2.7	0.01
	0.5	88.9±6.7	83.6±5.7	97.8±5.9	105.1±7.6	93.0±1.7	98.5±4.7	
Permethrin	0.1	85.3±4.8	84.7±2.2	22.5±4.8	99.9±6.5	91.6±8.9	82.5±4.9	0.01
	0.5	89.7±7.1	88.7±6.1	90.0±2.1	101.3±5.8	88.0±7.1	85.7±6.4	

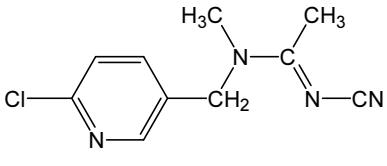
*GC-MS SIM 모드 분석 결과

8.3.2 잔류농약 분석법 4.1.3.6

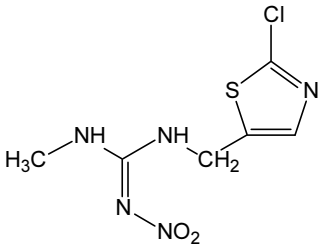
디노테푸란(Dinotefuran), 아세타미프리드(Acetamiprid),
이미다클로프리드(Imidacloprid), 크로치아니딘(Clothianidin),
티아크로프리드(Thiacloprid), 티아메톡삼(Thiamethoxam)

1) 대상 농약의 특성

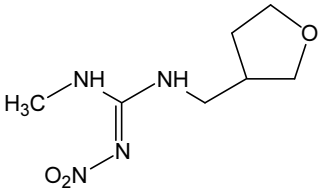
- 분자구조



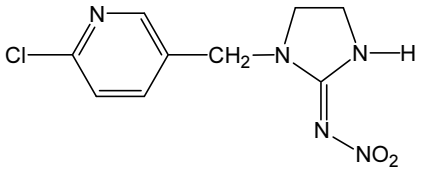
Acetamiprid



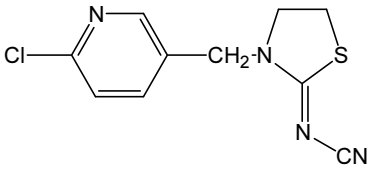
Clothianidin



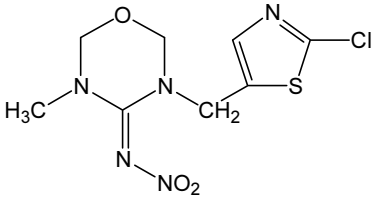
Dinotefuran



Imidacloprid



Thiacloprid



Thiamethoxam

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Acetamiprid	(*E*)-N^1-[(6-chloro-3-pyridy)methyl]-N^2-cyno-N^1-methylacetamidine
Clothianidin	(*E*)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine
Dinotefuran	(*RS*)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl)guanidine
Imidacloprid	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-*N*-nitroimidazolidin-2-ylideneamine
Thiacloprid	(*Z*)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide
Thiamethoxam	3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazin-4-ylidene(nitro)amine

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Acetamiprid	$C_{10}H_{11}ClN_4$	222.7	222.1
Clothianidin	$C_6H_8ClN_5O_2S$	249.7	249.0
Dinotefuran	$C_7H_{14}N_4O_3$	202.2	202.1
Imidacloprid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	255.7	255.1
Thiacloprid	$C_{10}H_9ClN_4S$	252.7	252.0
Thiamethoxam	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	291.7	291.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Acetamiprid	0.80	4250	$<1.0\times10^{-3}$ (25℃)	0.7, 약염기
Clothianidin	0.70	304~340	1.3×10^{-7} (25℃)	11.1
Dinotefuran	-0.55	39800	$<1.7\times10^{-3}$ (30℃)	12.6
Imidacloprid	0.57	610	4.0×10^{-7} (20℃)	비해리성
Thiacloprid	1.26	185	3.0×10^{-7} (20℃)	비해리성
Thiamethoxam	-0.13	4100	6.6×10^{-6} (25℃)	비해리성

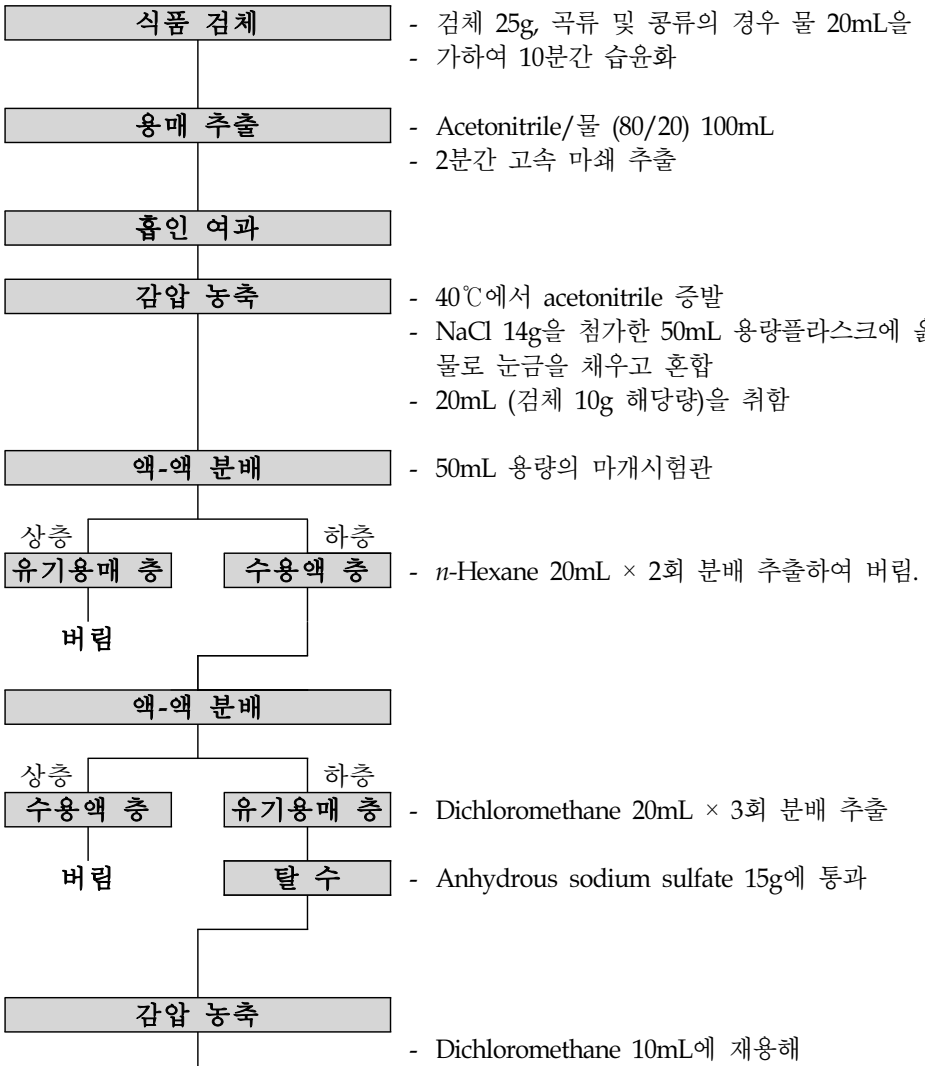
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

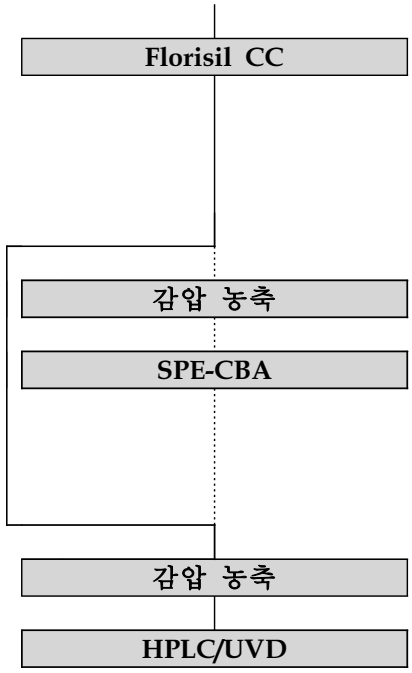
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Acetamiprid	0.07	0.3	0.1~2.0	0.1~20.0	1.0	-	0.1
Clothianidin	-	0.1	0.3~3.0	0.2~10.0	0.1	0.05	0.1
Dinotefuran	0.22	1.0	0.2~2.0	0.05~3.0	0.05	-	0.1
Imidacloprid	0.06	0.05	0.1~5.0	0.05~7.0	-	-	0.3
Thiacloprid	0.01	0.1	0.1~2.0	0.1~7.0	-	-	0.1
Thiamethoxam	-	0.1	0.1~2.0	0.1~5.0	-	-	0.1

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 acetonitrile/물 혼합액을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 과량의 sodium chloride를 가한 후 *n*-hexane으로 추출하여 버린다. 수용액 층을 분액여두에 옮겨 dichloromethane으로 분배 추출하고 Florisil column chromatography에 의하여 정제한다. 감귤검체의 경우에는 SPE-CBA로 추가 정제하며 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Florisil 5g
  Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL (검체 10g 해당량)
- Acetone/dichloromethane (4/96) 50mL → 버림
- Acetone/dichloromethane (45/55) 50mL → 받음

- 밀감검체에만 적용

- Dichloromethane/*n*-hexanee (50/50) 10mL에 재용해
- SPE-CBA(carboxypropyl functional group), 500mg
  n-Hexane 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 10mL (검체 10g 해당량) → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (50/50) 10mL → 버림
- Acetone/dichloromethane (5/95) 5mL → 받음

- Acetonitrile/water (5/95) 4mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5㎛) 또는 이와 동등한 것
칼람온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (5/95, v/v)에서 acetonitrile/물 (40/60, v/v)으로 35분간 직선적으로 농도 구배한다.
이동상 유속 : 1 mL/min
검출파장 : 258 nm
검체 주입량 : 40 ㎕
분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Acetamiprid	0.02	Imidacloprid	0.02
Clothianidin	0.02	Thiacloprid	0.03
Dinotefuran	0.02	Thiamethoxam	0.02

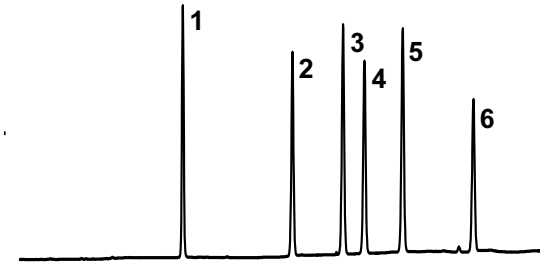


그림 1. 고속액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램.

1, dinotefuran (9.1분); 2, thiamethoxam (15.3분); 3, clothianidin (18.1분);
4, imidacloprid (19.3분); 5, acetamiprid (21.5분); 6, thiacloprid (25.4분), 각 20 ng 주입.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS, single 또는 triple quadrupole analyzer 부착형
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 혼합액 (5/95, v/v)에서 acetonitrile/물 혼합액 (40/60, v/v)으로 35분간 직선적으로 농도 구배한다.
이동상 유량 : 0.2 mL/min
검체 주입량 : 10 μL
이온화 : ESI positive-ion mode
Capillary temperature : 330℃
Cone voltage : 77 V
분자량 범위 : 100~350
측정법 : selected-ion monitoring (SIM)법

표 1. LC-MS SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Acetamiprid	18.4	222	223
Clothianidin	15.1	249	250
Dinotefuran	6.5	202	203
Imidacloprid	16.3	255	256
Thiacloprid	22.1	252	253
Thiamethoxam	12.4	291	292

6) 분석법 해설

- 대상성분들은 neonicotinoid계 살충제로서 log P_{ow} 값이 -0.64~1.60의 범위를 나타내어 비교적 극성이 크고 증기압이 1×10^{-6} μPa이하인 비휘발성 화합물이다. 또한 분자구조로부터 pKa 값이 비교적 클 것으로 예상되는 중성화합물로서 이온억압조건이 아닌 단순 역상 HPLC를 적용하는 것이 가능하다.

- 각 화합물별로 최대흡광파장이 242~270 nm로 다소 상이하나 화합물별 감도 저하를 최소화하여 258 nm를 단일 측정파장으로 설정한다.

- 검체의 추출에는 분석 대상농약들이 일상적 조건에서 해리하지 않는 중성의 극성이 다소 높은 화합물들임을 감안하여 acetonitrile/water 혼합액을 사용한다.

- 액-액 분배법 중 acetonitrile 추출액을 농축하지 않고 saline water로 희석한 후 직접 비극성 용매로 분배하는 방법은 *n*-hexane으로 분배할 경우 전 대상성분이 분배되지 않으며 보다 극성이 높은 dichloromethane으로 분배하더라도 그 분배효율은 40~100% 범위로 일부 화합물의 분배효율이 불량하다. 따라서 분배효율을 높이기 위하여 추출액을 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 수용액 층으로부터 분배하는 방법을 채택한다. *n*-Hexane 분배로는 농축 수용액으로부터 대상성분들을 여전히 회수할 수 없어 세척용으로 사용이 가능하고 dichloromethane으로 분배하면 전 대상성분을 90% 이상의 우수한 회수율로 분배할 수 있다.

- Silica gel과 Florisil column chromatography 정제법을 비교하면 Florisil에서 불순물의 간섭정도가 최소로 나타난다. 감귤검체에서는 Florisil column chromatography 정제법을 적용하여도 일부의 간섭이 관찰되나 SPE-CBA 정제과정을 추가함으로써 방해물질을 모두 제거할 수 있다. 농산물 검체의 최종 정제액은 그 정제정도가 높아 평탄한 baseline을 나타내며 HPLC column을 오염시키지 않아 연속적으로 검체를 주입 하는 것이 가능하다.

- 대표 농산물 11종의 무처리 검체에 대상성분들을 각각 2수준 3반복으로 처리하고 상기 검체조제 및 기기분석과정을 수행하여 회수율을 산출한 결과, 분석성분, 처리수준 및 농산물 검체종류에 관계없이 회수율 및 분석오차는 잔류분석기준인 70~120% 범위와 10%이내를 만족한다. 무처리 검체에서 성분별 분석에 간섭하는 방해물질은 관찰되지 않으며 정량한계는 0.02~0.03 mg/kg 수준이다.

- Neonicotinod계 대상성분은 LC-MS로 재확인할 때 electrospray ionization (ESI) mode에서 positive ion으로 용이하게 이온화된다. 가장 감도가 높은 이온은 $(M+H)^+$ 이온이며 분자량 정보를 확실하게 나타내므로 SIM은 $(M+H)^+$ 이온으로 재확인한다.

표 2. 농산물 중 회수율 및 정량한계

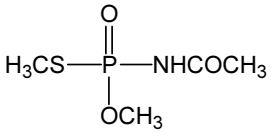
화합물	처리농도 (mg/kg)	회수율 (%)					정량한계 (mg/kg)
		쌀	감자	사과	밀감	포도	
Acetamiprid	0.2	88.5±2.8	90.0±1.4	90.1±1.0	83.7±4.6	89.8±7.9	0.02
	1.0	93.4±1.6	94.4±1.2	93.7±2.1	89.0±2.5	85.0±2.1	
Clothianidin	0.2	92.7±2.1	93.2±1.2	94.2±1.1	88.4±3.0	93.9±3.8	0.02
	1.0	96.6±0.8	96.2±1.1	96.9±2.4	93.9±3.1	92.9±1.5	
Dinotefuran	0.2	86.2±2.1	86.4±1.0	86.9±1.2	73.6±2.5	88.8±1.8	0.02
	1.0	91.3±0.6	89.8±0.7	89.8±1.8	82.5±1.5	88.8±0.6	
Imidacloprid	0.2	97.2±2.1	94.1±1.9	95.7±1.5	92.5±3.8	90.4±7.2	0.02
	1.0	98.9±0.3	98.2±0.7	97.7±2.3	96.9±3.9	86.1±2.3	
Thiacloprid	0.4	87.0±2.1	88.1±1.1	91.9±0.8	81.5±4.2	85.5±8.3	0.03
	2.0	88.4±4.3	90.3±0.7	91.9±2.5	82.9±7.5	80.3±3.7	
Thiamethoxam	0.2	86.4±4.6	87.7±3.0	88.0±0.9	77.2±3.5	87.2±6.9	0.02
	1.0	94.0±0.8	93.5±1.5	92.9±2.2	92.8±1.0	83.9±1.8	

8.3.3 잔류농약 분석법 4.1.3.8

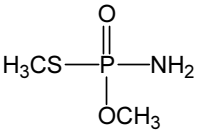
아세페이트(Acephate), 메타미도포스(Methamidophos), 모노크로토포스(Monocrotophos), 오메토에이트(Omethoate) 및 바미도티온(Vamidothion)

1) 대상 농약의 특성

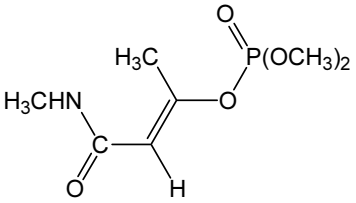
- 분자구조



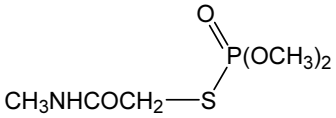
Acephate



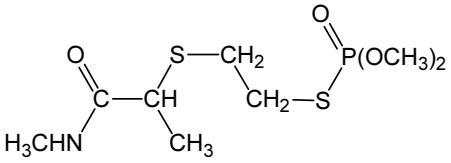
Methamidophos



Monocrotophos



Omethoate



Vamidothion

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Acephate	*O*,*S*-dimethyl acetylphosphoramidothioate
Methamidophos	*O*,*S*-dimethyl phosphoramidothioate
Monocrotophos	dimethyl (*E*)-1-methyl-2-(methylcarbamoyl)vinyl phosphate
Omethoate	*O*,*O*-dimethyl *S*-methylcarbamoylmethyl phosphorothioate
Vamidothion	*O*,*O*-dimethyl *S*-2-(1-methlcarbamoylethylthio)ethyl phosphorothioate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Acephate	$C_4H_{10}NO_3PS$	183.2	183.0
Methamidophos	$C_2H_8NO_2PS$	141.1	141.0
Monocrotophos	$C_7H_{14}NO_5P$	223.2	223.1
Omethoate	$C_5H_{12}NO_4PS$	213.2	213.0
Vamidothion	$C_8H_{18}NO_4PS_2$	287.3	287.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Acephate	-0.89	790000 (20℃)	0.23 (24℃)	비해리성
Methamidophos	-0.8	〉200000	2.3 (20℃)	비해리성
Monocrotophos	-0.22	섞임	0.29 (20℃)	비해리성
Omethoate	-0.74	섞임	3.3 (20℃)	비해리성
Vamidothion	-0.18*	섞임.	-	비해리성

* 예측치

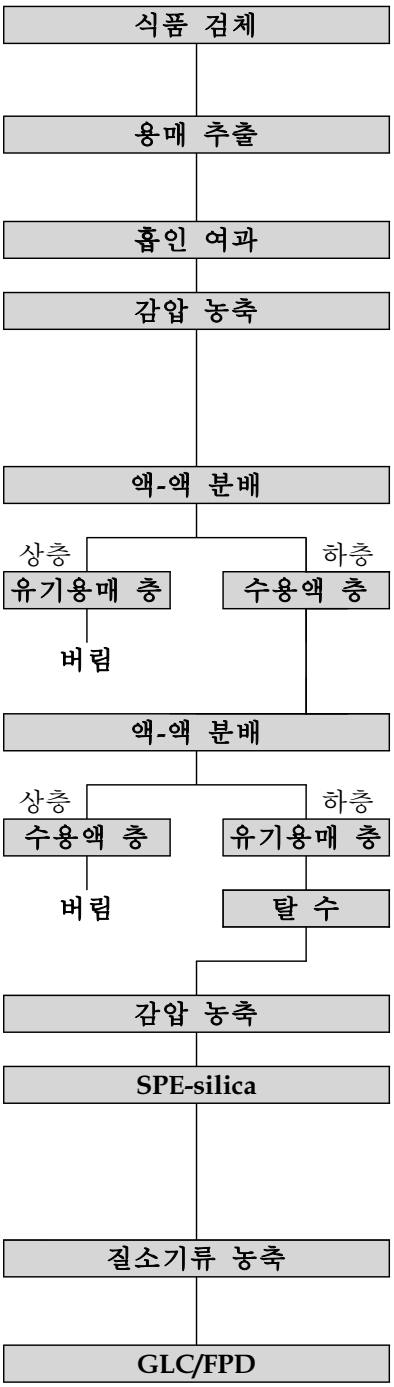
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Acephate	0.03	0.03	2.0~5.0	0.1~10.0	0.5~3.0	0.1~2.0	0.5
Methamidophos	0.004	0.5	0.5~1.0	1.0~2.0	0.05	0.1	0.05
Monocrtophos	0.0006	0.05	0.2~1.0	0.05~1.0	0.05	0.1	0.05
Omethoate	0.0003	0.01	0.01~0.4	0.01~0.1	0.01	-	0.01
Vamidothion	0.008	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 acetonitrile/물 혼합액을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 과량의 sodium chloride를 가한 후 *n*-hexane 추출하여 버린다. 수용액 층을 분액여두에 옮겨 dichloromethane으로 분배 추출하고 silica gel column chromatography에 의하여 정제한다. 감귤 검체의 경우에는 SPE-CBA (carboxypropyl)로 추가 정제하며 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 콩류의 경우 20mL의 물을
- 가하여 10분간 습윤화.

- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출

- 40℃에서 acetone 증발
- NaCl 7g을 첨가한 25mL 용량플라스크에 옮겨 물로 눈금을 채우고 혼합
- 20mL (검체 20g 해당량)을 취함

- 250mL 용량의 분액여두

- *n*-Hexane 50mL로 분배 추출하여 버림.

- Acetone/dichloromethane (50/50) 50mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃
- Dichloromethane 5mL에 재용해

- SPE-silica 1000mg (6mL 용량의 카트리지)
- 10mL dichloromethane (activation) → 버림
- 검체용액 5mL + dichloromethane 2mL → 버림
- Acetone/dichloromethane (15/85) 10mL → 버림
- Acetone/dichloromethane (50/50) 10mL → 받음

- 40℃, 질소 기류
- Acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 인용 간섭필터, 파장 526 mn
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : methamidophos 115℃, acephate 140℃, monocrtophos 및 omethoate 170℃, vamidothion 215℃
주입부 온도 : 220℃
검출기 온도 : 230℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Acephate	0.02	Omethoate	0.02
Methamidophos	0.02	Vamidothion	0.04
Monocrotophos	0.02		

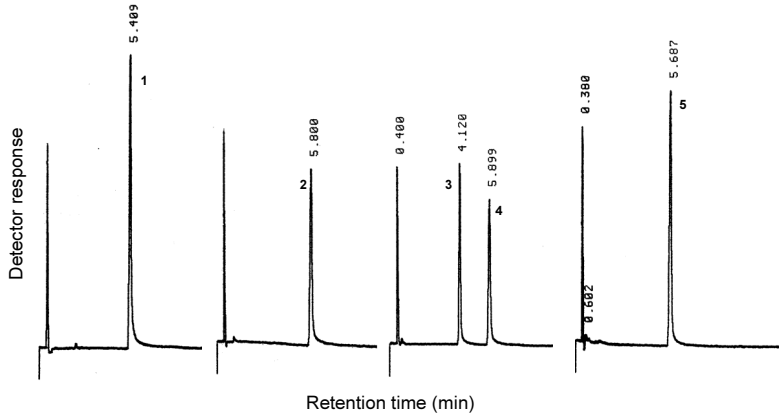


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램

1, methamidophos (5.4분) 2 ng; 2, acephate (5.8분) 2 ng; 3, omethoate (4.1분) 2 ng; 4, monocrtophos (5.9분) 2 ng; 5, vamidothion (5.7분) 4 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-17MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 260℃에서 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 220℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 2.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 : 50~300

표 1. GC-MS 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Acephate	16.4	183	136, 94, 125, 79
Methamidophos	13.3	141	141, 94, 126, 111
Monocrtophos	19.6	223	127, 192, 109, 97
Omethoate	18.7	213	156, 110, 181, 141, 126, 95
Vamidothion	24.6	287	145, 87, 109, 125

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 acephate, methamidophos, monocrotophos, omethoate 및 vamidothion은 일반적 유기인계 농약에 비하여 극성이 매우 높은 화합물들이다. 따라서 일반적 유기인계 농약을 분석하는 식품공전 4.1.2.2번의 다성분 분석법으로는 회수율 및 재현성이 불량하다. 즉, log P_{ow} 값이 -0.89~0.12이므로 일반적 유기인계의 log P_{ow} 값인 2~5에 비하여 매우 극성이 높아 극성/비극성 용매간 분배 과정에서의 효율적 회수가 어렵다. 또한 vamidothion을 제외한 4개 성분의 증기압이 100 mPa를 초과하여 타 농약과의 머무름 시간을 조절하는 것이 어려우며 빠른 용출로 인하여 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성이 높다. 아울러 다성분 GLC 법에서 채용하는 temperature programming 조건에서 열분해나 흡착에 의한 재현성 불량이 문제점으로 지적되고 있다.

- 대상 화합물들의 극성이 높다는 점에도 불구하고 HPLC에서의 검출 감도가 낮아 GLC를 이용하여 분석한다. 대상 화합물들의 분자구조 내에 모두 인을 함유하고 있으므로 GC 검출기 중 NPD와 FPD(P)가 모두 사용가능하나 선택성 및 재현성이 보다 우수한 FPD(P)를 채용하는 것이 유리하다. 대상성분들의 극성이 높은 점을 감안하여 tailing 현상을 최소화하고자 polar phase인 DB-17 등을 채용하여야 한다.

- 대상 화합물들의 증기압에 따른 머무름 시간 차이가 과다하여 동시 분석을 위해서는 승온조건이 요구되나 이 조건은 이미 기존 다성분 분석법에서 그 재현성이 불량하다고 알려져 있다. 따라서 개별 분석법의 요구조건상 분석결과의 재현성을 극대화하기 위하여 분리용 column으로 내경이 0.53 mm인 capillary column을 등온조건을 사용하며 검체주입도 packed inlet에 직접 주입하는 방법을 이용한다.

- 농산물 검체로부터 극성 유기인계 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용하였다. Acetone은 US FDA법이나 AOAC법에서 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매로서 이미 많은 연구자들에 의하여 유기인계 및 카바메이트계 농약 뿐만 아니라 유사 특성의 극성농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다.

- 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위한 액-액 분배법에서 acetone 추출액을 농축하지 않은 상태로 물로 희석하고 NaCl 등을 첨가하여 dichloromethane으로 직접 분배하는 방법은 극성 유기인계 성분들에 대한 분배효율이 0~43%로 저조하여 사용할 수 없다. 따라서 추출용매인 acetone을 증발, 제거하고 NaCl 등을 포화시켜 ionic strength를 최대로 증대시킨 조건에서 acetone/dichloromethane(50/50, v/v)으로 3회 분배하였을 때 모든 대상 농약을 우수한 분배효율로 회수할 수 있다. 이러한 분배조건에서 *n*-hexane으로 추출하였을 때는 분석 대상성분이 전혀 추출되지 않았으므로 *n*-hexane으로 분배하여 비극성 간섭물질들을 효과적으로 세척, 제거하는 과정이 가능하다.

- 액-액 분배만으로는 기기분석을 위한 검체 추출액의 정제 정도가 미흡하여 추가 정제를 위한 흡착크로마토그래피법은 잔류농약 분석에서 간섭물질 제거법으로 가장 많이 사용하는 방법이다. 흡착제로는 화합물들의 극성이 높은 점을 감안하여 용출성이 우수한 silica gel을 사용하며 acetone/dichloromethane의 용매체계를 이용하여 acetone/dichloromethane (50/50, v/v)의 혼합액에서 모든 분석성분들을 용출시킬 수 있다. 액-액 분배과정에서 *n*-hexane 세척과정에 의하여 불순물의 양이 크게 감소하였으므로 추출물이 가장 많은 현미검체 25 g에 해당하는 검체추출물을 적용하더라도 overloading 현상은 관찰되지 않는다.

- 무처리 검체 추출액 중 대상 분석성분 부근에 검체 중 불순물에 의한 간섭은 전혀 관찰되지 않으며 기기분석을 위한 최종용액은 그 정제정도가 우수하여 연속 주입, 분석이 가능하다.

- 이 분석법을 이용하였을 때, 분석성분, 처리수준 및 농산물 검체종류에 관계없이 회수율 및 분석오차는 잔류분석기준인 70~120% 범위와 10%이내를 만족한다. 분석법의 정량한계는 0.02~0.04 mg/kg 수준이다.

- 대상 화합물들의 잔류분은 GC-MS SIM을 이용하여 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다. 분석 대상성분을 GC-MS로 재확인할 때 monitoring 하는 SIM channel의 수를 과다하게 설정하면 신호/잡음비가 낮아져 일상적 분석법과 대등한 감도에서 재확인과정을 수행할 수 없다. 따라서 성분별 SIM channel 설정 수는 3개 이내로 제한하는 것이 적정 감도를 위하여 필요하다. 또한 molecular ion의 relative abundance가 낮아 SIM에 분자이온을 포함시킬 수 없으므로 분자구조에 따른 정성 확인율을 유지하기 위해서는 적어도 2개 fragment ion을 monitoring 하는 것이 필수적이다.

표 2. 농산물중 회수율 및 정량한계

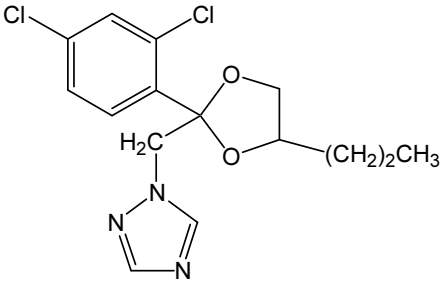
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)					정량한계 (mg/kg)
		쌀	감자	배추	사과	밀감	
Methamidophos	0.2	100.2±9.7	95.1±5.1	94.7±9.3	99.1±6.2	74.7±2.6	0.02
	1.0	88.4±4.2	94.6±7.2	90.7±7.3	101.1±9.7	77.1±6.5	
Monocrtophos	0.2	94.7±9.7	101.1±5.6	90.3±8.3	100.3±2.9	78.0±6.2	0.02
	1.0	96.8±8.1	95.3±8.3	100.3±5.9	100.8±8.5	79.8±4.7	
Vamidothion	0.4	97.6±3.0	105.6±1.8	79.9±1.3	105.2±4.9	76.7±4.8	0.04
	2.0	94.3±7.6	105.5±2.5	88.6±7.3	99.8±2.7	76.1±5.7	
Acephate	0.2	100.3±6.9	96.4±5.4	84.8±7.2	101.1±5.6	75.9±3.7	0.02
	1.0	94.3±6.9	99.3±5.6	83.1±6.0	100.7±7.4	75.1±2.5	
Omethoate	0.2	90.4±2.3	97.3±2.3	99.9±7.3	96.3±2.3	78.2±0.2	0.02
	1.0	95.2±5.1	93.5±1.4	98.8±2.8	101.6±7.5	76.7±3.3	

8.3.4 잔류농약 분석법 4.1.3.9

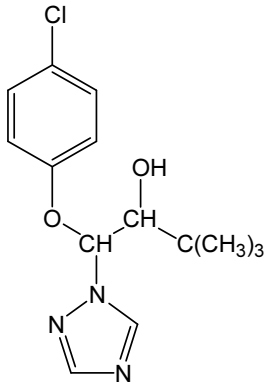
트리아디메놀(Triadimenol) 및 프로피코나졸(Propiconazole)

1) 대상 농약의 특성

- 분자구조



Propiconazole



Triadimenol

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Propiconazole	(±)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1*H*-1,2,4-triazole
Triadimenol*	(1*RS*,2*RS*;1*RS*,2*SR*)-1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol

* (1*RS*,2*SR*) 및 (1*RS*,2*SR*)의 부분입체이성질체가 약 7:3의 비율로 존재.

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Propiconazole	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	342.2	341.1
Triadimenol	$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$	295.8	295.1

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Propiconazole	3.72	100	$2.7\times^{-2}$ (20℃)	1.09 (짝산)
Triadimenol	3.08~3.28	33~62	$4.0\sim6.0\times10^{-4}$ (20℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Propiconazole	0.07	0.05~1.0	0.05~1.0	-	-	0.05	-
Triadimenol	0.03	0.05	0.2~0.5	0.3~3.0	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 propiconazole 및 triadimenol을 동시에 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 곡류 및 콩 등 유지검체의 경우는 분배 전에 응고법으로 유지를 제거한다. Dichloromethane 추출액을 감압농축하고 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

① 곡류 및 콩류

식품 검체 (곡류 및 콩류) - 검체 10g에 물 20mL를 가한 후 2시간 동안 습윤화.

↓

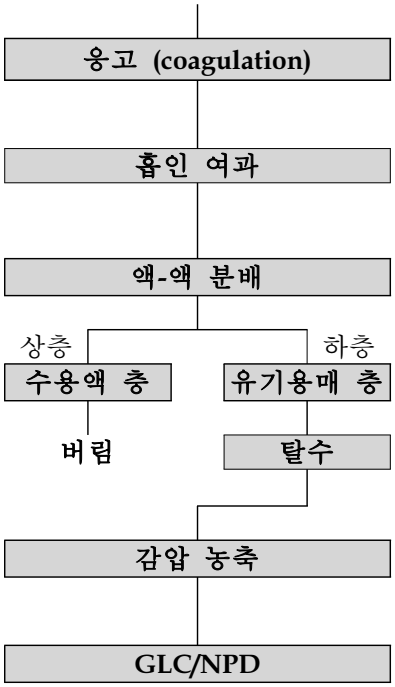
용매 추출 - Acetone 100mL × 2회 추출
- 각 3분간 고속 마쇄 추출

↓

흡인 여과 - 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용

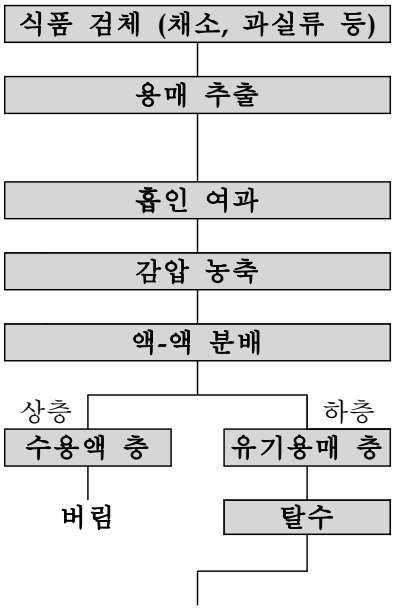
↓

감압 농축 - 40℃에서 약 50mL로 농축

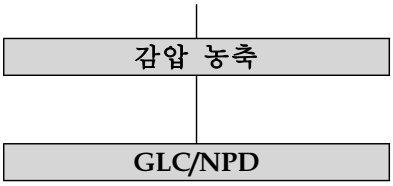


- Phosphoric acid 1mL + 5% lead acetate 100mL
- 15분간 간헐적으로 혼합하면서 방치
- 여과보조제 사용, 물 10mL로 최종 세척하여 합함
- 1N NaOH 수용액으로 pH 7로 조절
- NaCl 10g 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- 20g anhydrous sodium sulfate에 통과
- Ethyl acetate 5mL에 재용해

② 채소류, 과실류, 종실류, 견과류 및 호프



- 검체 50g
- Acetone 100mL × 2회 추출
- 각 2분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 50mL로 농축
- 포화 NaCl 수용액 100mL
- Ethyl acetate 100mL × 2회 분배 추출
- 20g anhydrous sodium sulfate에 통과



- Ethyl acetate 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 60℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 270℃에서 7분간 유지한다.
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium (triadimenol이 약 22분에서 유출하는 유속으로 조정하고 air 및 hydrogen의 유량을 최적 조건으로 조정한다)

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약은 triazole계 살균제인 propiconazole 및 triadimenol로 이 중 triadimenol은 자체가 살균제로 사용되나 유사 구조를 가진 triadimefon의 대사산물이기도 하다. 각 성분은 낮은 증기압을 나타내나 화합물의 열에 대한 안정성이 높고 3개 질소원자를 함유하는 triazole 고리를 분자 내에 함유하고 있어 GLC/NPD법으로 분석이 가능하다. Triadimenol과 propiconazole은 분자 내에 2개의 chiral carbon을 함유하고 있어 부분 입체이성질체 (diastereoisomer)의 혼합물 형태로 사용되고 있다. 따라서 분석법은 농약별로 함유된 이성질체를 합한 총량을 기준으로 잔류량을 분석한다.

- Propiconazole은 짝산의 pKa가 1.09로 알려져 있으나 매우 약하게 해리하는 약염기이

으로 비해리성 농약으로 취급하여 분석하여도 무리가 없다. 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone 사용하여 대상 농약들을 추출한다. 액-액 분배는 대상 농약들이 비극성인 점을 감안하여 추출액을 농축하고 이온강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가한 후 비극성 용매인 dichloromethane으로 분배 추출한다.

- 유지 검체는 대상성분들이 물에 대한 용해도를 감안하여 acetone/산 조건에서 물에 난용인 유지를 응집시키는 응고법으로 정제한다. 대상 화합물의 물에 대한 용해도는, 33~100 mg/L이므로 acetone의 양을 다소 증가시킬 경우 응집되지 않고 Celite bed를 통과할 수 있다.

- 이 분석법은 NPD의 선택성을 이용하여 최소한의 검체 정제과정으로 구성되어있다. 따라서 많은 수의 검체를 분석할 경우 분리 column 효율의 저하나 NPD 검출기의 열화가 발생할 수 있으므로 분석기기의 유지 관리가 중요하다.

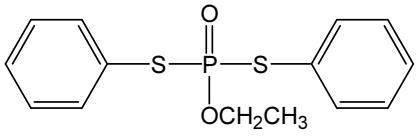
- Triadimenol과 propiconazole 잔류분의 재확인을 위한 GC-MS에서 분자이온의 상대 강도가 높지 않으므로 SIM을 위한 fragment (m/z)는 높은 강도이면서 분자구조를 반영할 수 있는 112, 168, 128 (triadimenol) 및 149, 173 (propiconazole)로 설정한다.

8.3.5 잔류농약 분석법 4.1.3.10

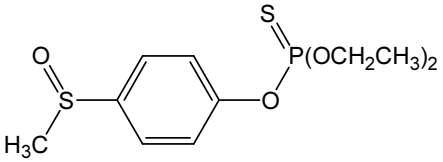
에디펜포스(Edifenphos), 파라티온메틸(Parathion-methyl) 및 펜설포티온(Fensulfothion)

1) 대상 농약의 특성

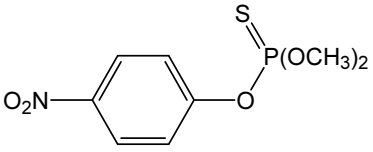
- 분자구조



Edifenphos



Fensulfothion



Parathion-methyl

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Edifenphos	*O*-ethyl *S*,*S*-diphenyl phosphorodithioate
Fensulfothion	*O*,*O*-diethyl *O*-4-methylsulfinylphenyl phosphorothioate
Parathion-methyl	*O*,*O*-dimethyl *O*-4-nitrophenyl phosphorothioate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Edifenphos	$C_{14}H_{15}O_2PS_2$	310.4	310.0
Fensulfothion	$C_{11}H_{17}O_4PS_2$	308.1	308.0
Parathion-methyl	$C_8H_{10}NO_5PS$	263.2	263.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Edifenphos	3.8	56	0.032	비해리성
Fensulfothion	2.23	1540	0.017	비해리성
Parathion-methyl	3.0	55	0.2	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Edifenphos	0.003	0.2	-	-	-	-	-
Fensulfothion	0.003	0.1	0.02~0.05	0.1	0.02	0.02~0.05	0.05~0.1
Parathion-methyl	0.003	1.0	0.01~0.2	0.05~1.0	0.1~1.0	0.1~1.0	0.05~1.0

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 대상성분을 동시에 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 NaCl 수용액을 가한 후 ethyl acetate으로 분배 추출한다. 곡류 및 콩 등 유지검체의 경우는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 추가로 제거한다. 분배액을 감압농축하고 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

식품 검체
- 검체 20g, 곡류, 콩류 및 종실류의 경우 검체 10g에
- 물 20mL 를 가하여 2시간 습윤화.

↓

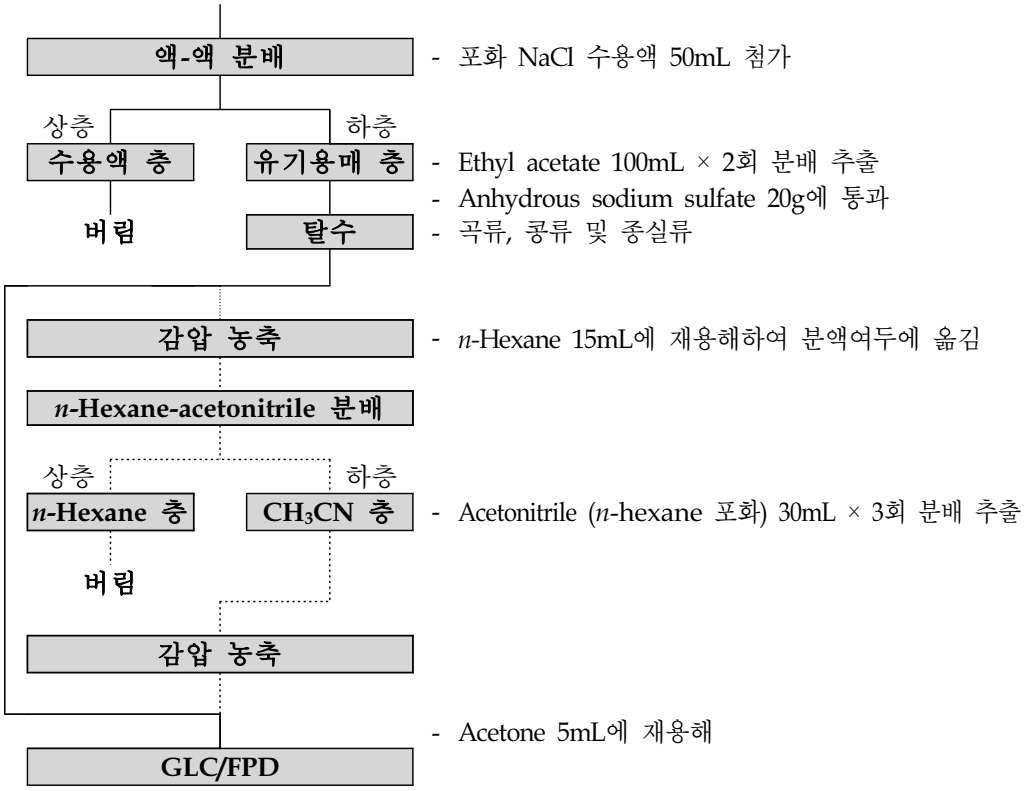
용매 추출
- Acetone 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 2분간 고속 마쇄 추출

↓

원심 분리
- 각 3000rpm, 10분간 분리한 후 상징액을 취함

↓

감압 농축
- 40℃에서 acetone 증발



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 인용 간섭필터, 파장 536 nm
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 10 m, 1.5 μm)
칼럼온도 : 50℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 30℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 170℃에서 1분간 유지한다. 다시 20℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 290℃에서 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 225~250℃
검출기 온도 : 225~250℃
캐리어가스 및 유량 : helium (edifenphos가 약 9분 20초에서 유출하는 유속으로 조정한다)

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 edifenphos, parathion-methyl 및 fensulfothion은 전형적인 유기인계 살충제 (edifenphos는 벼농사용 살균제)로서 물에 대한 용해도가 낮고 Log P_{ow} 값이 3.0~3.8의 범위인 중간~비극성 화합물들이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매인 acetone을 사용하여 전 대상 농약들을 추출한다. 액-액 분배는 대상 농약들이 중간~비극성인 점을 감안하여 추출액을 농축하고 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가한 후 중간 극성 용매인 ethyl acetate으로 분배 추출한다.

- 이 분석법은 FPD의 고선택성을 이용하여 최소한의 검체 정제과정을 거쳐 분석하도록 설계되어 있다. 따라서 많은 수의 검체를 분석할 경우 분석용 column의 분리 효율이 저하될 수 있다. 따라서 일정 수의 검체를 분석한 후에는 분리용 column의 guard column이나 column 전체를 교체한다.

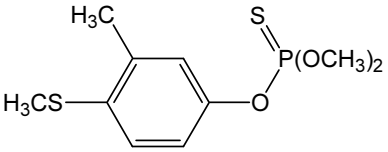
- 대상 화합물들의 잔류분은 GC-MS SIM을 이용하여 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다. 분석 대상성분을 GC-MS로 재확인할 때 monitoring 하는 SIM channel의 수를 과다하게 설정하면 신호/잡음비가 낮아져 일상적 분석법과 대등한 감도에서 재확인과정을 수행할 수 없다. 따라서 성분별 SIM channel 설정 수는 3개 이내로 제한하는 것이 적정 감도를 위하여 필요하다. Edifenphos의 GC-MS SIM을 위한 fragment (m/z)는 109, 310으로 설정한다.

8.3.6 잔류농약 분석법 4.1.3.11

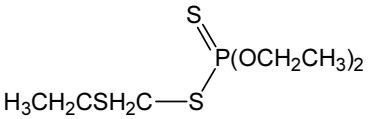
펜치온(Fenthion), 포레이트(Phorate) 및 터브포스(Terbufos)

1) 대상 농약의 특성

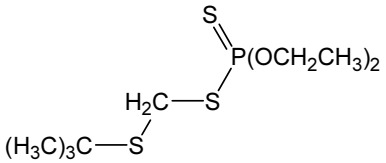
- 분자구조



Fenthion



Phorate



Terbufos

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Fenthion	*O,O*-dimethyl *O*-4-methylthio-*m*-tolyl phosphorothioate
Phorate	*O,O*-diethyl *S*-ethylthiomethyl phosphorodithioate
Terbufos	*S*-tert-butythiomethyl *O,O*-diethyl phosphorodithioate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Fenthion	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	278.3	278.0
Phorate	$C_7H_{17}O_2PS_3$	260.4	260.0
Terbufos	$C_9H_{21}O_2PS_3$	288.4	288.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Fenthion	4.8	4.2 (20℃)	0.74 (20℃)	비해리성
Phorate	3.9	50 (25℃)	85 (25℃)	비해리성
Terbufos	2.8	4.5 (27℃)	34.6 (25℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fenthion	0.007	0.1	0.2~0.5	0.1~0.5	0.1	0.1	0.05
Phorate	0.0007	0.05	-	0.1	0.05	0.05~0.1	0.2
Terbufos	0.0006	0.005~0.01	0.05	0.01~0.05	0.05	0.05	0.01

* 모화합물 및 대사산물 oxon의 산화 대사산물인 sulfoxide 및 sulfone체 포함.

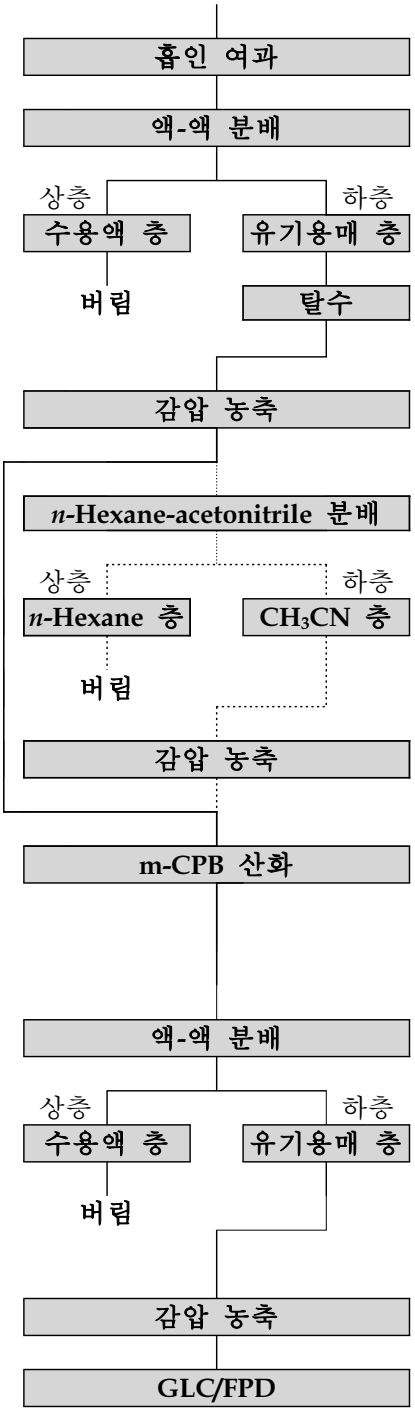
2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄하여 모화합물 및 산화대사산물들을 동시에 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 농축 수용액에 NaCl을 가하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 비극성 간섭물질을 제거한 후 *m*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPB)에 의한 산화과정을 거쳐 전 대상성분을 oxon sulfone 형태로 변환시킨다. 반응액을 포화 sodium sulfite 및 포화 sodium bicarbonate 수용액으로 세척하고 dichloromethane으로 분배 추출한 후 감압농축 건고하고 acetone에 재용해하여 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

식품 검체
- 검체 30g, 곡류 등 건조검체의 경우 물 20mL를 가하여 10분간 습윤화.

용매 추출
- Acetone 100mL로 추출
- 2분간 고속 마쇄 추출



- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- **대두, 쌀, 고추 등 유지 검체**
- *n*-Hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (n-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- Acetone에 녹인 10% polyethylene glycol 50μL 첨가 (keeper 용액)
- 40℃미만
- 10mL dichloromethane에 재용해
- Dichloromethane에 녹인 10% m-chloroperbenzoic acid 용액 3mL 첨가 혼합 후 실온에서 30분 방치
- 반응액을 분액여두에 옮기고 재차 dichloromethane 25mL로 씻어 옮김
- 포화 sodium sulfite 수용액 25mL로 분배하여 버림
- 포화 sodium bicarbonate 수용액 25mL로 분배하여 버림
- Acetone 2mL (terbufos) 및 4mL (fenthion, phorate)에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 인용 간섭필터, 파장 526 nm
분리용 칼럼 : DB-1701 및 DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : fenthion oxon sulfone 220℃, phorate oxon sulfone 190℃, terbufos oxon sulfone 215℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 240℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Fenthion	0.02	Phorate oxon-analog	0.02
Fenthion sulfoxide	0.02	Phorate oxon sulfoxide	0.02
Fenthion sulfone	0.02	Phorate oxon sulfone	0.02
Fenthion oxon-analog	0.02	Terbufos	0.01
Phorate	0.02	Terbufos sulfoxide	0.01
Phorate sulfoxide	0.02	Terbufos sulfone	0.01
Phorate sulfone	0.02		

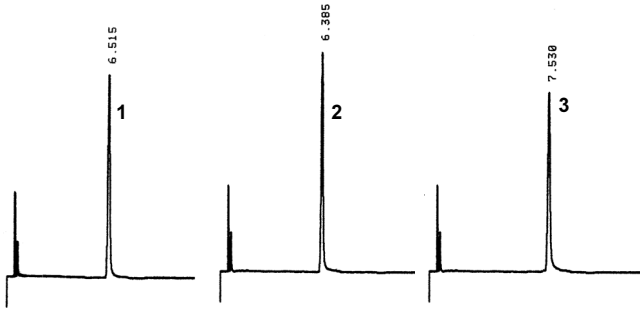


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램 (DB-1701, 0.53 mm i.d. × 30 m)
1, fenthion oxon sulfone (6.5분); 2, phorate oxon sulfone (6.4분); 3, terbufos oxon sulfone (7.5분), 각 3 ng 주입.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-17MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 40℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 230℃에서 2분간 유지한다. 다시 5℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 260℃에서 2분간 유지한다.
주입부 온도 : 270℃
Interface 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 2.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 : 100~400

표 1. GC-MS 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Fenthion oxon sulfone	15.2	294	294, 215, 279, 230
Phorate oxon sulfone	10.6	276	183, 169, 155, 139, 127
Terbufos oxon sulfone	11.2	304	183, 169, 156, 140, 128

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 fenthion, phorate 및 terbufos 모화합물들은 전형적인 유기인계 살충제로서 물에 대한 용해도가 낮고 log P_{ow} 값이 2.77~4.84의 범위인 비극성 화합물들이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다. 그러나 Codex에서 규정하는 잔류분 정의에 의하면 이들 농약의 살포 후 관찰되는 산화 대사산물들은 그 독성학적 중요성이 인정되므로, 농산물 중 잔류분은 이들 산화대사물을 모두 포함시킨 총 잔류분 기준으로 규제하도록 하고 있다.

- 즉 phorate의 경우를 예시한 바와 같이 모화합물에 추가하여 농약별로 5종의 산화대사산물을 추가로 분석하도록 규정되어 있다. 이들 산화대사산물들은 분자내 thiophosphoryl 이나 thioether group이 산화된 형태이므로 모화합물에 비하여 그 극성이 상당히 높

아 모화합물만을 분석하는 유기인계 농약의 일상적 잔류분석법을 그대로 적용할 수 없다. 따라서 잔류분석법은 농약별로 6종 화합물 (모화합물 및 산화대사산물 5종)들을 개별적으로 분석하는 방법과 이들 6종 성분을 최종산화형태인 oxon sulfone의 단일성분으로 전환, 총량으로 분석하는 방법이어야 한다. 전자의 경우 모화합물과 산화대사산물과의 극성 차이가 크므로 특성에 따라 분리방법이 상이하므로 검체조제 방법이 매우 복잡하다. 후자의 경우 개별 성분의 잔류량은 측정할 수 없으나 허용기준이 총량기준이며 단일 검체조제방법으로 구성될 수 있어 분석법이 실용적이다.

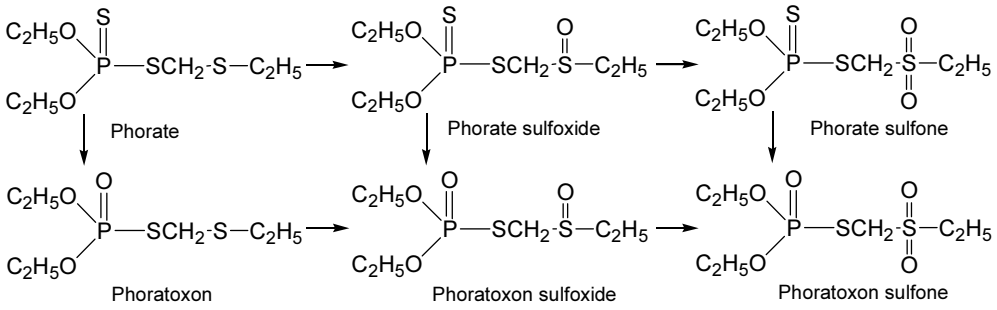


그림 2. Phorate 및 산화대사산물

- 이 분석법에서는 다음과 같은 반응을 이용하여 *m*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPB) 시약으로 대상 화합물들을 최종 산화형태인 oxon sulfone으로 전환, GLC/FPD로 분석한다.

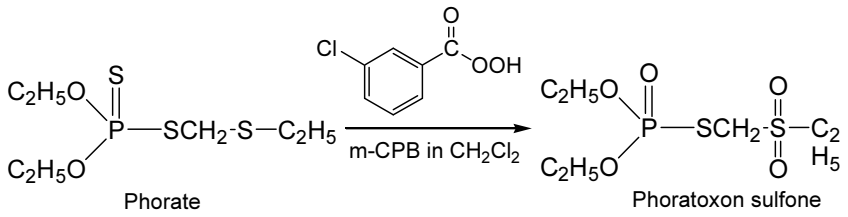


그림 3. Phorate의 최종 산화형태

- 대상 3개 농약 모화합물 및 산화대사산물들의 최종 분석형태인 oxon sulfones는 휘발성이 어느 정도 있는 것으로 알려져 있으므로 GLC로 분석이 가능하다. Oxon sulfone 3종의 분자구조 내에 모두 인을 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD와 FPD (P)가 모두 사용 가능하나 NPD에 비하여 선택성 및 재현성이 우수한 검출기인 FPD (P)가 유리하다. 분리용 column으로는 oxon sulfone 형태가 극성이 상당히 높은 점을 감안하여 중간 또는 극성의 DB-1701 및 DB-17 등이 사용된다.

- 분석 대상 모화합물 및 산화대사산물들을 모두 oxon sulfone 형태로 산화시키기 위하여 *m*-CPB를 사용하는데 각 대상 농약 및 대사산물별로 oxon sulfone으로 전환하기위해 요구되는 산화력은 상이하다. 즉 모화합물은 thiophosphoryl 기 및 thioether 기가 동시에 산화되어야 하는 반면 oxon sulfoxide나 sulfone 대사산물은 thiophosphoryl 기 또는 thioether 기 중 하나만 산화되면 oxon sulfone으로 전환되기 때문이다. 농약 및 대사산물별로 oxon sulfone으로의 전환에 소요되는 *m*-CPB 량은 상이하며 또한 실제 검체에 적용할 경우 검체로부터 추출되는 불순물 중 상당량도 산화반응의 반응물로서 작용하므로 oxon sulfone으로의 전환에 보다 많은 양의 *m*-CPB가 요구된다. 분배과정을 거쳐 나온 추출건조물 대비 2배량의 *m*-CPB를 가하여 산화반응을 시키는 것이 최적조건이다.

- 농산물 검체로부터 극성 유기인계 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위하여 액-액 분배법으로 acetone 추출액을 물로 희석하고 NaCl 등을 첨가하여 *n*-hexane 또는 dichloromethane으로 분배하는 방법은 phorate oxon sulfoxide에 대한 분배효율이 저조하여 사용할 수 없다. 분배효율을 향상시키기 위하여 추출용매인 acetone을 증발, 제거하고 NaCl을 첨가하여 ionic strength를 보다 증대시킨 조건에서 dichloromethane으로 2회 분배하는 것이 필수적이다.

- *n*-Hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 지방이나 왁스의 제거에 주로 이용되는 정제법으로 모든 분석성분은 acetonitrile 추출과정을 2회 수행함으로써 전량 회수가 가능하다. 검체정제과정을 거친 최종용액은 그 정제정도가 우수하여 연속 주입, 분석이 가능하다.

표 2. 농산물중 회수율 및 정량한계

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)					정량한계 (mg/kg)
		현미	콩	감자	사과	고추	
Fenthion	0.2	78.6±8.9	77.1±9.4	73.9±7.2	80.1±5.6	75.9±3.7	0.02
	1.0	75.3±6.9	74.5±5.6	72.3±2.0	79.5±7.4	75.1±2.5	
Fenthion sulfoxide	0.2	73.6±9.7	75.1±5.1	74.6±9.3	80.6±6.2	74.7±2.6	0.02
	1.0	74.8±4.2	78.6±7.2	73.3±7.3	81.2±9.7	77.1±6.5	

표 2. 농산물중 회수율 및 정량한계 (계속)

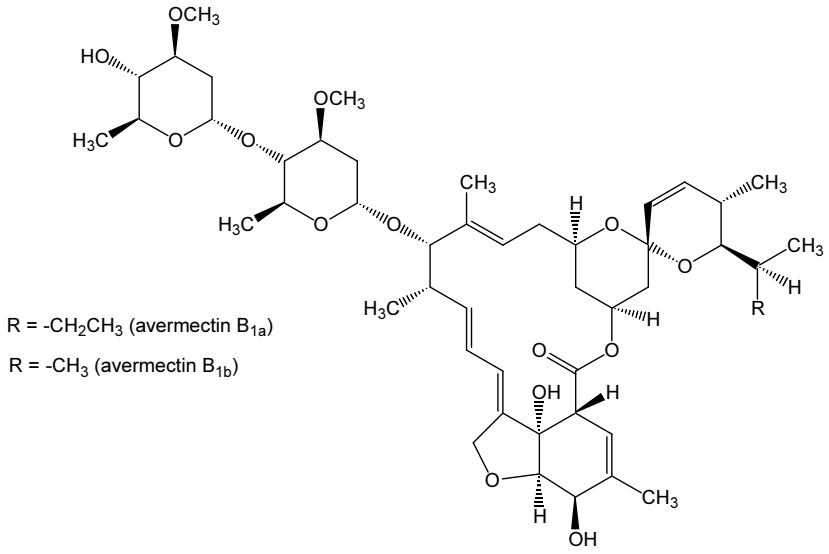
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)					정량한계 (mg/kg)
		현미	콩	감자	사과	고추	
Fenthion sulfone	0.2	79.2±9.7	72.9±5.6	77.4±8.3	74.1±2.9	78.0±6.2	0.02
	1.0	78.3±8.1	73.3±8.3	71.2±5.9	75.6±8.5	79.8±4.7	
Fenthion oxon	0.2	90.4±2.3	97.3±2.3	99.9±7.3	96.3±2.3	78.2±0.2	0.02
	1.0	95.2±5.1	93.5±1.4	98.8±2.8	101.6±7.5	76.7±3.3	
Phorate	0.2	91.3±5.6	93.0±2.1	90.0±2.1	102.6±5.2	99.1±2.4	0.02
	1.0	100.1±2.3	98.9±5.6	95.7±6.3	103.6±4.6	91.7±3.1	
Phorate sulfoxide	0.2	95.2±6.8	90.3±8.0	96.5±7.0	103.2±8.1	100.7±6.1	0.02
	1.0	90.0±4.8	83.2±2.9	85.3±6.0	100.3±2.3	90.0±8.8	
Phorate sulfone	0.2	88.2±8.9	87.0±5.7	90.1±7.8	98.6±7.4	85.6±4.8	0.02
	1.0	95.3±5.6	96.5±5.5	93.0±2.0	96.1±2.9	93.1±2.3	
Phorate oxon	0.2	87.9±0.7	98.7±8.8	95.3±5.2	98.9±7.8	89.6±2.3	0.02
	1.0	95.0±8.8	101.3±9.0	103.5±4.3	105.2±1.3	100.5±9.1	
Phorate oxon sulfoxide	0.2	100.1±5.9	103.2±5.9	102.5±2.6	88.1±6.3	98.2±2.9	0.02
	1.0	105.7±2.2	101.5±4.1	100.1±2.3	89.7±8.8	91.2±5.2	
Phorate oxon sulfone	0.2	87.5±3.2	82.7±8.0	83.5±8.9	100.0±5.9	96.4±7.9	0.02
	1.0	94.5±6.9	91.0±2.1	90.3±5.8	107.1±2.1	92.9±4.1	
Terbufos	0.1	82.5±1.6	94.9±5.9	104.3±3.8	98.4±0.3	96.4±7.8	0.01
	1.0	87.6±5.8	94.5±0.6	93.3±5.1	98.2±1.2	88.7±5.1	
Terbufos sulfoxide	0.1	84.4±0.9	88.8±2.1	95.2±2.9	89.4±2.1	98.0±2.2	0.01
	1.0	80.9±7.0	82.6±1.2	93.2±1.6	82.4±0.5	87.2±3.6	
Terbufos sulfone	0.1	77.3±2.9	90.4±3.4	93.4±1.7	95.7±2.3	94.5±0.2	0.01
	1.0	77.8±2.3	88.1±4.0	92.3±0.7	83.0±0.5	86.4±2.4	

8.3.7 잔류농약 분석법 4.1.3.12

아바멕틴(Abamectin), 밀베멕틴(Milbemectin)

1) 대상 농약의 특성

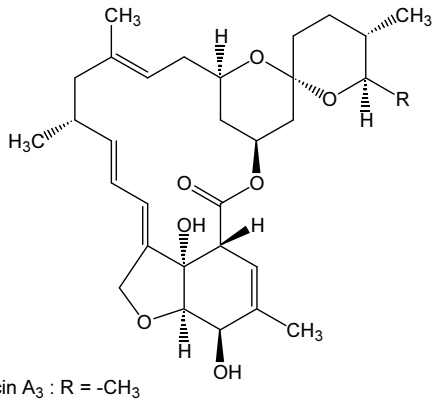
- 분자구조



R = -CH_2CH_3 (avermectin B_{1a})

R = -CH_3 (avermectin B_{1b})

Abamectin



milbemycin A_3 : R = -CH_3

milbemycin A_4 : R = -CH_2CH_3

Milbemectin

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Abamectin*	A mixture of (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*S*,6'*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-6'-[(*S*)-sec-butyl]-21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.$1^{4,8}$.$0^{20,24}$]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'*H*-pyran)-12-yl 2,6-dideoxy-4-*O*-(2,6-dideoxy-3-O-methyl-α-L-*arabino*-hexopyranoside (B1a) and (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*S*,6'*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-21,24-dihydroxy-6'-isopropyl-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.$1^{4,8}$.$0^{20,24}$]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'*H*-pyran)-12-yl 2,6-dideoxy-4-*O*-(2,6-dideoxy-3-*O*-methyl-α-L-*arabino*-hexopyranosyl)-3-*O*-methyl-α-L-*arabino*-hexopyranoside (B1b)
Milbemectin*	A mixture of (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,13*R*,20*R*,21*R*,24*S*)-21,24-dihydroxy-5',6',11,13,22-pentamethyl-3,7,19-trioxatetracyclo [15.6.1.$1^{4,8}$.$0^{20,24}$]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-2-one (A3) and (10*E*,14*E*,16*E*,22Z)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,13*R*,20*R*,21*R*,24*S*)-6'-ethyl- 21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-3,7,19-trioxatetracyclo [15.6.1.$1^{4,8}$.$0^{20,24}$] pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'tetrahydropyran-2-one (A4)

* Abamectin은 B1a와 B1b의 4:1 혼합물, milbemectin은 A3와 A4의 3:7 혼합물.

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Abamectin B1a	$C_{48}H_{72}O_{14}$	873.1	872.5
Abamectin B1b	$C_{47}H_{70}O_{14}$	859.1	858.5
Milbemectin A3	$C_{31}H_{44}O_7$	528.7	528.3
Milbemectin A4	$C_{32}H_{46}O_7$	542.7	542.3

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Abamectin	4.4	0.007~0.01	$<3.7\times10^{-3}$ (25℃)	비해리성
Milbemectin	5.3~5.9	0.88~7.2	$<1.3\times10^{-5}$ (20℃)	비해리성

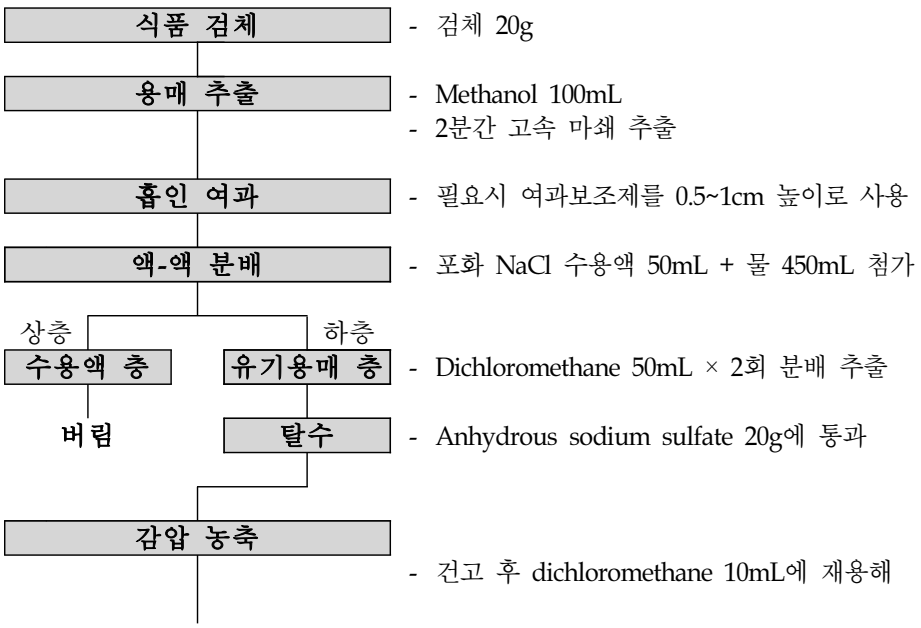
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

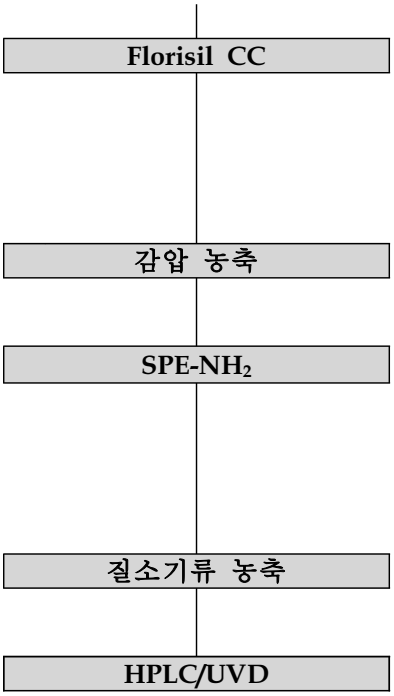
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Abamectin	0.002	-	0.02~0.1	0.01~0.1	-	-	-
Milbemectin	0.03	-	0.05~0.2	0.05~1.0	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 methanol을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography 및 SPE-NH_2 (aminopropyl) 법으로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Florisil 5g (내경 11mm)
- Dichloromethane 50mL (pre-washing) → 버림
- Dichloromethane 추출액 10mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (10/90) 50mL → 버림
- Methanol/ethyl acetate (0.5/99.5) 50mL → 받음

- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해

- SPE-NH_2 (aminopropyl) 500mg 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Toluene 3mL + dichloromethane 5mL → 버림
- Acetone/dichloromethane (20/80) 6mL → 받음

- 40℃ 질소기류 하에서 농축 건고
- CH_3CN/methanol/water (52.5/22.5/25) 2mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (3.9 mm i.d. × 150 mm, 4 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/methanol/물 (52.5/22.5/25, v/v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 246 nm
분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)		대상성분	정량한계 (mg/kg)	
	사과, 감귤	고추, 배추		사과, 감귤	고추, 배추
Abamectin B1a	0.003	0.005	Milbemectin A3	0.003	0.005
Abamectin B1b	0.003	0.005	Milbemectin A4	0.003	0.005

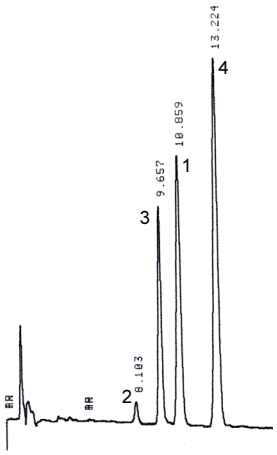


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램

1, abamectin B1a (10.9분) 18.8 ng; 2, abamectin B1b (8.1분) 1.2 ng; 3, milbemectin A3 (9.7분) 8.5 ng; 4, milbemectin A4 (13.2분) 19.5 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 ㎛) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
이온화 : Electrospray ionization (ESI) negative-ion mode
주입량 : 10 ㎕
분자량 범위 : 300~1000

표 1. LC-MS 분석을 위한 ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Abamectin B1b	8.0	858	857
Abamectin B1a	9.8	872	871
Milbemectin A3	10.6	528	527
Milbemectin A4	13.6	542	541

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약은 방선균 *Streptomyces avermitilis*의 대사산물인 avermectins로부터 유도된 macrocyclic lactone 화합물 계통의 살응애제이다. Abamectin과 milbemectin은 만성독성이 강하다고 알려져 있고 최대잔류허용량이 0.01~1.0 mg/kg으로 매우 엄격하게 설정되어 있어 수확물 중 매우 낮은 잔류수준까지 분석하여야 하는 어려움이 있다.

- 현재까지 보고된 개별적 잔류분석법으로는 abamectin에 대하여 HPLC를 이용, 자외흡광 또는 형광검출법으로 분석하는 방법들이 있다. 자외흡광검출법의 경우 원 화합물의 형태로 분석되며 우수한 회수율과 재현성의 장점이 있으나 검출한계가 0.05 mg/kg 수준으로 분석 감도가 낮아 현재 적용되고 있는 허용기준을 만족시킬 수 없다. 형광검출법의 경우 그 검출한계는 0.5 μg/kg의 수준으로 잔류허용기준 준수여부를 판정하기에 충분한 감도를 나타내나 그 분석과정이 너무 복잡하고, 유도체 반응의 재현성이 낮아 분석오차가 잔류농약분석법 기준을 초과하는 단점이 있다. 또한 유도체 시약들이 수분에 매우 민감하여 사용 및 관리에 어려움이 있다. 따라서 유도체 반응을 거치지 않고 원래 화합물 형태로 직접 자외흡광검출기를 이용해서 abamectin과 milbemectin의 잔류분을 평가할 만큼의 충분한 감도를 나타내도록 분석법이 새로이 설계, 확립되었다.

- Abamectin 및 milbemectin은 각각 B1a 및 Bib 그리고 A3와 A4 유사성분들의 혼합물이므로 대상성분은 총 4종이며 HPLC C_{18} column에서 baseline 분리가 가능하다. 이때 사용하는 C_{18} column별로 이동상 조성에 따라 머무름시간이 상당한 변동을 나타낸다. 즉 methanol/물 및 acetonitrile/물 조성에 따라 화합물별로 머무름 특성의 변동 폭이 다르므로 각 용매의 조성을 조절, 최적 분리한다.

- 대상 농약은 살응애제이므로 분석법의 대상 검체는 과실 및 채소류이며 이들 검체군은 함수율 70% 이상이고 지방함량이 2% 미만인 농산물에 해당한다. 이러한 고함수율/저지방검체로부터 대상성분을 추출하기 위해서는 기존 다성분 분석법에서 비극성 농약의 추출에 많이 사용하는 용매로 methanol을 사용한다.

- 분배법으로는 기존 abamectin 분석법과는 달리 분석조작을 간편하게 하기 위하여 농축과정을 생략하여 직접 분배한다. 분배용매로는 dichloromethane을 사용하며 *n*-hexane을 사용할 경우 abamectin의 회수율이 떨어진다. Dichloromethane 분배과정에 의하여 검체 중 수용성 극성 방해물질은 대부분 제거되나 비극성 간섭물질은 제거되지 않으며 정량한계를 향상시키기 위해서 추출액의 고농축이 요구되므로 추가적인 정제과정은 필수적이다.

- 흡착크로마토그래피법에서 흡착제로는 Florisil이 silica gel 보다 불순물 제거율이 우수하다. Abamectin과 milbemectin은 분자구조 내에 각각 3개 및 2개의 alkyl hydroxyl기를 보유하고 있으므로 SPE-NH_2를 사용하면 머무름 시간이 비극성 간섭물질에 비하여 상대적으로 길어 간섭물질과의 분리가 명확하게 이루어진다..

- 정제과정이 완료된 검체용액에서 대상 분석성분 부근에 검체 중 불순물에 의한 간섭은 전혀 관찰되지 않았으며 기기분석을 위한 최종용액은 그 정제정도가 우수하여 연속주입, 분석이 가능하다.

- LC/MS의 electrospray ionization 조건에서 대상성분들은 $(M-H)^-$ 이온이 충분한 intensity로 관찰되었으며 $(M-H)^-$ 이온을 SIM 조건으로 적용할 경우 대부분 정량한계 수준 혹은 더 높은 감도로 재확인이 가능하다.

표 2. 농산물 중 회수율

대상성분	회 수 율 (%)*					
	처리농도 (mg/kg)	사과	감귤	처리농도 (mg/kg)	고추	배추
Abamectin B1a	0.047	86.8±2.8	87.0±6.5	0.094	93.0±3.0	87.4±1.3
	0.235	87.1±1.1	84.8±3.9	0.470	91.7±0.7	91.5±1.2
Abamectin B1b	0.003	-	-	0.006	-	-
	0.015	85.6±3.1	82.1±4.6	0.030	82.9±2.1	77.6±3.2
Milbemectin A3	0.021	98.6±2.2	94.1±6.8	0.042	94.0±5.8	85.9±8.2
	0.105	92.9±0.9	89.6±4.6	0.210	94.7±1.0	91.9±1.0
Milbemectin A4	0.049	91.3±1.8	86.2±3.6	0.098	87.7±2.9	95.4±4.9
	0.245	95.1±1.4	86.9±3.8	0.490	89.3±0.8	88.6±2.0

* 3반복 평균±표준편차

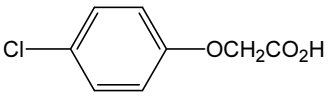
8.3.8 잔류농약 분석법 4.1.3.13

2,4-D(이사디), 디캄바(Dicamba) 및

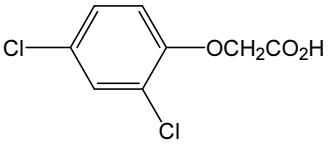
클로로페녹시아세테이트 (4-Chlorophenoxy acetate)

1) 대상 농약의 특성

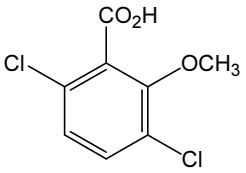
- 분자구조



4-CPA



2,4-D



Dicamba

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
4-CPA	4-chlorophenoxyacetic acid
2,4-D	(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid
Dicamba	3,6-dichloro-*o*-anisic acid

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
4-CPA	$C_8H_7ClO_3$	186.6	186.0
2,4-D	$C_8H_6Cl_2O_3$	221.0	220.0
Dicamba	$C_8H_6Cl_2O_3$	221.0	220.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
4-CPA	2.52	난용	0.024 (25℃)	-
2,4-D	2.58~2.83 (pH 1) 0.04~0.33 (pH 5)	311 (pH 1), 20031 (pH 5) 23180 (pH 7), 34196 (pH 9)	0.019 (25℃)	2.73
Dicamba	-0.55 (pH 5) -1.88 (pH 6.8) -1.9 (pH 8.9)	6600 (pH 1.8), 〉250000 (pH 4.1, 6.8, 8.2)	1.67 (25℃)	1.97

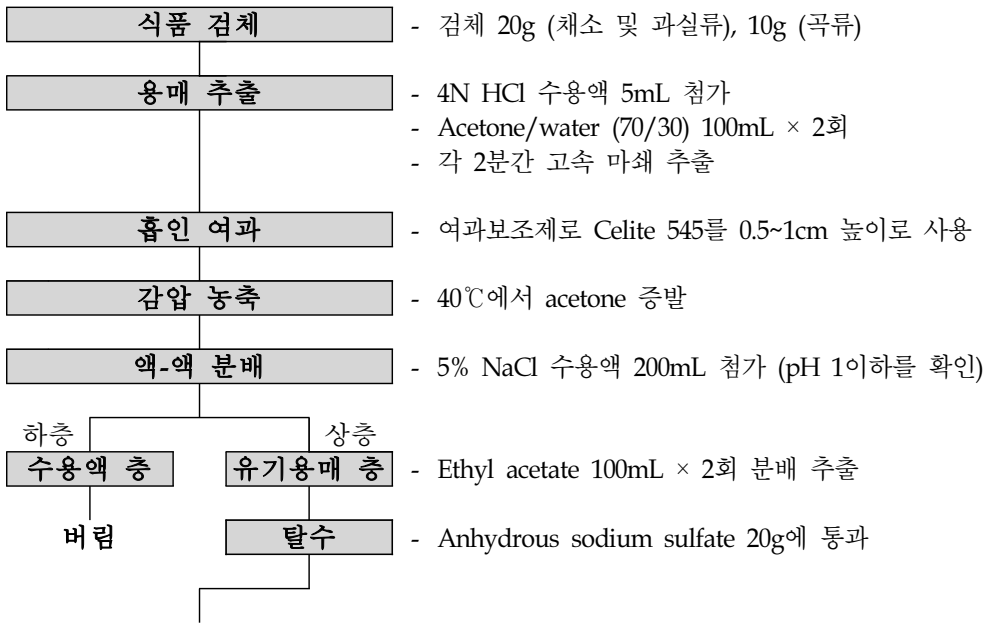
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

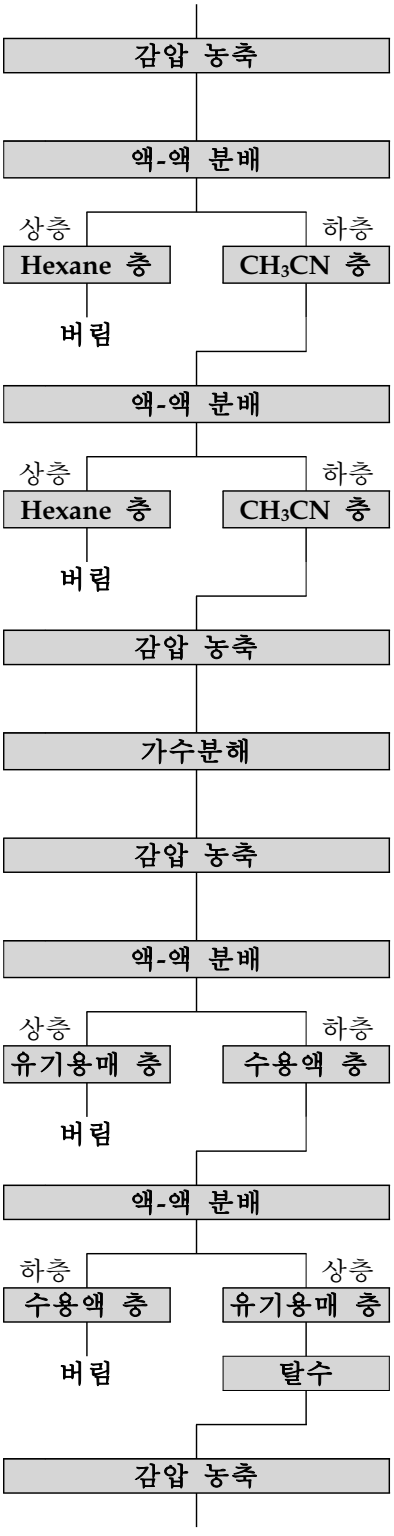
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
4-CPA	0.022	-	-	0.05	-	-	-
2,4-D	0.01	0.05~0.5	0.05~2.0	0.1	0.1	0.1~0.2	0.2
Dicamba	0.03	0.5~3.0	-	3.0	0.05	3.0	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체를 산성화한 후 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 pH 조절에 의한 세척 및 추출과정으로 구성된 ion-associated partition법으로 정제한다. Acid 잔류분을 2,2,2-trichloroethyl ester화한 후 Florisil column chormatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 40℃에서 약 1mL로 농축 후 질소 기류하에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해

- *n*-Hexane 포화 acetonitrile 30mL × 2회 분배 추출

- Acetonitrile 포화 *n*-hexane 50mL로 분배 추출하여 버림

- 40℃에서 약 1mL로 농축 후 질소 기류하에서 증발 건고
- 잔류물을 methanol 20mL에 재용해

- 1.5N NaOH 수용액 10mL 첨가
- 80℃에서 30분간 환류

- 40℃에서 methanol 증발
- 잔류물을 water 10mL + acetone 10mL로 씻어 옮김

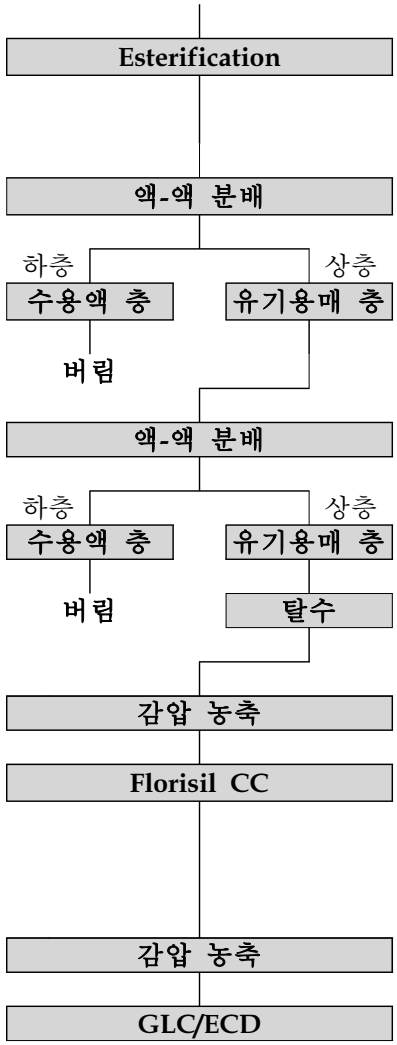
- 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- Ethyl ether 50mL로 분배 추출하여 버림.

- 4N HCl로 pH 1이하로 조절

- Ethyl acetate 50mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃에서 약 1mL로 농축 후 질소 기류하에서 증발 건고



- 2,2,2-Trichloroethanol 1mL + pyridine에 용해한 2% *N,N'*-dicyclohexylcarbodimide (DCC) 0.5mL 첨가 후 밀봉
- 60℃에서 1시간 반응 후 방냉
- 소량의 acetone과 *n*-hexane 50mL로 씻어 분액여두에 옮김
- 2% sodium bicarbonate 수용액 50mL로 추출하여 버림
- 0.5N HCl 수용액 50mL + 물 50mL 첨가
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 약 1mL로 농축
- Florisil 10g (내경 15mm)
- *n*-Hexane 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함
- Benzene/*n*-hexane (30/70) 100mL → 버림
- Benzene/*n*-hexane (50/50) 100mL → 받음
- 40℃에서 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : glass column (2~3 mm i.d. × 100~200 cm)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP, W AW-DMCS 및 gaschrom Q (80~100 mesh) 또는 이와 동등한 것

고정상액체 : 5% QF-1, 5% SE-30, 5% OV-275, 5% XE-60 및 2% DEGS + 0.5% H_3PO_4

칼럼온도 : 180~220℃

주입부 온도 : 200~250℃

검출기 온도 : 250~280℃

캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 20~50 mL/min

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 대상성분들은 phenoxyalkanoic acid계의 제초제 (4-CPA는 생장조절제)로서 국내에서 장기간 널리 사용해온 auxin 유사활성의 화합물들이다. 실제 유효성분은 acid이나 2,4-D 등의 경우 ethyl ester 등의 형태로 사용되기도 하므로 대상성분은 acid와 ester 모두를 분석 대상으로 한다.

- 이들 phenoxyalkanoic acid 화합물들은 carboxylic acid기로 인하여 GLC로 직접 분석하기는 힘들다. 또한 자외 영역의 흡수파장이 짧으며 형광 특성도 없으므로 통상적 HPLC법으로도 분석이 어렵다. 따라서 주로 사용되는 분석법은 분자 내 chlorine 원자가 있다는 점에 착안하여 carboxylic acid를 ester화, 휘발성을 높여 GLC/ECD로 분석하는 것이 보편적이다.

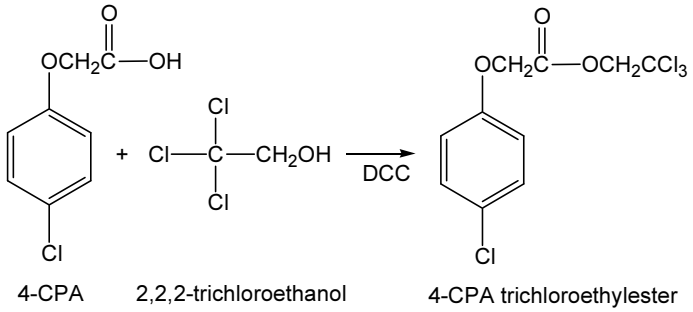


그림 1. 4-CPA의 trichloroethyl ester 형성 반응

- 4-CPA의 경우 분자 내에 chlorine 원자를 1개만 보유하고 있으므로 단순 alkyl ester로

는 ECD에 대한 감도가 낮아 분석이 어렵다. 감도를 향상시키기 위해서 haloalcohol을 반응시키는데 이 분석법에서 이용한 ester 반응은 그림 1과 같다.

- 농산물 검체로부터 비극성인 ester와 약산성인 acids 대상성분 전부를 추출하기 위하여 검체를 산성화한 후 acetone을 사용하였다. 검체를 산성화할 경우 acid는 이온억압되어 유기용매 가용의 특성을 나타내게 되므로 acetone으로 충분히 추출이 가능하며 ester는 비극성의 비해리 특성을 나타내므로 일상적 성분들과 마찬가지로 추출 효율이 높다. 추출된 ester는 acid와 특성이 너무 상이하여 동시 분석은 어렵다. 따라서 분리 분석하거나 acid 전환, 통합하여 분석한다. 이 분석법에서는 후자의 방법을 이용, 알칼리 가수분해에 의하여 추출된 ester를 acid로 전환한다.

- Acid 성분의 분배 정제과정은 pH 조절에 의한 ion-associated partition법을 사용한다. 즉, acids 대상성분들은 약산성의 해리가능 화합물이므로 알칼리조건에서는 수용성, 산성에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 알칼리조건에서 유기용매로 분배하여 버림으로써 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거 할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 산성으로 조절하면 대상 acid들은 유용성의 비해리 형태가 되므로 NaCl 수용액을 첨가하여 ionic strength를 보다 증대시킨 조건에서 유기용매로 분배하면 모든 대상성분을 우수한 분배효율로 회수할 수 있다. 본 분석법에서는 *n*-hexane-acetonitrile 분배법에 의한 유지 제거 과정이 포함되어 있으나 콩류와 같은 고유지 검체가 아닌 경우에는 이를 생략하여도 무방하다.

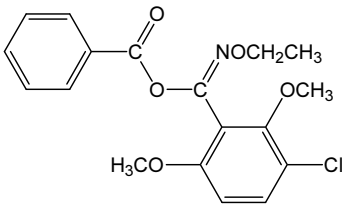
- Trichloroethylation을 수행하면 검체 중 다른 유기 산성물질도 함께 ester화되어 3개의 chlorine 원자를 보유하게 되므로 ECD에 대한 반응을 나타낸다. 따라서 검체의 chromatogram은 비록 Florisil column chromatography를 수행, 정제되었다 하더라도 그다지 깨끗하지는 않다. 그러나 형성된 대상성분의 감도가 매우 뛰어나므로 검체 용액을 적절히 희석하여 분석하면 큰 문제는 없다. 시약 중 DCC는 수분에 의하여 분해되므로 취급 및 보관에 주의를 요한다.

8.3.9 잔류농약 분석법 4.1.3.14

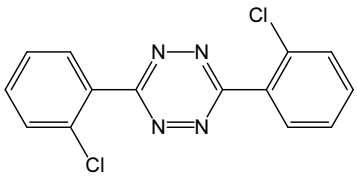
벤족시메이트(Benzoximate), 클로펜테진(Clofentezine), 페나자퀸(Fenazaquin), 훼노치오카브(Fenothiocarb), 펜피록시메이트(Fenpyroximate), 헥시치아족스(Hexythiazox), 피리다벤(Pyridaben) 및 테부펜피라드(Tebufenpyrad)

1) 대상 농약의 특성

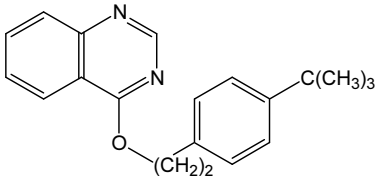
- 분자구조



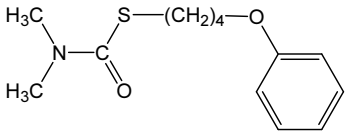
Benzoximate



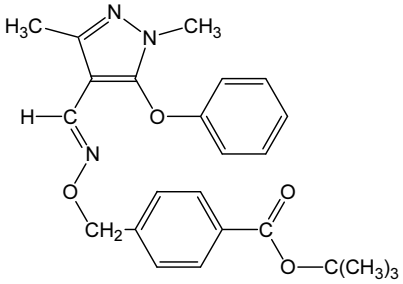
Clofentezine



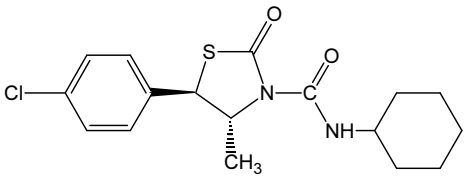
Fenazaquin



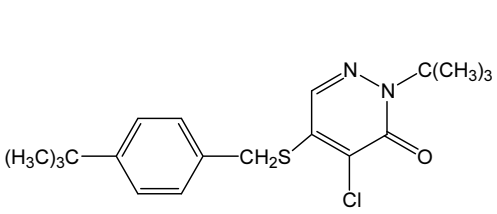
Fenothiocarb



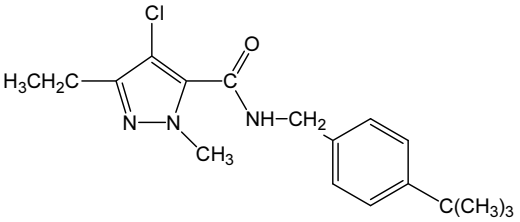
Fenpyroximate



Hexythiazox



Pyridaben



Tebufenpyrad

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Benzoximate	3-chloro-α-ethoxyimino-2,6-dimethoxybenzyl benzoate
Clofentezine	3,6-bis(2-chlorophenyl)-1,2,4,5-tetrazine
Fenazaquin	4-*tert*-butylphenethyl quinazolin-4-yl ether
Fenothiocarb	*S*-4-phenoxybutyl dimethylthiocarbamate
Fenpyroximate	*tert*-butyl (*E*)-α-(1,3-dimethyl-5-phenoxypyrazol-4-ylmethyleneamino-oxy)-*p*-toluate
Hexythiazox	(4*RS*,5*RS*)-5-(4-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxo1,3-thiazolidine-3-carboxamide
Pyridaben	2-*tert*-butyl-5-(4-*tert*-butylbenzylthio)-4-chloropyridazin-3(2*H*)-one
Tebufenpyrad	*N*-(4-*tert*-butylbenzyl)-4-chloro-3-ethyl-1-methylpyrazole-5-carboxmide

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Benzoximate	$C_{18}H_{18}ClNO_5$	363.8	363.1
Clofentezine	$C_{14}H_8Cl_2N_4$	303.1	302.0
Fenazaquin	$C_{20}H_{22}N_2O$	306.4	306.2
Fenothiocarb	$C_{13}H_{19}NO_2S$	253.4	253.1
Fenpyroximate	$C_{24}H_{27}N_3O_4$	421.5	421.2
Hexythiazox	$C_{17}H_{21}ClN_2O_2S$	352.9	352.1
Pyridaben	$C_{19}H_{25}ClN_2OS$	364.9	364.1
Tebufenpyrad	$C_{18}H_{24}ClN_3O$	333.9	333.2

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Benzoximate	2.4	30	4.5×10^{-1} (20℃)	비해리성
Clofentezine	4.1	0.0025	1.4×10^{-4} (25℃)	비해리성
Fenazaquin	5.5	0.22	3.4×10^{-3} (25℃)	비해리성
Fenothiocarb	3.5	0.034	1.7×10^{-1} (23℃)	비해리성
Fenpyroximate	5.0	0.015	7.4×10^{-3} (25℃)	비해리성
Hexythiazox	2.5	0.5	3.4×10^{-3} (20℃)	비해리성
Pyridaben	6.4	0.012	$<1.0\times10^{-2}$ (25℃)	비해리성
Tebufenpyrad	4.9	2.6	$<1.0\times10^{-2}$ (25℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

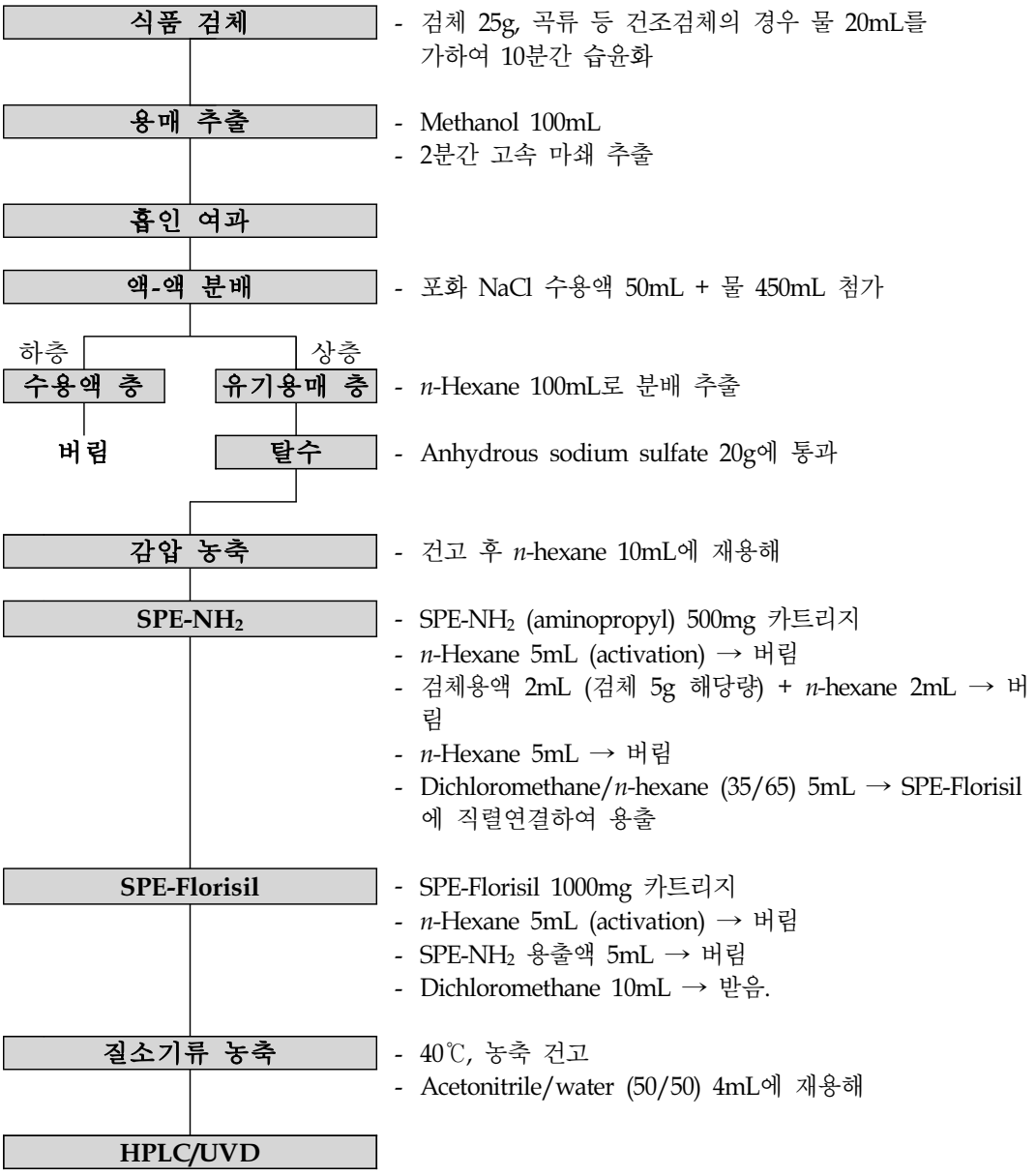
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Benzoximate	-	-	0.5	-	-	-	-
Clofentezine	0.02	-	0.2~2.0	1.0	0.2	0.02~1.0	-
Fenazaquin	0.005	-	0.1~0.7	0.05~3.0	-	-	-
Fenothiocarb	0.0075	-	1.0	-	-	-	-
Fenpyroximate	0.01	-	0.5	0.1~2.0	-	-	-
Hexythiazox	0.03	-	0.3~1.0	2.0	-	-	-
Pyridaben	0.005	-	0.5~2.0	0.05~5.0	-	-	-
Tebufenpyrad	0.01	-	0.5	0.05~5.0	-	-	-

2) 분석법 개요

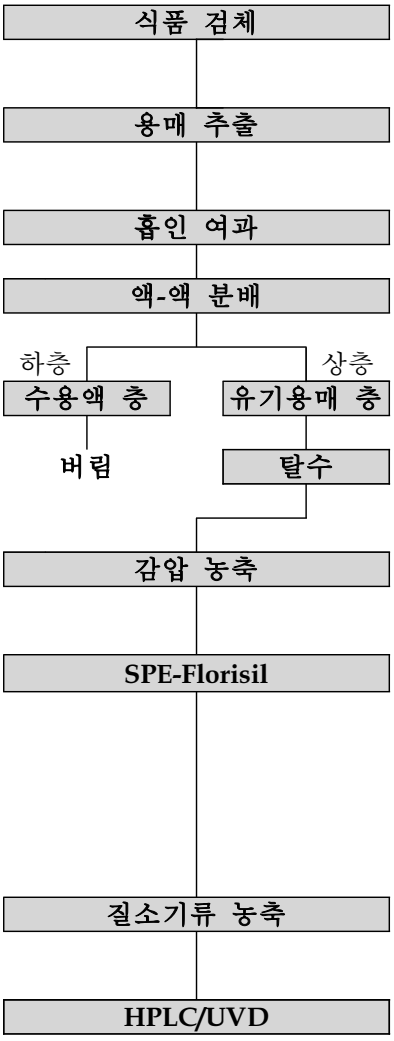
습윤화한 농산물 검체에 methanol을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하고 SPE-NH_2법 및 SPE-Florisil법으로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

① **Clofentezine, fenazaquin, fenothiocarb, fenpyroximate, hexythiazox, pyridaben, tebufenpyrad**



② **Benzoximate**



- 검체 25g, 곡류 등 건조검체의 경우 물 20mL를 가하여 10분간 습윤화
- Methanol 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 450mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 hexane 10mL에 재용해
- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 2mL (검체 5g 해당량) + *n*-hexane 2mL → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 10mL → 받음
- Dichloromethane/*n*-hexane (50/50) 10mL → 받음
- 40℃, 농축 건고
- Acetonitrile/water (60/40) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외선검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (3.9 mm i.d. × 150 mm, 4 ㎛) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상

clofentezine, fenazaquin, fenothiocarb, fenpyroximate, hexythiazox, pyridaben,

tebufenpyrad : Gradient, acetonitrile/물 (50/50, v/v)에서 acetonitrile/물 (70/30, v/v)으로 30분간 농도균배한 후 5분이상 흘려 보낸다.

benzoximate : acetonitrile/물 (60/40, v/v)

이동상 유량 : 1.0 mL/min

검출기 파장 : UV 228 nm

주입량 : 40 μL (benzoximate 50 μL)

분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Benzoximate	0.02	Fenpyroximate	0.04
Clofentezine	0.04	Hexythiazox	0.04
Fenazaquin	0.04	Pyridaben	0.04
Fenothiocarb	0.05	Tebufenpyrad	0.04

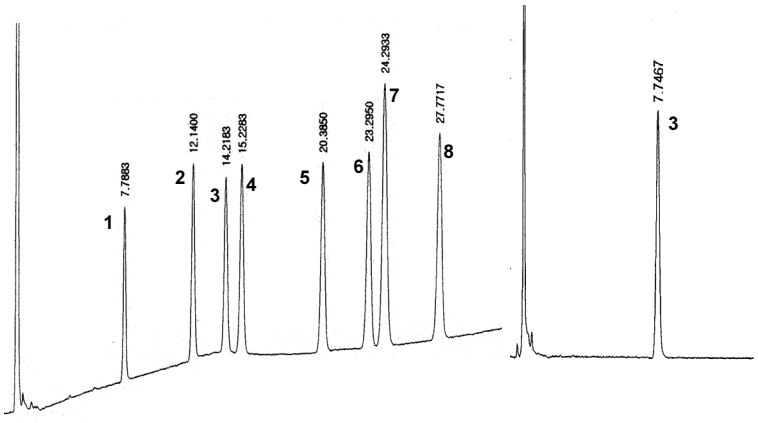


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램

1, fenothiocarb (7.8분) 20 ng; 2, clofentezine (12.1분) 20 ng; 3, benzoximate (14.2분) 10 ng; 4, tebufenpyrad (15.2분) 20 ng; 5, hexythiazox (20.4분) 20 ng; 6, fenpyroximate (23.3분) 20 ng; 7, fenazaquin (24.3분) 20 ng; 8, pyridaben (27.8분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 30℃

이동상 : acetonitrile/물 (55/45, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
이온화 : Electrospray ionization (ESI) positive-ion mode
(clofentezine의 경우 ESI negative-ion mode)
주입량 : 10 μL
분자량 범위 : 50~500

표 1. LC-MS 분석을 위한 ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Benzoximate	12.5	363	364, 366
Clofentezine	9.6	303	302
Fenazaquin	19.7	306	307
Fenothiocarb	6.4	253	254
Fenpyroximate	22.4	421	422
Hexythiazox	19.3	352	353
Pyridaben	32.7	364	365, 367
Tebufenpyrad	12.4	333	334, 336

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약은 현재 국내에서 등록 사용 중인 8종의 살응애제 들이다. 과수재배 시 발생하는 응애류를 방제하기 위하여 사용되는 살응애제는 살충제에 비하여 약종수 및 사용량은 적으나 응애류 방제 목적상 잔효성이 요구되므로 대부분 잔류성이 긴 화합물들이 사용되고 있다. 따라서 수확물중 사용된 살비제의 잔류가능성이 살충제에 비하여 높을 것으로 판단되고 있으며 특히 수확물이 주로 생식용임을 감안할 때 농약잔류에 따른 안전성 평가에 반드시 포함되어야 할 농약 부류이다.

- 분석 대상 화합물들의 증기압의 범위는 0.13~450 μPa 범위로 다소 낮은 편이나 log P의 값이 최소 2이상이며 물에 대한 용해도가 매우 낮은 비극성 특성을 나타내고 있어 GLC의 이용가능성도 있으나 benzoximate, hexythiazox 및 fenpyroximate 등이 용출되지 않는다.

- 추출 용매로는 비극성 농약의 잔류분석법에서 저지방검체에 대하여 표준적 용매로

널리 사용되고 있는 methanol을 사용한다. Methanol은 이미 많은 연구자들에 의하여 유기염소계, 유기인계 및 카바메이트계 농약 등 유사 특성의 농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정되고 있다. 대상농약들은 acetone 추출액을 포화식염수/물로 희석한 후 직접 비극성 용매인 *n*-hexane으로 분배하였을 때 전 성분이 회수된다.

- 추가적 정제법으로는 SPE-Florisil에서는 대상성분 8종이 모두 용출되나 SPE-NH_2 column에서는 benzoximate가 용출되지 않는다. 두 가지 SPE 법은 제거하는 불순물의 종류가 상이하므로 함께 사용하였을 때 불순물 제거 효과가 뛰어나다. SPE-NH_2에서 용출되지 않는 benzoximate의 경우 SPE-Florisil 정제법만으로 모든 검체 추출액의 정제가 가능하다. 기기분석을 위한 최종용액은 그 정제정도가 우수하여 연속 주입, 분석이 가능하다.

- HPLC/UVD 분석 시에 clofentezine (272nm), fenpyroximate (260nm) 및 pyridaben (296nm)은 정량파장 보다 더 장파장에서 최대 흡수 파장이 관찰되므로 해당 성분만을 분석할 경우 이들 파장을 이용하여도 무방하다.

표 2. 농산물 중 회수율

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*				
		현미	고추	배추	사과	감귤
Benzoximate	0.2	82.5±1.6	94.9±5.9	104.3±3.8	98.4±0.3	96.4±7.8
	1.0	87.6±5.8	94.5±0.6	93.3±5.1	98.2±1.2	88.7±5.1
Clofentezine	0.4	84.4±0.9	88.8±2.1	95.2±2.9	89.4±2.1	98.0±2.2
	2.0	80.9±7.0	82.6±1.2	93.2±1.6	82.4±0.5	87.2±3.6
Fenazaquin	0.4	77.3±2.9	90.4±3.4	93.4±1.7	95.7±2.3	94.5±0.2
	2.0	77.8±2.3	88.1±4.0	92.3±0.7	83.0±0.5	86.4±2.4
Fenothiocarb	0.4	90.9±1.7	92.9±1.7	98.7±0.5	95.0±1.0	89.1±1.0
	2.0	89.1±6.7	86.0±3.2	95.1±0.7	88.7±0.8	89.8±2.7
Hexythiazox	0.4	75.9±0.5	90.0±0.9	100.2±1.1	97.0±2.1	97.1±1.9
	2.0	84.2±1.7	83.9±2.7	96.9±0.7	90.1±0.6	89.9±1.0
Pyridaben	0.4	70.7±0.5	90.5±2.1	100.3±0.9	93.3±2.5	98.4±1.6
	2.0	73.8±4.9	83.5±2.6	98.5±1.6	88.4±2.0	88.8±3.0
Tebufenpyrad	0.4	86.0±1.0	91.3±0.6	99.8±1.6	99.6±5.8	102.9±3.2
	2.0	81.1±1.2	85.3±4.1	96.1±1.1	99.3±1.0	88.0±1.9

* 3반복 평균±표준편차.

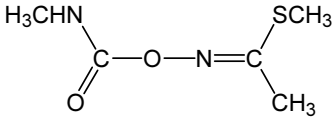
- LC/MS의 electrospray ionization 조건에서 대부분의 대상성분들은 $(M+H)^+$ 이온이 충분한 intensity로 관찰되며 $(M+H)^+$ 이온을 SIM 조건으로 적용할 경우 대부분 정량한계 수준 혹은 더 높은 감도로 재확인이 가능하다. Clofentezine의 경우에는 ionization 정도가 상당히 낮으며 negative mode에서만 약하게 검출되므로 LC/MS로 재확인하기 위해서는 조제한 검체를 농축하는 것이 필요하다. 대부분 $(M+H)^+$ ion의 relative abundance가 높아 SIM으로 사용되므로 1개 fragment ion만을 추가적으로 monitoring 하더라도 분자구조에 따른 정성적 확인에는 충분하다.

8.3.10 잔류농약 분석법 4.1.3.15

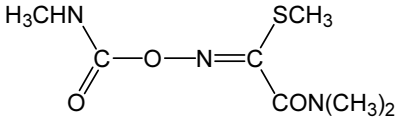
메소밀(Methomyl) 및 옥사밀(Oxamyl)

1) 대상 농약의 특성

- 분자구조



Methomyl



Oxamyl

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Methomyl	*S*-methyl *N*-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate
Oxamyl	*N*,*N*-dimethyl-2-methylcarbamoyloxyimino-2-(methylthio)acetamide

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Methomyl	$C_5H_{10}N_2O_2S$	162.2	162.1
Oxamyl	$C_7H_{13}N_3O_3S$	219.3	219.1

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Methomyl	0.093	57900	0.72 (25℃)	비해리성
Oxamyl	-0.44	280000	0.051 (25℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

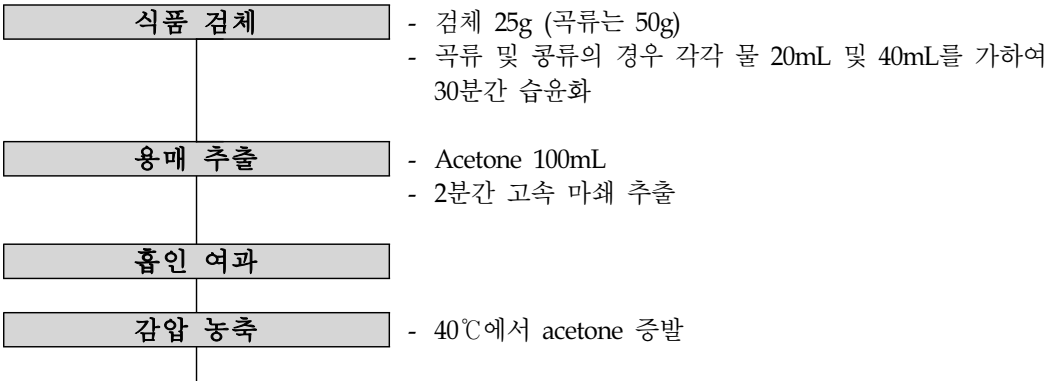
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Methomyl	0.02	0.05~0.5	0.2~5.0	0.2~5.0	0.1~5.0	0.1~0.2	0.1~0.2
Oxamyl*	0.009	0.02~0.05	0.2~5.0	0.05~5.0	0.1	0.1~0.5	0.1

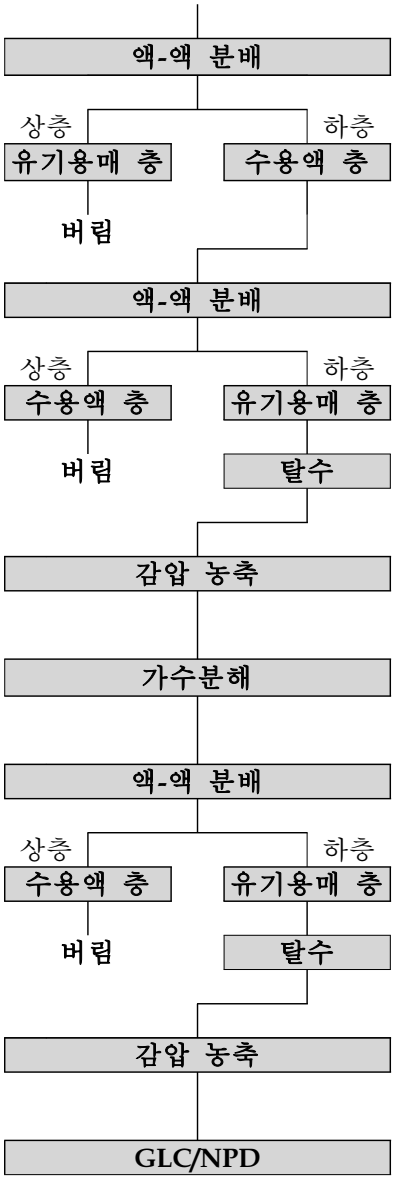
* 대사산물 oxamyl oxime 포함.

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 또는 진탕하여 methomyl 및 oxamyl의 모화합물 및 oxime체를 동시에 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 산성화한 후 *n*-hexane으로 분배하여 씻어버린다. 수용액층에 NaCl을 가하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압농축하고 잔류물에 NaOH 수용액을 가한 후 가수분해, methomyl과 oxamyl을 각각 methomyl oxime과 oxamyl oxime으로 변환시킨다. 가수분해 액을 산성화하고 NaCl을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 감압농축하고 acetone에 재용해하여 methomyl oxime 및 oxamyl oxime을 GLC/NPD로 각각 분석한 후 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용, methomyl 또는 oxamyl의 총 잔류량을 산출한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 1N H_2SO_4 5mL 첨가
- *n*-Hexane 50mL × 2회 분배 추출하여 버림.
- NaCl 10g 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetone에 녹인 2% diethylene glycol 0.2mL 첨가
- 30℃에서 1~2mL 남을 때까지 농축
- 질소 기류하에서 농축, 건고
- 0.1N NaOH 30mL 첨가 후 혼합
- 80℃에서 30분간 방치 후 방냉
- 반응물을 1N H_2SO_4 수용액으로 씻어 분액여두에 옮김
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetone에 녹인 2% diethylene glycol 0.2mL 첨가
- 30℃에서 1~2mL 남을 때까지 농축
- 질소 기류하에서 농축, 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-608 (0.53 mm i.d. × 30 m, 정량용)

또는 DB-17 (0.25 mm i.d. × 30 m, 확인용) capillary column
또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 10분간 유지 (DB-608, methomyl oxime)
150℃에서 검체를 주입하고 10분간 유지 (DB-608, oxamyl oxime)
45℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 220℃까지 10℃/min으로 상승시켜서 5분간 유지 (DB-17, methomyl oxime 및 oxamyl oxime)

주입부 온도 : 250℃

검출기 온도 : 280℃

캐리어가스 및 유량 : nitrogen (DB-608 : 15 mL/min, DB-7 : 1 mL/min)

주입량 : DB-608 : 2 μL, 직접주입법
DB-17 : 1 μL, splitless

분석법의 정량한계 : methomyl 및 oxamyl 각 0.02~0.03 mg/kg
methomyl oxime 및 oxamyl oxime 각 0.01~0.02 mg/kg
(대상성분 및 검체별 정량한계는 표 2 참조.)

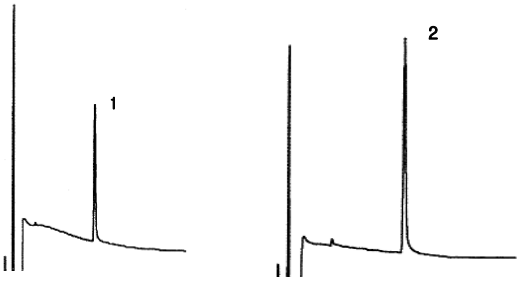


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램 (DB-608)
1, methomyl oxime (5.9분); 2, oxamyl oxime (6.4분) 각 2 ng.

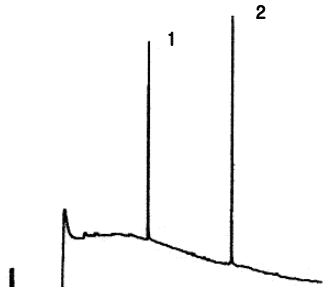


그림 2. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램 (DB-17)
1, methomyl oxime (8.2분); 2, oxamyl oxime (13.3분) 각 2 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-17MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 220℃에서 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 2 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless (purge time 0.9분)
분자량 범위 : 50~200

표 1. GC-MS 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Methomyl oxime	8.0	106.33	105, 88, 71, 58
Oxamyl oxime	13.2	170.04	162, 145, 115, 98, 72

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 methomyl과 oxamyl은 약제 살포 후 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 oxime체로 대사된다. 따라서 각 모화합물과 더불어 oxime체를 함께 분석하여 모화합물로 환산, 총 잔류량을 표시하도록 규정되어 있다. 따라서 분석법은 methomyl과 methomyl oxime 그리고 oxamyl과 oxamyl oxime을 동시에 분석하도록 설계되었다.

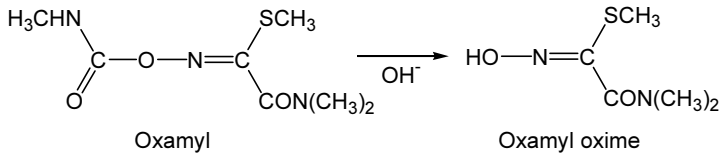


그림 3. Oxamyl의 가수분해 대사반응

- 분석성분의 분자구조 내 sulfur와 nitrogen기를 함께 포함하고 있으므로 GLC/FPD(S)와

GLC/NPD를 이용할 수 있다. 분석성분인 methomyl oxime 및 oxamyl oxime은 각각 NPD에서의 감도가 FPD(S)에서의 감도보다 2배와 10배의 높은 감도를 나타내므로 NPD가 유리하다. Methomyl oxime 및 oxamyl oxime은 중간극성인 DB-608 column에서 비극성인 DB-5 column에 비하여 보다 대칭성이 우수한 peak로 나타난다.

- 농산물 검체로부터 methomyl, oxamyl 및 oxime체의 분석 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매로서 이미 많은 연구자들에 의하여 유기염소계, 유기인계 및 카바메이트계 농약 등 유사특성의 농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다.

- 추출물로부터 모화합물 및 oxime체를 추출하거나 또는 검체 중 불순물을 세척하기 위한 분배법으로는 산성조건하에서 oxime체의 해리를 억압하면서 비극성 용매로 분배하는 방법을 사용한다. 이온억압조건하에서 dichloromethane으로 2회 분배로 우수한 회수 효율을 나타내며 *n*-hexane으로는 분배되지 않으므로 비극성 간섭물질들을 효과적으로 세척, 제거하는 과정이 가능하다.

표 2. 농산물 중 회수율 및 정량한계

검체	처리농도 (mg/kg)	회수율±표준편차(%)*		정량한계 (mg/kg)
		Methomyl	Oxamyl	
현미	0.15	99.2±4.6	96.4±8.5	0.02
	0.75	97.4±5.3	90.9±2.2	
콩	0.3	101.3±1.5	88.3±2.0	0.03
	1.5	100.6±2.0	77.9±5.0	
사과	0.3	96.1±4.0	91.7±4.8	0.03
	1.5	95.0±3.1	87.5±4.3	
고추	0.3	92.3±8.1	88.0±3.2	0.03
	1.5	100.6±2.0	92.5±3.4	
배추	0.3	99.5±5.9	103.5±4.6	0.03
	1.5	100.9±3.8	100.3±6.4	
감자	0.3	96.0±1.9	94.6±2.8	0.03
	1.5	92.4±3.3	101.1±2.3	

* 3반복 평균.

표 2. 농산물 중 회수율 및 정량한계 (계속)

검체	처리농도 (mg/kg)	회수율±표준편차(%)*		정량한계 (mg/kg)
		Methomyl oxime	Oxamyl oxime	
현미	0.1	78.4±1.3	92.4±2.9	0.01
	0.5	73.3±3.0	89.0±4.3	
콩	0.2	72.6±1.5	86.1±6.2	0.02
	1.0	72.2±1.8	89.9±5.3	
사과	0.2	76.1±2.7	96.1±5.6	0.02
	1.0	72.2±1.4	88.6±3.6	
고추	0.2	79.7±3.5	100.6±2.3	0.02
	1.0	78.6±3.0	95.8±4.7	
배추	0.2	83.2±2.4	100.2±1.2	0.02
	1.0	80.4±3.0	93.8±6.4	
감자	0.2	83.5±0.8	100.4±5.4	0.02
	1.0	79.0±1.8	100.0±5.5	

* 3반복 평균.

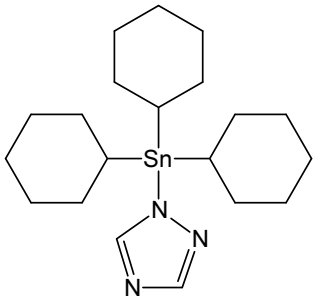
- Methomyl oxime 및 oxamyl oxime의 GC-MS SIM을 위한 fragment는 methomyl oxime의 경우 m/z 105(M+) 및 88, oxamyl oxime의 경우 m/z 162(M+) 및 145로 설정하였다. 가동이 다소 까다로운 고가의 장비를 이용하여야하는 단점은 있으나, 일상적 분석법과 대등한 감도에서 분석 대상성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragmention을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다.

8.3.11 잔류농약 분석법 4.1.3.16

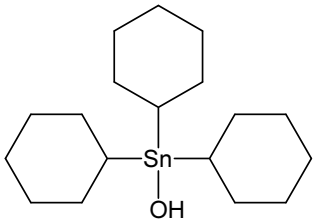
아조싸이클로틴(Azocyclotin) 및 싸이헥사틴(Cyhexatin)

1) 대상 농약의 특성

- 분자구조



Azocyclotin



Cyhexatin

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Azocyclotin	tri(cyclohexyl)-1*H*-1,2,4-triazol-1-yltin
Cyhexatin	tricyclohexyltin hydroxide

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Azocyclotin	$C_{20}H_{35}N_3Sn$	436.2	437.2
Cyhexatin	$C_{18}H_{34}OSn$	385.2	386.2

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Azocyclotin	5.3	0.12	2×10^{-8} (20℃)	5.36, 약염기
Cyhexatin	4.9	〈1	-	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

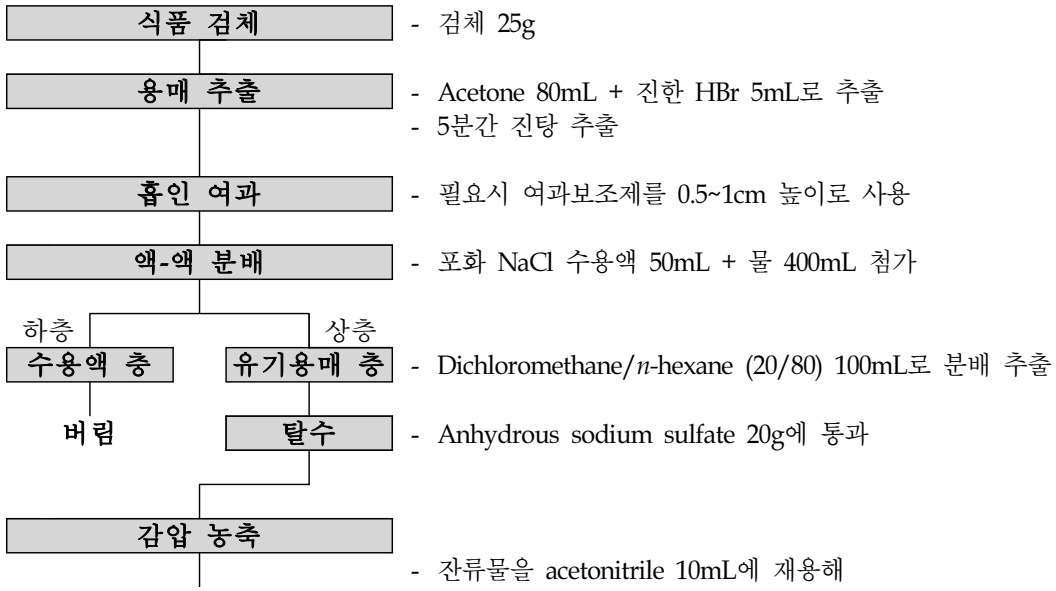
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Azocyclotin*	0.007	-	0.2~4.0	0.1~0.5	0.2	-	-
Cyhexatin	0.007	-	0.2~2.0	0.1~2.0	0.2	-	-

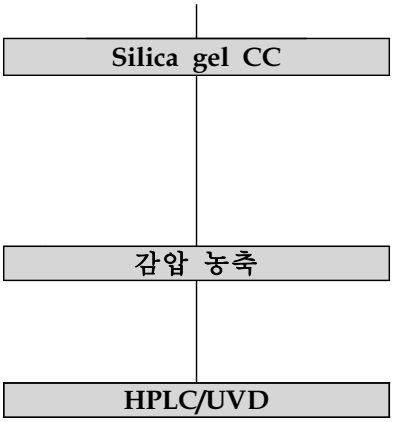
* 대사산물 cyhexatin 포함.

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 진한 HBr과 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가한 후 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액으로 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하고 silica gel column chromatography [용출용매 : acetonitrile/acetic acid (100/0.2, v/v)] 로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Silica gel 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- Acetonitrile 25mL (pre-washing) → 버림
- Acetonitrile 추출액 10mL → 버림
- Acetonitrile 50mL → 버림
- Acetonitrile/acetic acid (100/0.2) 30mL → 받음

- 건고 후 잔류물을 acetonitrile/1mM HCl 수용액 (85/15, 5mM NaCl 함유) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (3.9 mm i.d. × 150 mm, 4 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/1 mM HCl, 5 mM NaCl 함유 (85/15, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 214 nm
분석법의 정량한계 : azocyclotin 및 cyhexatin 각 0.04 mg/kg

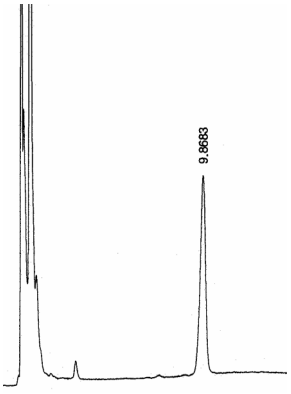


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
cyhexatin (9.9분) 50 ng.

5) 재확인법

측정기기 : HPLC (머무름 특성이 상이한 column 또는 이동상 이용)

6) 분석법 해설

- Azocyclotin과 cyhexatin은 유기주석계 살비제로서 오랜 기간 사용되어 왔다. 그 외 유기주석계 농약은 살비제로 사용되고 있는 fenbutatin oxide가 대표적이며 살균제로는 fentin oxide 및 그 유도체들이 사용된다. Azocyclotin은 살포 후 생체 및 환경 중에서 cyhexatin으로 신속히 분해된다. 따라서 azocyclotin의 잔류량은 cyhexatin을 기준으로 환산, 표시된다. 유기주석계 농약의 물리화학적 특성은 log P_{ow} 값이 3~5 정도로 비극성 화합물이나 주석이 함유된 organometallic 화합물로서 다른 유기 농약과는 상이한 용해도 특성을 나타낸다.

- 유기주석계 농약은 그 증기압이 매우 낮아 직접 GLC로 분석은 불가능하며 이에 따라 휘발성을 높이기 위하여 Grignard 시약이나 alkylithium 시약을 사용, alkylated derivatives를 합성한 후 이를 고온 GLC로 분석하는 방법이 알려져 있다. 그러나 이들 시약은 이른바 air-sensitive reagent로서 다루기가 까다롭고 습기에 매우 취약하므로 일반적 분석조건에서는 유도체 반응의 항상성이 불량한 단점이 있다. 또한 고온 GLC 특성상 분석의 재현성도 일정하지 않은 단점이 있다.

- 본 분석법은 대상 화합물들을 유도체 형성과정 없이 직접 HPLC로 분석하는 방법이다. Cyhexatin을 HPLC로 분석할 때 사용할 수 있는 검출기로는 일반적 HPLC 검출기 중 자외흡광 검출기가 유일하다. 자외선 영역에서 cyhexatin은 특정 발색단에 의한 최대흡광파장 peak는 관찰되지 않으며 잔류분석에서 요구되는 감도를 만족시킬 수 있는 흡광계수 $1\times10^{4}cm^{-1}M^{-1}$ 이상을 나타내는 파장은 220 nm 이하이다. 따라서 검체 중 불순물 혼입에 의한 간섭 가능성이 장파장에서 측정할 때 보다 상대적으로 높으므로 간섭물질의 효율적 제거 및 분리가 무엇보다도 중요하다.

- Cyhexatin에 대한 HPLC 분석조건에서 이동상으로는 NaCl이 함유된 acetonitrile/ HCl 혼합액을 사용한다. NaCl과 HCl이 함유되지 않을 경우 cyhexatin은 용출되지 않으며 또한 NaCl과 HCl의 농도가 변화함에 따라 머무름 시간이 상당히 변화하므로 NaCl과 HCl의 정확한 농도 조절이 필요하다.

- 추출 용매로는 진한 HBr/acetone 혼합액을 사용하며 이 조건에서 azocyclotin은 cyhexatin으로 전환된다. 강산조건에서 장시간 추출할 경우 간섭물질이 증가하고 분석성분의 분해도 우려되므로 추출시간 5분을 준수한다.

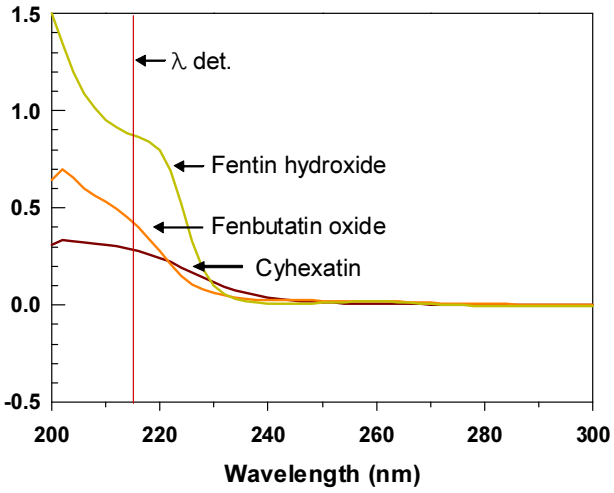


그림 2. Cyhexatin의 UV 흡광 spectrum.

- 분배용매로는 대상 농약들이 비극성인 점을 이용하여 수용성 유기용매 추출액을 포화식염수/물로 희석한 후 직접 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액으로 분배하며 1회 분배 추출로 전량이 회수된다.

- 분배 추출액의 추가적 정제법으로는 흡착크로마토그래피법을 공시한다. SPE-silica (충전제량 1 g)와 같이 충전제 양이 적을 경우 검체 추출물의 과다로 overloading 현상이 관찰되며 분석법에서 요구하는 감도 상 검체량을 감소시키기도 어렵다. 따라서 SPE 대신 5 g의 silica gel을 충전한 column을 사용한다. Silica gel column 상에서 cyhexatin은 일반적 비극성 농약의 용출 양상과는 상이하게 acetonitrile에서도 용출되지 않으며 소량의 acetic acid를 첨가하였을 때 비로소 용출된다. 따라서 acetonitrile을 세척용 용매로 흘려버림으로써 효율적으로 불순물을 제거할 수 있다.

- 최종검체 용액은 그 정제 정도가 우수하나 HPLC 분석 시 cyhexatin 보다 늦게 용출되는 간섭물질이 비교적 많으므로 각 식품 검체별로 늦게 용출되는 성분들의 머무름 시간을 조사, 다음 검체 분석 시까지 세척시간을 적절히 조절할 필요가 있다.

- Cyhexatin은 분자 중 주석을 함유하고 있어 휘발성이 극히 낮으므로 LC-MS에서 분자이온을 검출하기 어려우며 ESI 및 APCI mode 모두에서 분자이온이 검출되지 않는다. 따라서 재확인법은 머무름 특성이 상이한 column을 사용하거나 mobile phase 중 NaCl과 HCl의 농도가 변화함에 따라 머무름 시간이 민감하게 변화하는 특성을 이용한다. 즉, 변경된 조건으로 검체를 재주입하여 표준물질과의 머무름 시간의 일치 여부를 판정하여 잔류분을 재확인한다.

표 1. 농산물 중 회수율 및 검출한계

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)			정량한계 (mg/kg)
		감자	사과	감귤	
Azocyclotin	0.4	76.8±1.2	84.4±3.5	87.3±3.7	0.04
	2.0	81.3±1.6	86.6±1.9	91.3±0.5	
Cyhexatin	0.4	82.4±2.3	79.6±3.9	84.3±4.1	0.04
	2.0	87.2±2.9	77.5±0.6	78.6±3.7	

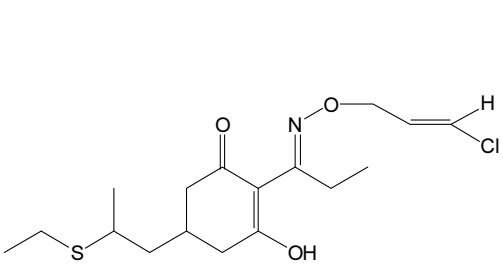
8.3.12 잔류농약 분석법 4.1.3.17

클레소딤(Clethodim), 프로폭시딤(Profoxydim)

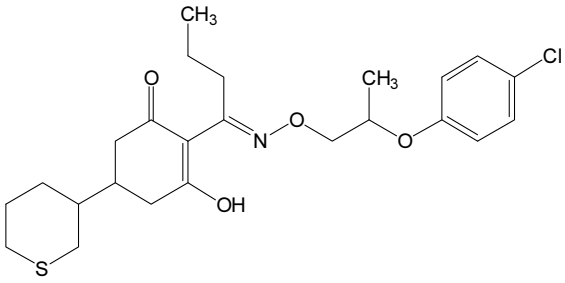
세톡시딤(Sethoxydim)

1) 대상 농약의 특성

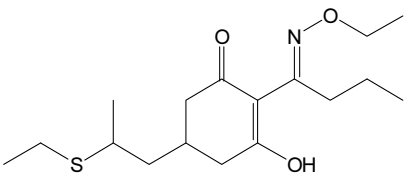
- 분자구조



Clethodim



Profoxydim



Sethoxydim

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Clethodim	(5*RS*)-2[(*E*)-1-[(2*E*)-3-chloroallyloxyimino]propyl]-5-[(2*RS*)-2-(ethylthio) propyl]-3-hydroxycyclohex-2-en-1-one
Profoxydim	(*EZ*)-2-[1-[(2*RS*)-2-(4-chlorophenoxy)propoxyimino]butyl]-3-hydroxy-5-(*cis*-thian-3-yl)cyclohex-2-en-1-one
Sethoxydim	(±)-(*EZ*)-2-(1-ethoxyiminobutyl)-5-[2-(ethylthio)propyl]-3-hydroxy-cyclohex-2-en-1-one

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Clethodim	$C_{17}H_{26}ClNO_3S$	359.9	359.1
Profoxydim	$C_{24}H_{32}ClNO_4S$	466.0	465.2
Sethoxydim	$C_{17}H_{29}NO_3S$	327.5	327.2
Clethodim sulfone	$C_{17}H_{26}ClNO_5S$	391.9	391.1
Profoxydim sulfone	$C_{24}H_{32}ClNO_6S$	498.0	497.2
Sethoxydim sulfone	$C_{17}H_{29}NO_5S$	359.5	359.2

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Clethodim*	4.2	5400 (pH 7)	$<1\times10^{-2}$ (25℃)	4.5
Profoxydim**	3.9	5.3	0.17 (20℃)	5.9
Sethoxydim**	4.5 (pH 5) 1.7 (pH 7)	25 (pH 4) 4700 (pH 7)	$<1.3\times10^{-2}$ (25℃)	-

* 거울상입체이성질체의 혼합물.
** 거울상 및 부분입체이성질체의 혼합물.

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

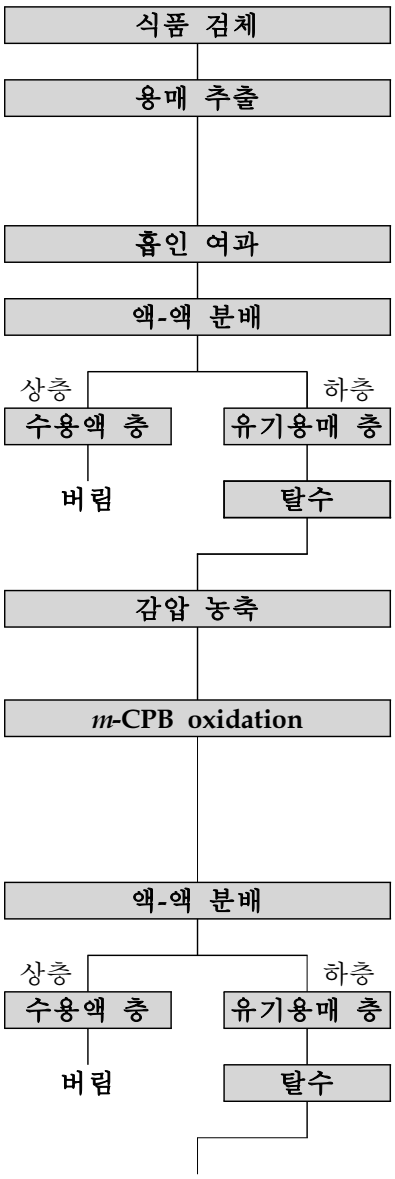
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Clethodim	0.01	-	0.1	0.1~0.2	10	0.1~0.2	0.2
Profoxydim	0.05	-	-	-	-	-	-
Sethoxydim	0.14	0.2	0.1~10	2.0~10	10~40	0.1~25	1.0~4.0

2) 분석법 개요

균질 검체에 메탄올/물 혼합액 (1/1, v/v)을 가하여 마쇄, 모화합물 및 산화대사산물을 동시에 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 약산성화하고 다량의 염화나트륨 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 탈수, 감압농

축한 후 *m*-chloroperoxybenzoic acid (m-CPB)를 가하여 산화 반응시킨다. 전환된 sulfone 체를 액-액 분배에 의하여 추출하고 Florisil 흡착크로마토그래피로 최종 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 10g
- Methanol/증류수 (50/50) 100mL
- 곡류 및 콩류 등 건조 검체는 30분간 방치하여 습윤화
- 2분간 고속 마쇄 추출
- Methanol/증류수 (50/50) 50mL로 잔류물을 씻어 합침
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 50mL + acetic acid 0.5mL 첨가
- CH_2Cl_2 × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 CH_2Cl_2 25mL에 재용해
- CH_2Cl_2에 녹인 1% *m*-CPB 용액 5mL 첨가
- 30℃에서 2분간 정치
- 10% $Na_2S_2O_3$ 수용액 30mL 첨가 후 3분간 진탕
- 분액여두에 옮기고 잔류물을 CH_2Cl_2 10mL로 씻어 옮김
- 10% NaCl 수용액 80mL + 0.1N H_2SO_4 수용액 2mL 첨가
- 하층 분배 및 CH_2Cl_2 30mL로 추가 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

감압 농축
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 CH_2Cl_2 10mL에 재용해

Florisil CC
- Florisil 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Acetone/dichloromethane (10/90) 40mL → 버림
- Methanol/acetone (1/99) 60mL → 받음

감압 농축
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/0.2% acetic acid 수용액 (50/50) 4mL에 재용해

HPLC/UVD

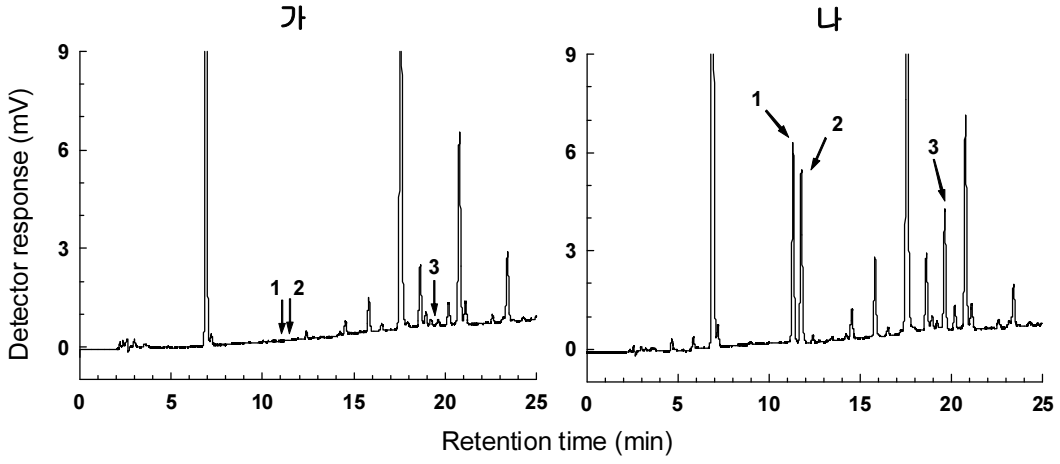


그림 1. 액체크로마토그래피에서 표준품의 크로마토그램

가, 산화반응 공시험액; 나, 표준품 첨가 후 산화반응 시험액

1, sethoxydim sulfone (11.5분) 25 ng; 2, clethodim sulfone (11.9분) 25 ng; 3, profoxydim sulfone (19.7분) 25 ng

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)

검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 혼합액 (0.1% acetic acid 함유)을 35/65 (v/v)에서 1분간 정치한 후 75/25 (v/v)로 30분간 직선적으로 농도 구배한다.
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : 256 nm
검체 주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : clethodim, profoxydim 및 sethoxydim 각 0.04 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 혼합액 (0.1% acetic acid 함유)을 35/65 (v/v)에서 1분간 정치한 후 75/25 (v/v)로 30분간 직선적으로 농도 구배한다.
이동상 유량 : 0.2 mL/min
검체 주입량 : 10 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 70 V
Capillary temperature : 400℃
Needle voltage : 3.0 kV
분자량 범위 (*m/z*) : 200~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Clethodim sulfone	16.1	391	392 [$(M+H)^+$]
Profoxydim sulfone	26.5	359	360 [$(M+H)^+$]
Sethoxydim sulfone	15.2	497	498 [$(M+H)^+$]

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 clethodim, profoxydim 및 sethoxydim은 식물체 내 지질 생합성과정에 관여하는 acetyl CoA carboxylase를 저해함으로써 살초작용을 나타내는 cyclohexanedione oxime계 제초제이다. 다양한 작물 재배 시 각종 잡초를 방제하기 위하여 잡초발생 후에 처리하며 선택성이 있어 전면살포용으로 사용된다. 대상성분들은 모화합물이 유효성분이나 동식물체나 환경 중에서 산화되어 독성학적으로 중요성이 인정되는 sulfoxide체 및 sulfone체 대사산물을 생성하므로 잔류분은 모화합물, sulfoxide체 및 sulfone체 잔류량의 합으로 정의된다.

- 대상성분들은 분자 내에 cyclohexanedione oxime의 공통적 구조를 가지고 있다. Clethodim은 분자 내에 2개의 chiral center와 함께 oxime과 chloroallyl기에서 *cis-trans* 입체이성질체가 존재한다. 시판용 유효성분은 2-ethylthiopropyl기의 enantiomer pair로서 *cis-trans* 입체이성질체는 *E,E*-배위를 나타내나 용액의 산도조건에 따라 *Z,E*-배위와 평형을 이루고 그 평형은 *E,E*-배위로 치우쳐 있어 *E,E*-배위가 major, *Z,E*-배위가 minor 화합물로 구성되게 된다. Sethoxydim은 분자 내에 1개의 chiral center와 함께 oxime기에서 *cis-trans* 입체이성질체가 존재하는데 시판 유효성분은 enantiomer pair인 *E,Z*-isomer의 혼합물로서 입체장애로 인하여 *E*-배위 화합물이 주 구성체이다. Profoxydim은 3개의 chiral center와 함께 oxime기에서 *cis-trans* 입체이성질체가 존재하는 형태로서 sethoxydim과 마찬가지로 *E*-배위 화합물이 주요 구성체이다.

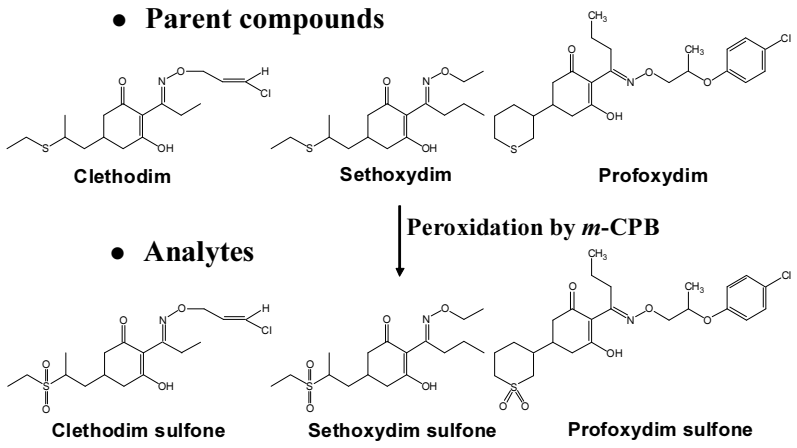


그림 2. Cyclohexanedione oxime계 제초제의
m-CPB 산화반응에 의한 sulfone체 형성

- 유효성분들은 살포 후 동식물체나 환경 중에서 비교적 빠른 속도로 산화, sulfoxide체를 생성하며 최종적으로 sulfone체까지 산화되면서 많은 종류의 대사체들을 생성한다. 이러한 산화산물들은 독성학적 중요성이 인정되므로 잔류분은 모화합물, sulfoxide체 및 sulfone체 잔류량의 합이다. 따라서 분석법은 모화합물과 함께 이들 대사산물을 같이 분석하여야 한다. 제시한 분석법에서는 시료 중에 함유되어 있는 모화합물 및 산화 대사산물들을 동시에 용매 추출한 후 *m*-chloroperoxybenzoic acid (m-CPB)를 산화제로 한 산화반응에 의하여 모화합물과 sulfoxide체를 모두 sulfone체로 전환, 총량으로 분석한다. 따라서 실제 기기 분석성분은 그림 2에 나타낸 바와 같이 각 대상 화합물들의 sulfone체이다.

- 대상 농약의 유효성분들은 약산성 화합물들이며 기기 분석성분들인 sulfone체는 산화에 따라 극성이 높아질 것으로 예상되므로 기기분석법으로는 이온억압조건에서 HPLC를 이용한다. 대상 유효성분 및 sulfone체들은 분자 내 cyclohexanedione oxime 구조의 conjugation system에 따라 이온억압조건인 약산성의 이동상 용액에서 각각 256 nm 및 254～258 nm 범위를 강하게 흡수하므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 극성 농약의 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 methanol/water 혼합액을 사용한다. 대상 성분인 모화합물, sulfoxide체 및 sulfone체는 약하게 해리하는 성분들이며 sulfoxide체 및 sulfone체로 갈수록 극성이 높아진다. 대상 성분들은 산성조건에서 분해에 취약하므로 검체를 산성화하여 비극성 쪽으로 이온화를 억압하여 추출하기는 어렵다. Methanol은 대상성분들과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 약산성 및 약염기성 화합물들을 추출하는데 보편적으로 사용되는 용매이므로 추출효율에는 큰 문제가 없다.

- 시료 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위한 액-액 분배법은 대상 성분이 약산성 성분임을 감안하여 수용성 유기용매 추출액을 포화식염수/증류수로 희석한 후 약하게 산성화하고 직접 비극성 용매인 dichloromethane으로 분배 추출한다. 대상 성분의 모화합물 및 sulfone체는 2회의 dichloromethane 분배 추출로 완전 회수된다. 추출액의 산성화를 하지 않더라도 모화합물 및 sulfone체는 2회의 dichloromethane 분배 추출로 완전 회수 (98～103%)되나 농산물 검체에 따라 추출액의 액성이 상이하므로 해리가 유발될 경우에는 분배 효율이 낮아질 가능성이 있다. 따라서 약산성화를 위하여 acetic acid를 첨가, pH 4로 조절한다. 대상 성분들이 산성에 취약한 점을 감안하여 최소한의 산성화를 수행하며 NaCl 첨가로 이온 강도를 높여 추가적 이온억압조건에서 분배한다.

- 액-액 분배추출물에 대하여 *m*-CPB (m-chloroperoxybenzoic acid)를 사용하여 산화반응

을 수행, 각 대상성분들을 정량적으로 sulfone체로 전환한다. 산화반응조건에서 clethodim과 sethoxydim은 1~2분 사이, profoxydim은 약 3분에서 반응이 완결되는데, 5분 이상 반응을 시켰을 때에는 생성된 sulfone체의 일부가 분해된다. Profoxydim의 경우 1~2분 사이에서 80% 이상 완결되고 그 이후 진행 속도는 완만하다. 산화반응에는 dichloromethane에 녹인 m-CPB, 반응 종결을 위한 sodium thiosulfate 수용액 등이 포함되므로 생성된 반응액의 정제를 위하여 액-액 분배를 수행하는데 생성된 sulfone체는 dichloromethane 2회 분배 추출로 모두 회수된다.

- 반응 분배액의 최종 정제법으로는 Florisil 흡착크로마토그래피법을 사용한다. 용출용매로는 대상 sulfone체들이 극성이 높은 편이므로 용출 강도가 비교적 큰 methanol/acetone/dichloromethane 혼합 용매체계를 사용한다. 대상 sulfone체들은 약하게 해리하는 특성을 나타내므로 산을 첨가하여 용이하게 용출시킬 수도 있으나 산성조건에서의 취약성이 우려된다. Florisil column 상에서 용출 순서는 sethoxydim sulfone, clethodim sulfone 및 profoxydim sulfone 순이며 약하게 해리하는 특성에 따라 다소의 backward tailing 현상이 관찰되므로 용출용매의 양을 다소 늘려 90% 이상의 적정 용출율을 확보한다.

- HPLC에서 이동상은 0.1% acetic acid가 함유된 acetonitrile/water 혼합액을 농도 구배법으로 사용한다. 이동상의 산도를 너무 산성으로 조절할 경우 대상 성분의 분해가 우려되므로 이온억압이 되는 조건에서 최소한의 산성조건을 사용한다. 대상성분의 sulfone체는 모두 sharp한 대칭형 peak로 나타나며 minor peak는 major peak의 1/10이하이므로 major peak만으로 정량한다.

- 제시한 분석법의 정량한계는 0.04 mg/kg이므로 최소 잔류허용기준의 1/2이하를 분석할 수 있는 충분한 감도를 나타낸다. 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 73~113%와 15% 미만이므로 농산물 중 잔류허용기준에 대하여 적부판정을 정확히 수행할 수 있다.

- 잔류분의 재확인을 위한 LC-MS에서 대상화합물들의 sulfone체들은 electrospray ionization (ESI) 조건에서 용이하게 이온화, positive-ion mode에서 $[M+H]^+$ ion이 모두 base peak로서 관찰된다. Clethodim sulfone과 profoxydim sulfone은 분자 내에 염소원자를 1개 함유하고 있으므로 isotope abundance에 따라 $[M+H]^+$:$[M+2+H]^+$의 비율이 100:32로 검출된다. Sethoxydim은 분자 내에 염소원자는 없으나 원소들의 구성비에 따른 isotope abundance가 $[M+1+H]^+$에서 정확히 관찰되므로 SIM용 ion으로 추가 설정, 정성의 신뢰성을 높이는 것이 가능하다.

표 2. 농산물 검체 중 회수율

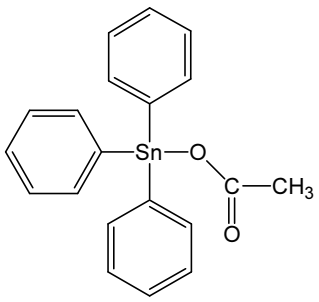
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	고추	배추	대두
Clethodim	0.04	76.0±11.7	90.7±4.5	87.0±3.0	98.5±1.6	91.8±9.4
	0.4	80.2±2.6	82.0±8.4	98.1±3.6	97.2±1.2	85.3±5.9
	2.0	81.4±4.9	90.3±1.4	98.9±4.6	94.8±4.6	92.4±5.0
Profoxydim	0.04	91.1±11.5	85.4±11.2	112.4±12.0	78.9±6.3	81.8±4.0
	0.4	73.4±6.4	82.8±5.7	94.3±2.7	84.7±2.8	84.8±5.2
	2.0	72.5±6.6	98.1±4.3	106.4±0.9	92.6±3.3	74.3±2.6
Sethoxydim	0.04	105.9±9.8	95.7±1.8	113.2±4.4	101.8±4.4	88.4±7.5
	0.4	82.0±1.9	85.3±9.5	100.7±2.5	94.3±2.6	89.8±8.9
	2.0	84.3±8.2	105.9±3.8	95.3±3.3	101.4±3.0	95.5±4.5

8.3.13 잔류농약 분석법 4.1.3.18

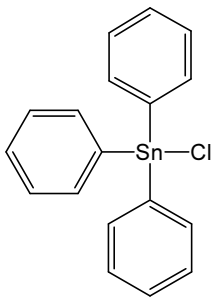
펜틴아세테이트(Fentin acetate), 펜틴클로라이드(Fentin chloride) 및 펜틴하이드록사이드(Fentin hydroxide)

1) 대상 농약의 특성

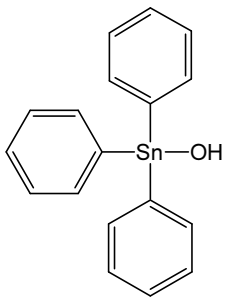
- 분자구조



Fentin acetate



Fentin chloride



Fentin hydroxide

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Fentin acetate	triphenyltin(IV) acetate; triphenyltin acetate
Fentin chloride	triphenyltin(IV) chloride; triphenyltin chloride
Fentin hydroxide	triphenyltin(IV) hydroxide; triphenyltin hydroxide

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Fentin acetate	$C_{20}H_{18}O_2Sn$	409.0	410.0
Fentin chloride	$C_{18}H_{15}ClSn$	385.5	386.0
Fentin hydroxide	$C_{18}H_{16}OSn$	367.0	368.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Fentin acetate	3.54	9	1.9 (60℃)	비해리성
Fentin chloride	4.19	40	0.73 (25℃)	비해리성
Fentin hydroxide	3.54	1	0.0013 (50℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중/day)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fentin acetate	0.0004	0.05	-	-	0.05	0.05	0.1
Fentin chloride	-	0.05	-	-	0.05	0.05	0.1
Fentin hydroxide	0.0004	0.05	-	-	0.05	0.05	0.1

2) 분석법 개요

균질검체에 진한 HBr과 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하고 silica gel column chromatography [용출용매 : acetonitrile/acetic acid(100/0.2, v/v)] 로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

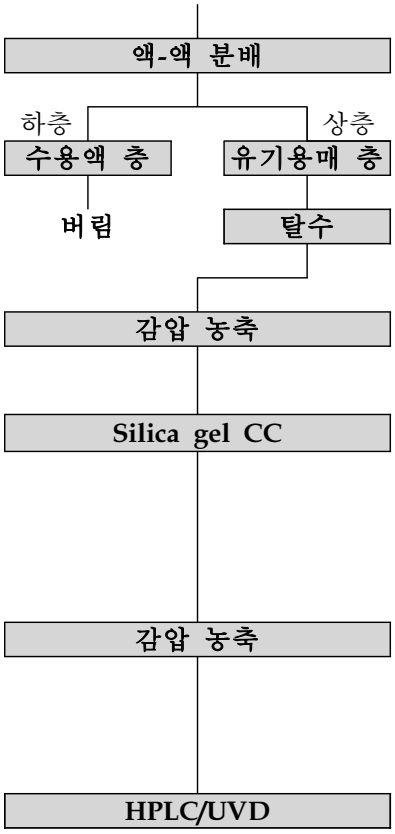
식품 검체
- 검체 25g, 곡류 등 건조 검체에는 물 20mL을 가하여 10분간 습윤화

↓

용매 추출
- Acetone 80mL + 진한 HBr 5mL로 추출
- 5분간 진탕 추출

↓

흡인 여과
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용



- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 400mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 acetonitrile 10mL에 재용해
- Silica gel 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- Acetonitrile 25mL (pre-washing) → 버림
- Acetonitrile 추출액 10mL → 버림
- Acetonitrile 50mL → 버림
- Acetonitrile/acetic acid (100/0.2) 50mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 acetonitrile/3mM HCl 수용액 (45/55, 40mM NaCl 함유) 10mL (채소 및 과실류) 및 4mL (곡류 및 콩류)에 재용해

4) 기기분석법

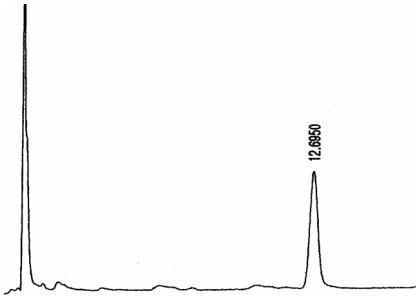


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
fentin hydroxide (12.7분) 20 ng.

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)

검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (3.9 mm i.d. × 150 mm, 4 ㎛) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/3 mM HCl, 5 mM NaCl 함유 (45/55, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 214 nm
분석법의 정량한계 : fentin hydroxide 0.02 mg/kg (fentin acetate 및 fentin chloride는 분석 시 fentin hydroxide로 전환됨.)

5) 재확인법

측정기기 : HPLC (머무름 특성이 상이한 column 또는 이동상 이용)

6) 분석법 해설

- 유기주석계 농약은 살비제로 오랜 기간 사용되어 왔으며 살균제로도 등록되어 있다. 살비제로는 cyhexatin과 유사화합물 그리고 fenbutatin oxide가 대표적이며 살균제로는 fentin oxide 및 그 유도체들이 사용된다. Fentin acetate와 chloride는 azocyclotin이 cyhexatin으로 전환되는 것과 유사하게 살포 후 생체 및 환경 중에서 fentin hydroxide로 신속하게 대사된다. 따라서 fentin acetate와 chloride의 잔류량은 fentin hydroxide 를 기준으로 환산, 표시된다.

- Fentin hydroxide 및 acetate의 물리화학적 특성은 log P_{ow} 값이 3.5 정도로 비극성 화합물이나 주석이 함유된 organometallic 화합물로서 다른 유기 농약과는 상이한 용해도 특성을 나타낸다. 유기주석계 농약은 그 증기압이 매우 낮아 직접 GLC로 분석은 불가능하며 이에 따라 휘발성을 높이기 위하여 Grignard 시약이나 alkylithium 시약을 사용, alkylated derivatives를 합성한 후 이를 고온 GLC로 분석하는 방법이 알려져 있다. 그러나 이들 시약은 이른바 air-sensitive reagent로서 다루기가 매우 까다롭고 또한 고온 GLC 특성상 분석의 재현성도 불량한 단점이 있다.

- 본 분석법은 대상 화합물들을 유도체 형성과정 없이 직접 HPLC로 분석하는 방법이다. Fentin hydroxide를 HPLC로 분석할 때 사용할 수 있는 검출기로는 일반적 HPLC 검출기 중 자외흡광 검출기가 유일하다. 자외선 영역에서 fentin hydroxide는 특정 발색단에 의한 최대흡광 peak는 관찰되지 않으며 잔류분석에서 요구되는 감도를 만족

시킬 수 있는 흡광계수 1×10^{4} $cm^{-1}M^{-1}$ 이상을 나타내는 파장은 220 nm 이하이다. 따라서 검체 중 불순물 혼입에 의한 간섭 가능성이 장파장을 이용할 때보다 상대적으로 높으므로 간섭물질의 효율적 제거 및 분리가 무엇보다도 중요하다.

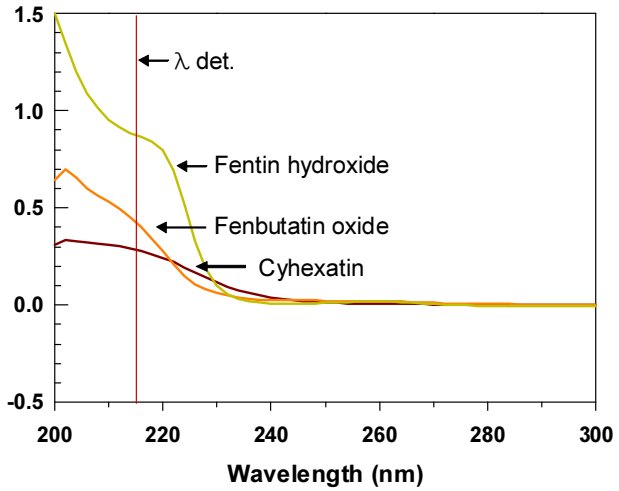


그림 2. Fentin hydroxide의 UV 흡광 spectrum.

- Fentin hydroxide에 대한 HPLC 분석조건에서 이동상으로는 NaCl이 함유된 acetonitrile/HCl 혼합액을 사용한다. NaCl과 HCl이 함유되지 않을 경우 fentin hydroxide는 용출되지 않으며 또한 NaCl과 HCl의 농도가 변화함에 따라 머무름 시간이 민감하게 변화하므로 정확한 농도 조절이 필요하다.

- 추출 용매로는 진한 HBr/acetone 혼합액을 사용하며 이 조건에서 fentin acetate 및 chloride는 fentin hydroxide로 전환된다. 강산조건에서 장시간 추출할 경우 간섭물질이 증가하고 분석성분의 분해도 우려되므로 추출시간 5분을 준수한다.

- 분배용매로는 대상 농약들이 비극성인 점을 이용하여 추출액을 포화식염수/물로 희석한 후 직접 dichloromethane으로 분배하며 2회 분배 추출로 전량이 회수된다.

- 분배 추출액의 추가적 정제법으로는 흡착크로마토그래피법을 공시한다. 예비실험의 결과 SPE-silica (충전제량 1 g)는 검체 추출물의 과다로 overloading 현상이 관찰되었고 분석법의 감도요건 상 검체량을 감소시키기도 어렵다. 따라서 SPE 대신 5 g의

silica gel을 흡착제로 충전한 column을 사용한다. Silica gel column 상에서 fentin hydroxide는 일반적 비극성 농약의 용출 양상과는 상이하게 acetonitrile에서도 용출되지 않으며 소량의 acetic acid를 첨가하였을 때 비로소 용출된다. 따라서 acetonitrile을 세척용 용매로 흘려버림으로써 효율적으로 불순물을 제거할 수 있다.

- 최종검체 용액은 그 정제 정도가 우수하나 HPLC 분석 시 fentin hydroxide 보다 늦게 용출되는 간섭물질이 비교적 많으므로 각 식품 검체별로 늦게 용출되는 성분들의 머무름 시간을 조사, 다음 검체 분석 시까지의 세정시간을 적절히 조절할 필요가 있다.

- Fentin hydroxide은 분자 중 주석을 함유하고 있어 휘발성이 극히 낮으므로 LC-MS에서 분자이온을 검출하기 어렵다. ESI 및 APCI의 이온화 mode 모두에서 분자이온이 검출되지 않는다. 따라서 재확인법은 머무름 특성이 상이한 column을 사용하거나 이동상 중 NaCl과 HCl의 농도가 변화함에 따라 머무름 시간이 민감하게 변화하는 특성을 이용한다. 즉, 변경된 조건으로 검체를 재주입하여 표준물질과의 머무름 시간의 일치 여부를 판정하여 잔류분을 재확인한다.

표 1. 농산물 중 회수율 및 검출한계

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)					정량한계 (mg/kg)
		쌀	감자	콩	사과	밀감	
Fentin hydroxide	0.2	88.3±7.9	94.6±3.2	94.4±3.6	90.3±0.3	94.5±1.5	0.02
	1.0	88.9±1.8	97.6±0.9	93.0±1.7	93.8±2.1	92.3±0.8	

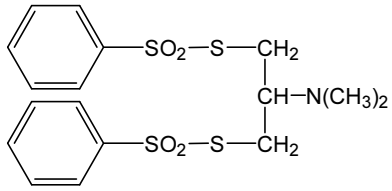
* fentin acetate 및 fentin chloride는 분석시 fentin hydroxide로 전환됨.

8.3.14 잔류농약 분석법 4.1.3.20

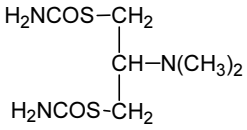
벤설탑(Bensultap), 칼탑(Cartap) 및 티오싸이크람(Thiocyclam)

1) 대상 농약의 특성

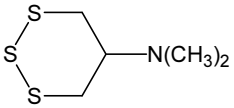
- 분자구조



Bensultap



Cartap



Thiocyclam

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Bensultap	*S,S*-2-dimethylaminotrimethylene di(benzenethiosulfonate)
Cartap*	*S,S*-(2-dimethylaminotrimethylene) bis(thiocarbamate)
Thiocyclam*	*N,N*-dimethyl-1,2,3-trithian-5-ylamine
Nereistoxin**	4-*N,N*-dimethylamino-1,2-dithiolane

* Cartap은 hydrogen chloride, thiocyclam은 hydrogen oxalate 염의 형태로 사용됨.
** 실제 분석성분.

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Bensultap	$C_{17}H_{21}NO_4S_4$	431.6	431.0
Cartap	$C_7H_{15}N_3O_2S_2$	237.4	237.1
Thiocyclam	$C_5H_{11}NS_3$	181.4	181.0
Nereistoxin*	$C_5H_{11}NS_2$	149.3	149.0

* 실제 분석성분.

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Bensultap	2.28 (25℃)	0.448	$<1\times10^{-2}$ (20℃)	비해리성
Cartap*	-	-	2.5×10^{-2} (25℃)	약염기성
Thiocyclam*	-	-	-	약염기성
Nereistoxin**	1.5 (예측치)	-	-	약염기성

* Cartap hydrochloride 및 thiocyclam hydrogen oxalate는 물에 가용이며 증기압은 매우 낮음.

** 실제 분석성분.

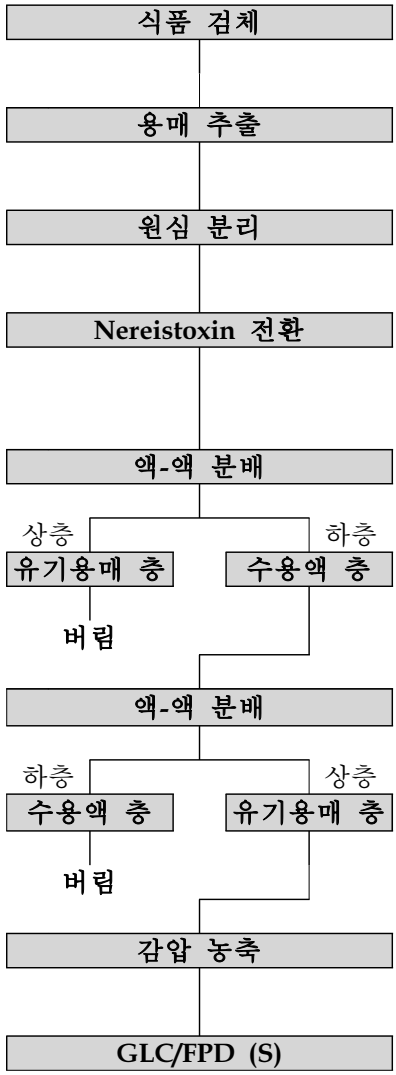
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bensultap	0.034	0.05	0.7	0.1~3.0	-	-	-
Cartap	0.1	0.1	1.0~3.0	0.1~2.0	-	0.1	0.1
Thiocyclam	0.012	0.1	0.5	0.2~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체를 *L*-cysteine이 함유된 염산 수용액으로 진탕 추출하고 원심 분리한다. 추출액에 nickel chloride와 ammonia water를 첨가한 후 70℃에서 진탕하여 대상성분들을 nereistoxin으로 전환시킨다. 반응액의 산도를 약산성으로 조절한 후 *n*-hexane으로 분배, 세정한다. 수용액 층의 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 NaCl을 첨가하고 ethyl acetate로 분배 추출하여 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g (250mL 용량의 PP제 원심분리용 병)
- 2% *L*-Cysteine이 함유된 0.02 N HCl 150mL 첨가
- 30분간 진탕 추출
- 10000×G에서 10분 (4℃)
- 상층액 120mL (검체 20g 해당량)를 취함.
- 3% Nickel chloride 수용액 4mL + 진한 ammonia water 4mL 첨가
- 5분간 진탕 후 70℃에서 1시간동안 혼합 반응
- 10N H_2SO_4 수용액을 첨가하여 pH 5로 조절
- *n*-Hexane 50mL로 분배 추출
- 10000×G에서 10분 (4℃)
- 10N NaOH 수용액을 첨가하여 pH 9로 조절
- NaCl 12g을 첨가한 후 ethyl acetate 100mL로 분배 추출
- 8000×G에서 10분 (4℃)
- 상층액 80mL (검체 16g 해당량)를 취함.
- 40℃에서 약 2mL로 농축 후 자연 건고.
- 건고 후 잔류물을 methanol 2mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 황용 간섭필터 (394 nm)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)

칼럼온도 : 100℃
주입부 온도 : 230℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.03 mg/kg

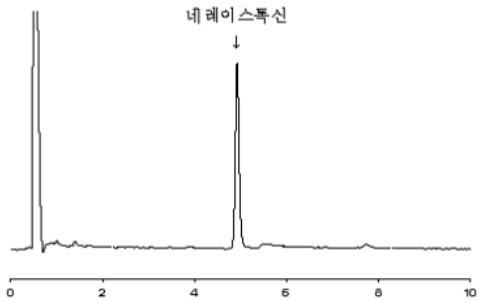


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
nereistoxin (4.9분) 4 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 70℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 150℃로 상승 시킨 후 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 230℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 2 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 50~200

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Nereistoxin	8.9	149	149, 70, 103

6) 분석법 해설

- Bensultap, cartap 및 thiocyclam은 갯지렁이에서 발견되는 천연 독소성분 nereistoxin의 분자구조로부터 유도된 살충제 부류이다. Cartap은 hydrogen chloride, thiocyclam은 hydrogen oxalate 염의 형태로 주로 사용된다. 이들 화합물들은 약제 살포 후 생체 및 환경 중에서 nereistoxin으로 신속하게 변환, 살충력을 나타내게 된다. 따라서 bensultap, cartap 및 thiocyclam의 잔류량은 실제 유효성분인 nereistoxin을 기준으로 총량 환산, 표시된다.

- 추출에는 산성의 HCl 수용액을 사용한다. 또한 추출과정 중에 검체 중 대상성분들이 급격히 산화되는 것을 방지하기 위하여 항산화제로서 *L*-cysteine을 첨가한다. Cartap과 thiocyclam의 염들은 수용성이며 모화합물은 약염기성 화합물이므로 산성의 HCl 수용액을 가하면 수용성의 4차 암모늄이온 형태가 되어 추출된다. Bensultap은 물에 대한 용해도가 낮으나 중성 및 약알칼리성에서는 nereistoxin으로 급격히 분해되므로 산성의 수용액을 사용하는데 추출효율은 비교적 우수하다.

- 추출액은 그 액성의 pH를 약알칼리성으로 조절, 정량적으로 대상 화합물 3종 모두를 동일한 nereistoxin으로 변환한다. Nereistoxin으로의 전환 반응은 다음과 같다.

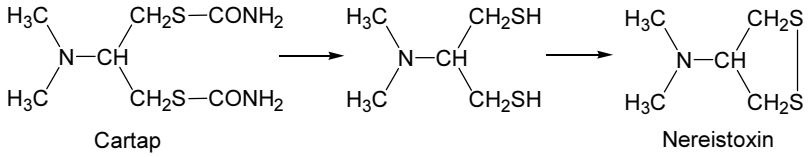


그림 1. Cartap의 nereistoxin으로의 전환 반응

- Nereistoxin은 염기성 화합물이므로 전환 반응액은 ion-associated 분배법에 의하여 정제한다. 즉 nereistoxin은 산성에서는 protonation되어 수용성의 4차 암모늄이온이 되고 유기용매에 녹지 않는다. 반면 alkali 성에서는 비이온성의 3차 amine 형태가 되므로 유기용매에 녹게 된다. 따라서 산성조건에서 유기용매로 분배 추출하여 버림으로써 비극성~극성의 간섭물질을 매우 효과적으로 제거할 수 있다. 이 후 수용액 층의 pH를 alkali 성으로 재차 조절하고 유기용매로 분배 추출하면 nereistoxin이 회수된다. 이러한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이며 FPD 검출기 자체의 선택성과 병용할 경우 별도의 추가 정제과정 없이 GLC 분석이 가능하다.

- Nereistoxin은 휘발성이 강하므로 농축 시 손실이 발생하지 않도록 주의하여야 한다.

감압 농축 시에는 검체액이 건고 (乾固)되면 상당한 nereistoxin이 손실되므로 감압 농축 시에는 소량의 추출액이 남도록 일정 부피까지만 농축하며 최종적으로 자연 상태에서 건고되도록 한다.

- Nereistoxin은 염기성 화합물이므로 GLC 분석 시에 열분해나 흡착 등을 최소화하기 위하여 비극성 column을 사용, 가급적 머무름 시간을 짧게 설정하여 재현성을 확보한다. 또한 분석의 재현성 향상을 위하여 column efficiency는 다소 떨어지더라도 내경 0.53 mm의 모세관 column에 검체 용액을 직접 주입하며 등온조건으로 분석한다. 한편으로는 nereistoxin이 휘발성이 큰 점을 이용하여 머무름 시간은 비교적 짧게 설정하되 DB-WAX와 같은 극성이 높은 liquid phase를 사용하면 tailing 현상이 최소화되고 화합물과 불순물간의 머무름 시간 차이가 커지므로 우수한 분리를 얻을 수 있다.

- Nereistoxin은 분자 내에 황 및 질소 원자를 각각 2개 및 1개 포함하고 있으므로 검출기로는 제시한 FPD외에 NPD도 사용 가능하다. 그러나 선택성 및 안정성을 고려할 때 FPD가 우선적으로 추천한다. FPD는 일반적 phosphorus용 filter가 아닌 sulfur filter를 착용하여야 하며 염광 현상에서 sulfur는 S_2의 형태로 발광하므로 peak 면적의 제곱근이 nereistoxin 양과 직선적으로 비례함을 유의하여야 한다.

- 본 분석법에서 bensultap, cartap 및 thiocyclam은 모두 동일한 nereistoxin으로 변환, 분석되므로 잔류분 발생의 모화합물을 구분할 수 없다. 그러나 모화합물 들의 살포 내역을 알고 있는 경우에는 nereistoxin과의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.

Bensultap 잔류량 (mg/kg) = nereistoxin 잔류량 (mg/kg) × 2.9
[(bensultap 분자량 431.6) / (nereistoxin 분자량 149.3)]

Cartap 잔류량 (mg/kg) = nereistoxin 잔류량 (mg/kg) × 1.6
[(cartap 분자량 237.3) / (nereistoxin 분자량 149.3)]

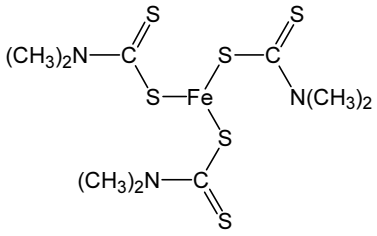
Thiocyclam 잔류량 (mg/kg) = nereistoxin 잔류량 (mg/kg) × 1.2
[(thiocyclam 분자량 181.3) / (nereistoxin 분자량 149.3)]

8.3.15 잔류농약 분석법 4.1.3.21

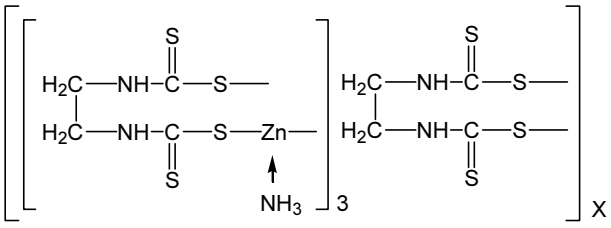
디메칠디치오카바메이트(Dimethyldithiocarbamates),
에텔렌비스디치오카바메이트(Ethylenebis[dithiocarbamate]s)
및 프로피네브(propineb)

1) 대상 농약의 특성

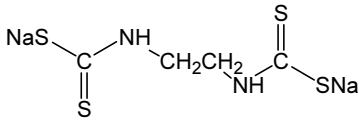
- 분자구조



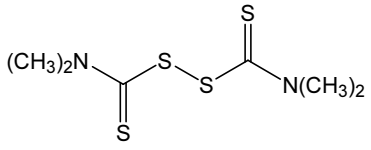
Ferbam



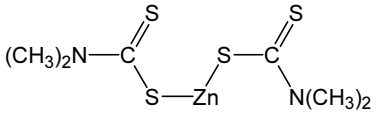
Metiram



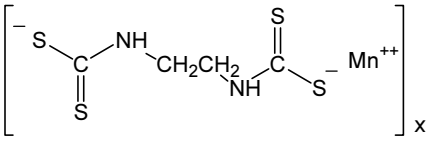
Nabam



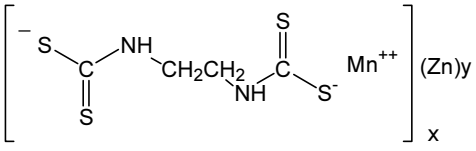
Thiram



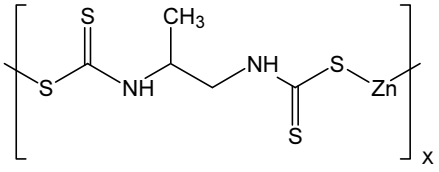
Ziram



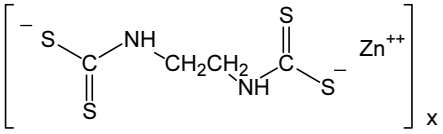
Maneb



Mancozeb



Propineb



Zineb

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Ferbam	iron tris(dimethyldithiocarbamate); iron(lll) dimethyldithiocarbamate
Metiram	zinc ammoniate ethylenebis(dithiocarbamate)-poly(ethylenethiuram disulfide)
Nabam	disodium ethylenebis(dithiocarbamate)
Thiram	tetramethylthiuram disulfide
Ziram	zinc bis(dimethyldithiocarbamate)
Maneb	manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric)
Mancozeb	manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt
Propineb	polymeric zinc 1,2-propylenebis(dithiocarbamate)
Zineb	zinc ethylenebis(dithiocarmate) (polymeric)

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Ferbam	$C_9H_{18}FeN_3S_6$	416.5	415.9
Metiram	$[C_{16}H_{33}N_{11}S_{16}Zn_3]_x$	$(1088.6)_x$	1082.6
Nabam	$C_4H_6N_2Na_2S_4$	256.3	255.9
Thiram	$C_6H_{12}N_2S_4$	240.4	240.0
Ziram	$C_6H_{12}N_2S_4Zn$	305.8	303.9
Maneb	$C_4H_6MnN_2S_4$	265.3	264.9
Mancozeb	$[C_4H_6MnN_2S_4]_xZn_y$	271.2 (조성에 따라 변동)	-
Propineb	$(C_5H_8N_2S_4Zn)_x$	289.8 (monomer)	287.9
Zineb	$C_4H_6N_2S_4Zn$	275.8	273.9

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Ferbam	-1.6	130	-	-
Metiram	0.3	-	〈0.01 (20℃)	-
Nabam	-4.2	200000	1.3×10^{-7} (25℃)	-
Thiram	1.7	18	2.3 (25℃)	-
Ziram	1.2	1.58~18.3	$\langle 1\times10^{-3}$	-
Maneb	-0.5	178	0.014 (25℃)	-
Mancozeb	0.3	6.2	$\langle 1.3\times10^{-2}$ (20℃)	10.3
Propineb	-	10	$\langle 1.6\times10^{-7}$ (20℃)	-
Zineb	≤1.3	10	〈0.01 (20℃)	-

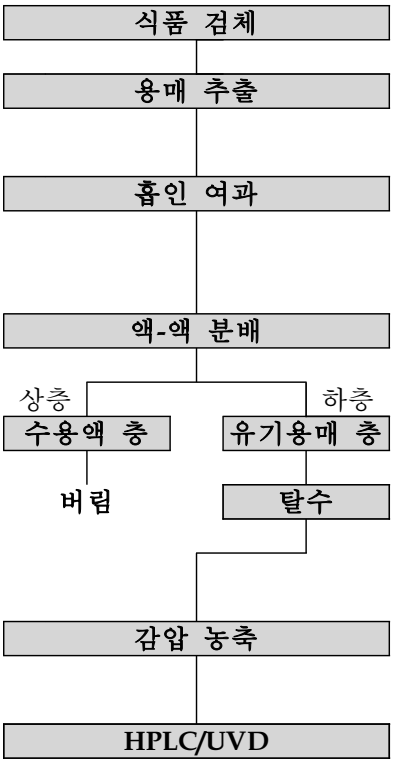
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Ferbam	0.003	0.05	0.3~10.0	0.5~5.0	-	0.1	-
Metiram	0.03	-	0.5~5.0	0.3~7.0	-	-	0.3
Nabam	-	-	0.5~5.0	0.3~7.0	-	-	0.3
Thiram	0.01	0.05	0.3~10.0	0.5~5.0	-	0.1	-
Ziram	0.003	0.05	0.3~10.0	0.5~5.0	-	0.1	-
Maneb	0.03	-	0.5~5.0	0.3~7.0	-	-	0.3
Mancozeb	0.03	-	0.5~5.0	0.3~7.0	-	-	0.3
Propineb	0.007	-	0.5~5.0	0.2~5.0	-	2.0	0.2
Zineb	0.03	-	0.5~5.0	0.3~7.0	-	-	0.3

2) 분석법 개요

농산물 검체를 크게 절단한 후 약알칼리성의 EDTA-NaOH 수용액으로 신속히 진탕 추출하고 흡인 여과한다. 여액의 pH를 중성으로 조절하고 phase transfer reagent인 tetrabutylammonium 이온이 존재하는 상태에서 methyl iodide와 반응시켜 생성된 methyl 유도체를 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 간략히 크게 절단한 검체 20g
- 0.45M NaOH 수용액 (0.25M EDTA 함유, pH 9.5~9.6) 80mL + L-cysteine 0.5g 첨가 후 즉시 10분간 진탕 추출
- Glass-fiber filter 사용, 신속 여과
- 여액에 0.41M tetrabutylammonium hydrogen sulfate 수용액 5mL + NaCl 10g 첨가
- 2M HCl로 pH 7.0으로 신속 조절
- 0.05M methyl iodide 함유 dichloromethane/*n*-hexane (50/50) 30mL + 10mL 2회 분배 추출 (각 5분간 진탕)
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 30분간 실온에서 방치
- Dichloromethane에 녹인 20% 1,2-propanediol 5mL 첨가
- 30℃에서 1,2-propanediol만 남을 때까지 농축
- Methanol 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 150 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/methanol/물 (25/15/60, v/v/v)

이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 272 nm

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Dithiocarbamate계 살균제는 광범위한 병해에 효과적인 보호용 비침투성 살균제로 오랜 기간 동안 과실 및 채소류를 위시하여 곡류, 서류 등 다양한 작물에 다량 사용되고 있다. 이 부류의 살균제는 화학구조 상 dimethyldithiocarbamate의 금속 염 또는 착염 형태와 alkylenebisdithiocarbamate의 금속 복염 또는 착염의 형태로 대별된다. 각 부류마다 다양한 화합물들이 전세계적으로 등록 사용되는데 국내에서 가장 많이 사용되는 화합물은 mancozeb과 propineb이다.

- Dithiocarbamate계 살균제 화합물들은 thiram을 제외하고는 물 및 각종 유기용매에 매우 난용이다. 따라서 잔류분의 추출 및 정제에 이용할 수 있는 방법이 매우 제한적이므로 잔류분석이 가장 어려운 화합물 부류 중의 하나이다. Dithiocarbamate계 살균제에 대한 잔류분석법으로서 가장 잘 알려진 방법은 검체를 $SnCl_2$/HCl로 습식 분해, dithiocarbamate moiety 중 CS_2를 발생시키고 이를 발색시약에 포집하여 가시광 분광분석하거나 headspace 중으로 발생된 CS_2를 직접 GLC로 분석하는 방법이다. 그러나 이 방법들은 CS_2 총량으로 분석하기 때문에 각 화합물 부류별 잔류분을 구별할 수 없고 특정 검체별로 천연의 CS_2 또는 유사 기체에 의한 간섭이 관찰되는 등 재현성이 불량한 단점이 있다.

- 본 분석법은 dimethyldithiocarbamates와 alkylenebisdithiocarbamate 부류에 따라 별개의 유도체를 형성, HPLC로 분석하는 방법인데 분석조건이 매우 민감하므로 분석과정별로 세심한 주의가 필요하다.

- 추출에는 dithiocarbamate계 화합물들이 거의 유일하게 용해되는 약알칼리성의 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-Na염 수용액을 사용하며 신속히 추출 작업을 진행한다. 이 때 검체 분쇄과정 중에 함유되어 있는 효소에 의한 대상성분의 분해를 최소화하기 위하여 검체는 크게 절단하며 L-cysteine을 첨가하여 추가적으로 분해를 방지한다.

Dithiocarbamate계 살균제들은 비침투성으로 대부분의 잔류분은 검체 표면에 존재하므로 검체내의 잔류분까지 전량 추출해야하는 일반적 잔류농약의 추출법과는 상이하다.

- 추출액은 대상성분의 분해를 최소화하기 위해서 신속히 여과하고 pH를 중성으로 조절한다. 수용성 추출액에 수용액/유기용매 층간 phase transfer reagent로서 작용하는 tetrabutylammonium ion을 첨가하고 분배효율을 높이기 위한 NaCl을 추가한 후methyl iodide가 함유된 dichloromethane/*n*-hexane 혼합용액으로 빠르게 분배한다. 이 과정에서 dithiocarbamate계 화합물들은 methyl iodide와 반응, methyl 유도체를 형성하고 동시에 유기용매 층으로 분배된다. Methylation 반응을 완결시키기 위하여 실온에서 30분간 방치한다.

- 화합물 군별 분석반응의 원리는 다음과 같다. Thiram과 dimethylcarbamate 금속염은 최종적으로 methyl *N,N*-dimethylcarbamate로 전환되며 alkylenebisdithiocarbamate 금속염은 dimethyl alkylenebisdithiocarbamate를 형성한다. 따라서 propineb은 zineb, maneb 및 mancozeb과는 다른 유도체를 형성하므로 개별적 분석이 가능하게 된다.

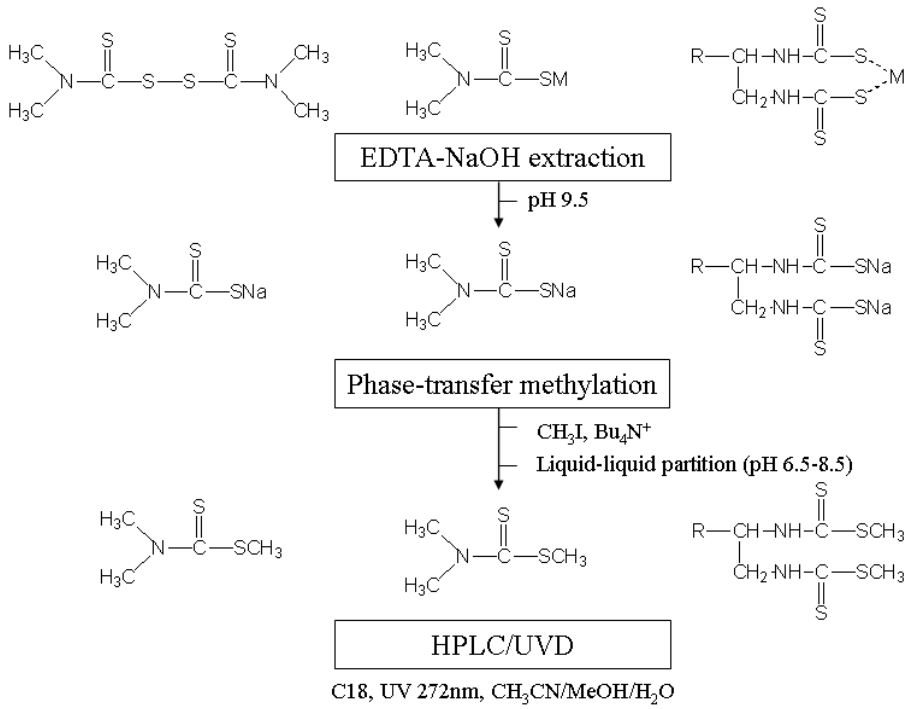


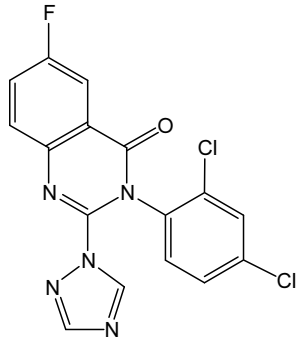
그림 1. Dimethyldithiocarbamate 및 ethylenebisdithiocarbamate계 농약의 분석 과정

8.3.16 잔류농약 분석법 4.1.3.22

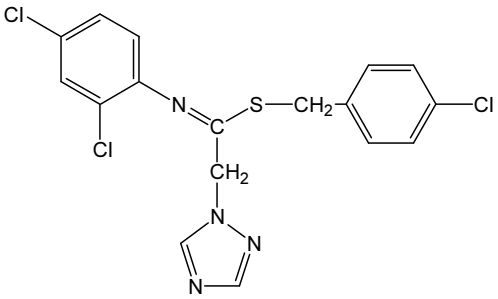
플루퀸코나졸(Fluquinconazole), 이미벤코나졸(Imibenconazole)

1) 대상 농약의 특성

- 분자구조



Fluquinconazole



Imibenconazole

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Fluquinconazole	3-(2,4-dichlorophenyl)-6-fluoro-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)quinazolin-4(3*H*)-one
Imibenconazole	*S*-(4-chlorobenzyl) *N*-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)acetimidothioate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Fluquinconazole	$C_{16}H_8Cl_2FN_5O$	376.2	375.0
Imibenconazole	$C_{17}H_{13}Cl_3N_4S$	411.7	410.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Fluquinconazole	3.24	1.15 (20℃)	6.4×10^{-6} (20℃)	비해리성
Imibenconazole	4.94	1.7 (20℃)	8.5×10^{-5} (25℃)	비해리성

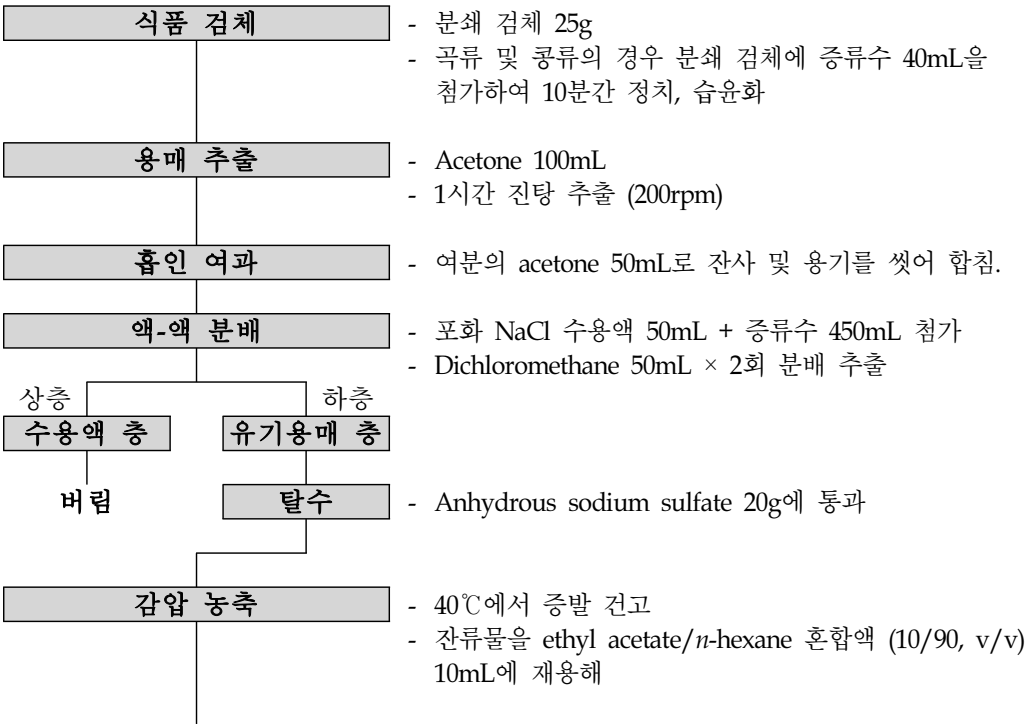
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

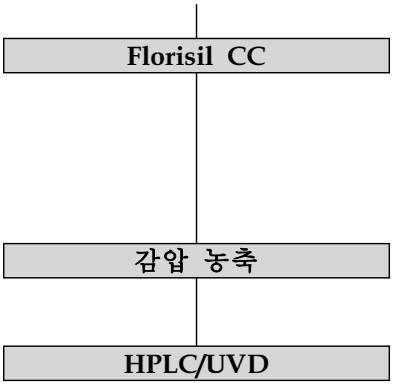
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fluquinconazole	0.005	-	0.3~3.0	0.1~3.0	-	-	-
Imibenconazole	0.0085	-	0.2~2.0	-	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 마쇄 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Florisil (60~100mesh), 10g
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (15/85) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (45/55) 100mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (60/40) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (65/35, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 243 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : fluquinconazole 및 imibenconazole 각 0.02 mg/kg

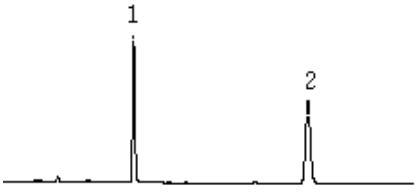


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
1, fluquinconazole (6.7 분); 2, imibenconazole (14.4 분) 각 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
검체주입량 : 10 μL
이온화법 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 80 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. LC-MS의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석 성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Fluquinconazole	4.4	375	376
Imibenconazole	8.4	410	411

6) 분석법 해설

- 대상 화합물들은 분석법 4.1.3.23의 대상성분들과 유사한 EBI계 살균제로서 log P_{ow} 값이 3.2~4.9 범위인 비교적 극성이 낮은 성분들이다. 다만 본 분석법의 대상성분들은 bridge내 특정 탄소가 비키랄성이므로 enantiomer가 존재하지 않으며 이에 따라 단일 성분으로 존재한다.

- 분석성분들은 휘발성이 8.5×10^{-5}~6.4×10^{-6} mPa로 매우 낮고 특히 imibenconazole의 경우 분자 내에 imino기를 함유하고 있어 열에 취약하므로 분석법 4.1.3.23에서 사용한 GLC/NPD는 기기분석법으로 적당하지 않다. 따라서 기기분석법으로는 HPLC/UVD 법을 이용한다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제

거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. Acetone 추출액을 물로 희석하고 포화 NaCl 수용액을 첨가하여 dichloromethane으로 분배하는 방법은 농축과정을 생략할 수 있어 간편하고 비극성 또는 중간 극성인 대상 화합물 모두에 대하여 우수한 분배효율을 나타낸다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액 중 ethyl acetate 비율을 달리하여 세정 및 용출시켰을 때 최종용액 중에 일부 황색 색소 등이 함께 존재하나 전체적으로 그 정제 정도가 우수하여 충분히 HPLC로 분석이 가능하다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에서 최종용액 중 불순물 함량이 높아 직접 기기분석이 곤란한 경우에는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. 즉, dichloromethane 분배 추출액을 증발, 건고한 후 잔류물을 40 mL의 *n*-hexane (미리 acetonitrile로 포화시킴.)에 재용해하고 분액여두에 옮겨 *n*-hexane으로 미리 포화시킨 acetonitrile 30 mL 씩으로 2회 분배 추출한다. 대상성분의 분배 효율은 90% 이상이며 대부분 (60~90%)의 유지성분을 효과적으로 제거할 수 있다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제 정도가 미미하다.

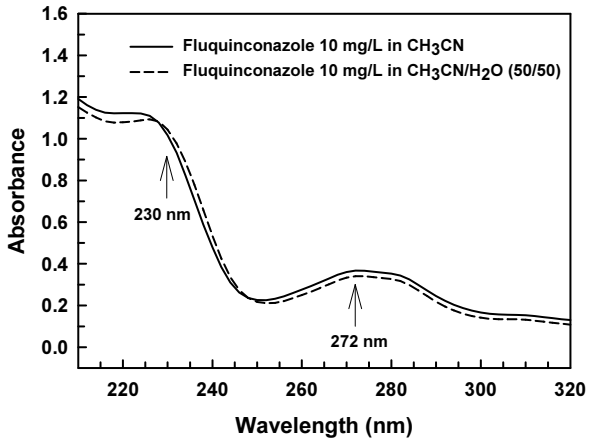


그림 2. Fluquinconazole의 UV spectrum.

- 대상 화합물들은 비극성의 비해리성 화합물이므로 C_{18}을 사용한 역상 HPLC에서 단순한 acetonitrile/물 혼합액을 이동상으로 사용하여도 대칭형의 sharp한 peak 모양을 얻을 수 있다. 자외흡광검출기에서의 측정파장 243 nm는 imibenconazole의 최대흡광파장 (λmax) 243 nm을 기준으로 설정되었는데 이는 imibenconazole이 fluquinconazole에 비하여 흡광계수가 상대적으로 작아 감도가 낮기 때문이다. Fluquinconazole의 λmax은 224 및 272 nm이며 파장별 흡광계수는 각각 4.1×10^4 및 1.3×10^4 $cm^{-1}M^{-1}$이고 230 nm에서의 흡광계수도 3.9×10^4 $cm^{-1}M^{-1}$로 매우 높다. 따라서 fluquinconazole 만을 개별적으로 분석하고자 할 경우, 높은 감도를 위해서는 230 nm, 선택성 측면에서는 272 nm를 선정하여 정량하는 것이 보다 유리하다.

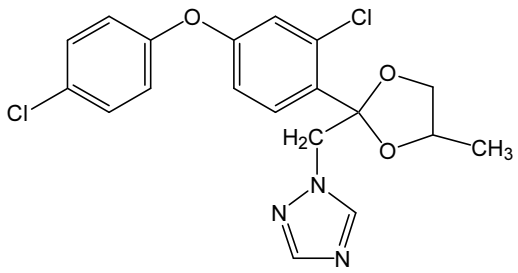
- LC-MS 재확인법에서 fluquinconazole과 imibenconazole은 분자 내에 lone pair를 보유한 질소 원자가 4~5개 존재하여 protonation이 용이하므로 이온화법으로는 ESI, positive ion법이 최선이다. $[M+H]^+$ ion은 충분한 intensity로 관찰되므로 감도 측면에서의 문제는 없다. 또한 분자 내에 존재하는 chlorine의 수에 따라 fluquinconazole과 imibenconazole에서 $[M+H]^+$:$[M+2+H]^+$:$[M+4+H]^+$의 intensity가 약 100:64:10 및 100:96:31의 비율로 나타므로 SIM channel을 $[M+H]^+$, $[M+2+H]^+$ 및 $[M+4+H]^+$로 동시 설정할 경우 높은 감도와 함께 정확한 구조의 재확인이 가능하다.

8.3.17 잔류농약 분석법 4.1.3.23

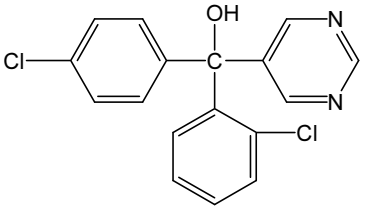
디페노코나졸(Difenoconazole), 페나리몰(Fenarimol),
펜부코나졸(Fenbuconazole), 헥사코나졸(Hexaconazole),
마이클로부타닐(Myclobutanil), 누아리몰(Nuarimol),
파클로부트라졸(Paclobutrazol)

1) 대상 농약의 특성

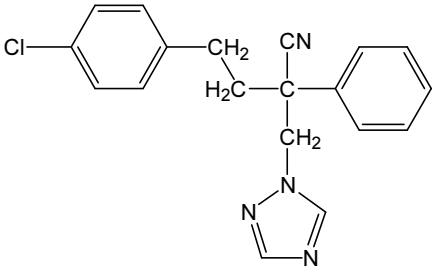
- 분자구조



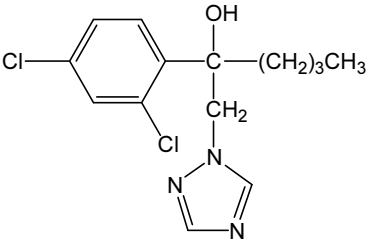
Difenoconazole



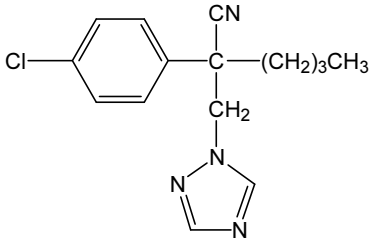
Fenarimol



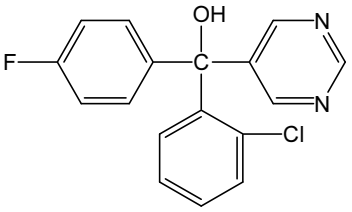
Fenbuconazole



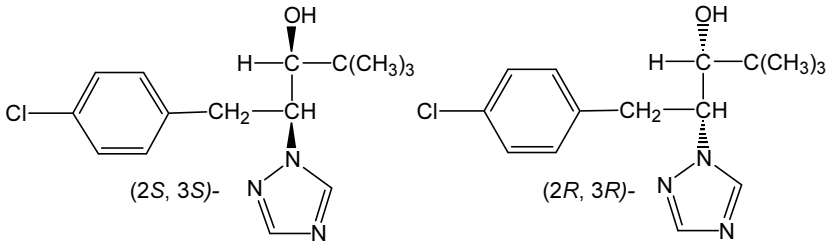
Hexaconazole



Myclobutanil



Nuarimol



Paclobutrazol

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Difenoconazole	*cis,trans*-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether
Fenarimol	(±)-2,4'-dichloro-α-(pyrimidin-5-yl)benzhydryl aclohol
Fenbuconazole	4-(4-chlorophenyl)-2-phenyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)butyronitrile
Hexaconazole	(*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol
Myclobutanil	2-*p*-chlorophenyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile
Nuarimol	(±)-2-chloro-4'-fluoro-α-(pyrimidin-5-yl)benzhydryl alcohol
Paclobutrazol	(2*RS*,3*RS*)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Difenoconazole	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	406.3	405.1
Fenarimol	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$	331.2	330.0
Fenbuconazole	$C_{19}H_{17}ClN_4$	336.8	336.1
Hexaconazole	$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$	314.2	313.1
Myclobutanil	$C_{15}H_{17}ClN_4$	288.8	288.1
Nuarimol	$C_{17}H_{12}ClFN_2O$	314.7	314.1
Paclobutrazol	$C_{15}H_{20}ClN_3O$	293.8	293.1

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Difenoconazole*	4.4	15	3.3×10^{-5} (25℃)	1.1 (짝산)
Fenarimol	3.7	13.7	6.5×10^{-2} (25℃)	비해리성
Fenbuconazole	3.2	3.8	3.4×10^{-1} (25℃)	비해리성
Hexaconazole	3.9	17	1.8×10^{-2} (20℃)	비해리성
Myclobutanil	2.9	132	2.0×10^{-1} (20℃)	비해리성
Nuarimol	3.2	26	$<2.7\times10^{-3}$ (25℃)	비해리성
Paclobutrazol*	3.2	26	1.9×10^{-3} (20℃)	비해리성

* 부분입체이성질체의 혼합물.

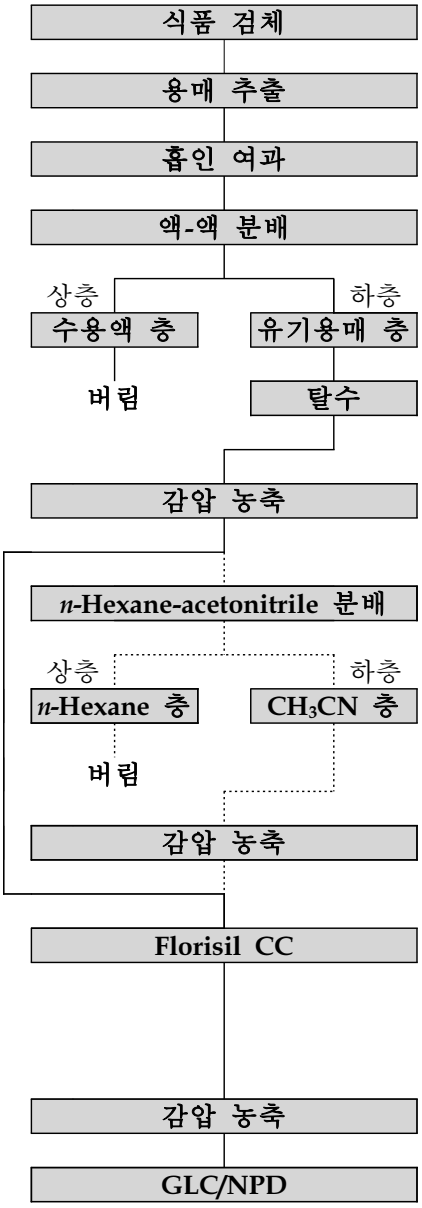
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Difenoconazole	0.01	0.1~0.2	0.2~1.0	0.05~2.0	-	0.1	0.1
Fenarimol	0.01	0.3	0.1~2.0	0.05~1.0	-	0.1	-
Fenbuconazole	0.03	0.05~0.2	0.3~3.0	0.2~3.0	-	0.1	-
Hexaconazole	0.005	0.2~0.3	0.1~1.0	0.05~1.0	0.5	0.05	-
Myclobutanil	0.03	0.3~0.5	0.2~2.0	0.1~5.0	-	-	-
Nuarimol	-	-	0.1~0.3	0.1~0.2	-	-	-
Paclobutrazol	0.1	-	0.05~0.5	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 균질 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압농축하고 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하여 유지 및 비극성 방해물질을 제거한다. 최종적으로 Florisil column chromatography 법 [용출용매 : ethyl acetate/dichloromethane (30/70, v/v)]으로 추출액을 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 건조 검체의 경우 물 20mL를 가하여 10분간 습윤화
- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- **곡류 및 콩류 등 유지검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배추출
- 건고 후 dichloromethane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- Dichloromethane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Dichloromethane 100mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (30/70) 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)

검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 및 DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)

칼럼온도 :	DB-5	DB-17
nuarimol	190℃	230℃
difenoconazole	250℃	250℃
myclobutanil	190℃	200℃
paclobutrazol	190℃	200℃
fenarimol	230℃	250℃
fenbuconazole	230℃	250℃
hexaconazole	190℃	200℃

주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15 mL/min
주입량 : 2 μL
분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Difenoconazole	0.04	Myclobutanil	0.01
Fenarimol	0.01	Nuarimol	0.02
Fenbuconazole	0.02	Paclobutrazol	0.01
Hexaconazole	0.02		

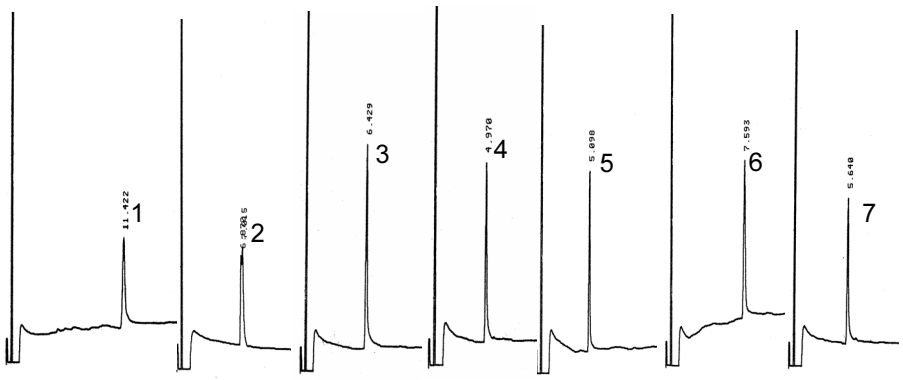


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램 (DB-5)

1, nuarimol (11.4분); 2, difenoconazole (6.7분, 6.8분); 3, myclobutanil (6.4분); 4, paclobutrazol (5.0분); 5, fenarimol (5.1분); 6, fenbuconazole (7.6분); 7, hexaconazole (5.6분), 각 4 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것 (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 20℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 240℃에서 2분간 유지한다. 다시 2℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 280℃
Interface 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 2 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless (purge time 1.0분)
분자량 범위 : 100~500

표 1. GC-MS 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Nuarimol	17.9	314	235, 314, 219
Difenoconazol	31.6, 31.8	405	323, 265, 325, 267
Myclobutanil	15.3	288	179, 152, 125
Paclobutrazol	14.6	293	236, 125, 207
Penarimol	22.1	330	251, 219, 330
Fenbuconazole	25.4	336	198, 129
Hexaconazole	15.0	313	214, 216, 231, 175

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 difenoconazole, fenarimol, fenbuconazole, hexaconazole, myclobutanil, nuarimol 및 paclobutrazol은 EBI계 농약으로 log P_{ow} 값이 2.94~4.40 범위인 비교적 극성이 낮은 성분들이다. 이들 농약은 aryl-aryl 또는 aryl-alkyl의 bridge구조를 가지고 있으며 bridge내 특정 탄소에 함질소 aromatic group (triazole 또는 pyrimidine)이 결합되어 있는 점이 특징적이다. 대상 농약성분의 bridge내 특정 탄소는 키랄성이므로 enantiomer가 존재하나 광학활성을 제외한 물리적 특성이 동일하므로 일상적 크로마토그래피에서는 분리되지 않는다. Difenoconazole과 paclobtrazol은 분자 내에 2개의 chiral carbon을 갖고 있어 diastereoisomer가 존재하며 물리적 특성이 상이하므로 크로마토그래피에서 column의 분리능에 따라 보통 2개의 분리 peak로 나타난다.

- 분석성분들은 전형적인 EBI계 농약으로서 휘발성이 어느 정도 있는 것으로 알려져 있으므로 기기분석법으로는 GLC가 가능하다. 대상 화합물들의 분자구조 내에 모두 2개 이상의 질소를 함유하고 있으므로 검출기는 NPD를 채용한다. 분리용 column으로는 화합물들의 극성을 고려하여 중간 또는 극성의 DB-5 및 DB-17 2종을 채용, 일상적 분석과 재확인 과정에 병행 사용한다. Difenoconazole은 염기성 화합물이나 짝산의 pKa가 1.1로 알려져 있어 그 해리 정도가 매우 약하이므로 비해리 중성 화합물로 취급, 분석하여도 무리가 없다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. Acetone 추출액을 물로 희석하고 포화 NaCl 수용액을 첨가하여 dichloromethane으로 분배하는 방법은 농축과정을 생략할 수 있어 간편하고 비극성 또는 중간 극성인 대상 화합물 모두에 대하여 우수한 분배효율을 나타낸다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/dichloromethane 혼합액으로 구성된 세정 및 용출 용매체계는 두 용매가 비슷한 극성이면서도 흡착제에 대한 용출강도가 서로 다른 특성을 최대한 이용한 것이다. 기기분석을 위한 최종용액은 일부 황색 색소 등이 함께 존재하나 전체적으로 그 정제정도가 우수하여 GLC에 연속적으로 검체주입이 가능하다.

- 대상 화합물 들은 GLC 분석 대상농약 중 휘발성이 다소 낮은 편이며 극성이 어느 정도 있는 화합물이 포함되어 있으므로 0.25나 0.32 mm 내경의 capillary column을 승온조건으로 하여 splitless 주입법을 사용할 경우 재현성이 불량할 가능성이 높다. 따라서 충분히 conditioning된 내경 0.53 mm의 capillary column을 등온조건으로 채용하고 packed inlet 상에서 직접 검체 주입하는 방법을 사용하면 비교적 용이하게 우수한 재현성을 얻을 수 있다. Difenoconazole과 paclobutrazol은 diasteroisomer 존재로

인하여 분리능이 높은 column에서는 인접한 2개의 peak로 나타나는데 이를 column 분리능의 평가 척도로 사용할 수 있다. 즉, 오염되지 않은 column에서의 분리능과 비교하여 10% 이상의 분리능 저하가 관찰될 경우 column을 교체하거나 선단의 일부를 절단한 후 재 conditioning 해야 하는 시기로 판단할 수 있다.

표 2. 농산물 중 회수율

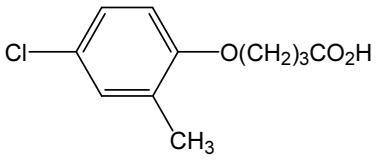
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	고추	배추	사과	감귤
Nuarimol	0.2	93.7±6.4	91.7±7.5	86.8±0.4	107.2±2.1	99.0±3.8
	1.0	89.2±8.2	98.7±1.2	91.5±3.8	106.0±1.9	101.9±3.4
Difenoconazol	0.4	95.9±9.4	95.9±2.1	96.0±5.7	97.0±4.7	94.5±3.8
	2.0	96.6±3.3	94.1±4.8	98.4±1.4	96.0±6.8	93.5±2.1
Myclobutanil	0.1	93.5±5.7	88.5±5.9	81.1±1.4	89.3±1.9	96.6±0.6
	0.5	84.9±4.9	91.7±1.4	83.3±1.1	91.1±4.1	97.2±3.7
Paclobutrazol	0.1	95.1±7.5	87.6±1.4	83.3±0.5	97.0±3.9	90.9±1.7
	0.5	89.1±6.4	92.3±7.5	84.9±0.9	96.1±2.1	92.5±1.9
Fenarimol	0.1	93.2±6.0	94.3±6.2	99.0±5.9	99.7±2.3	103.2±4.7
	0.5	91.7±3.9	87.9±4.9	103.2±6.6	95.4±3.5	96.2±2.2
Fenbuconazole	0.2	103.4±3.2	85.6±1.4	91.7±4.3	92.1±9.1	95.4±2.0
	1.0	98.2±4.3	92.5±7.4	99.8±5.7	97.1±7.2	90.6±2.0
Hexaconazole	0.2	94.0±6.6	86.4±6.1	85.7±1.8	94.8±1.6	90.1±0.3
	1.0	87.3±5.7	82.5±1.9	87.1±1.7	95.2±2.6	94.5±1.4

8.3.18 잔류농약 분석법 4.1.3.24

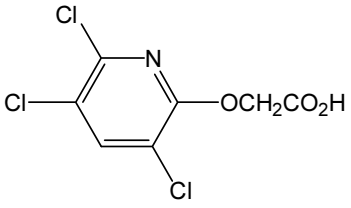
엠씨피비(MCPB) 및 트리클로피르(Triclopyr)

1) 대상 농약의 특성

- 분자구조



MCPB



Triclopyr

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
MCPB	4-(4-chloro-*o*-tolyloxy)butyric acid
Triclopyr	3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
MCPB	$C_{11}H_{13}ClO_3$	228.7	228.1
Triclopyr	$C_7H_4Cl_3NO_3$	256.5	254.9

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
MCPB	〉2.37 (pH 5) 1.32 (pH 7) -0.17 (pH 9)	110 (pH 5) 4400 (pH 7) 444000 (pH 9)	5.77×10^{-2} (20℃)	4.84, 약산성
Triclopyr	0.42 (pH 5) -0.45 (pH 7) -0.96 (pH 9)	7690(pH 5) 8100(pH 7) 8220(pH 9)	0.2 (25℃)	3.97, 약산성

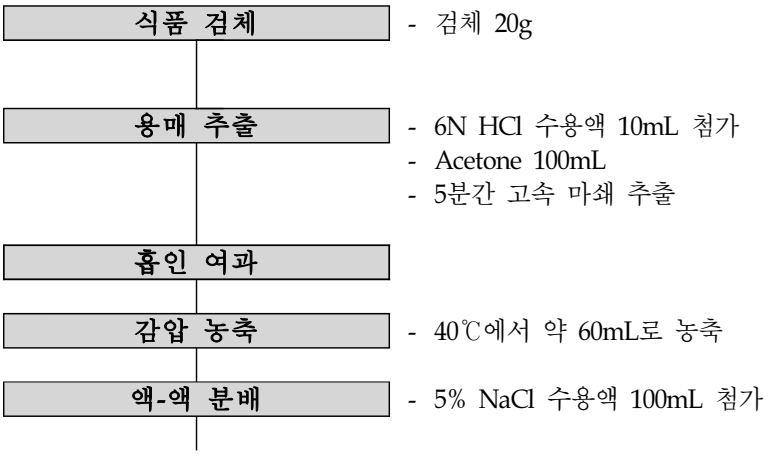
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

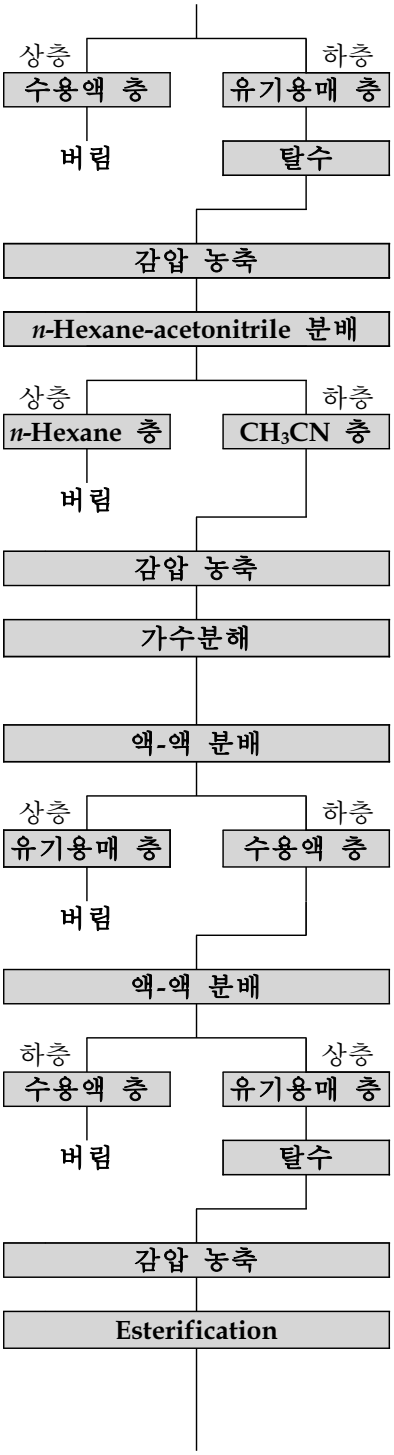
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
MCPB	0.01	0.1	-	-	0.1	-	-
Triclopyr	0.005	0.3	0.1	-	-	-	-

2) 분석법 개요

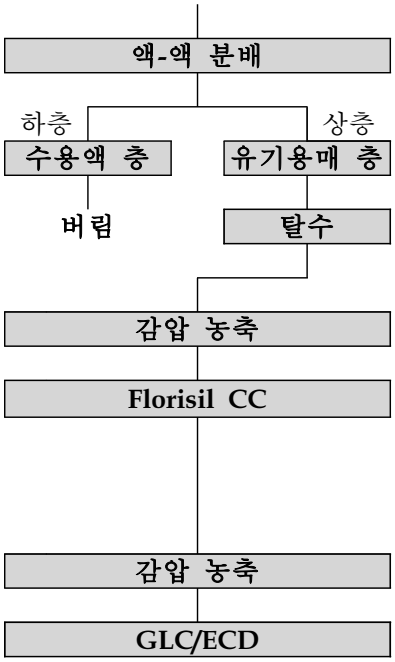
균질검체를 산성화한 후 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 ester와 acid를 동시에 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 감압 농축, 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가한 후 ethyl ether로 ester와 acid를 모두 분배 추출한다. Ether 추출액을 탈수 후 감압 농축 건고하고 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 간섭물질을 제거한다. 추출물에 methanol과 NaOH를 가하여 염기성 조건에서 가수분해, ester를 acid로 전환한 후 ion-associated 분배법으로 가수분해 액을 정제한다. 정제액 중 대상 acid 성분을 pentafluorobenzylation한 후 반응액을 재차 *n*-hexane으로 액-액 분배하여 정제하고 Florisil column chromatography [용출용매 : ethyl acetate/*n*-hexane (30/70, v/v)]로 최종 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Ethyl ether 100mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- 건고 후 methanol 25mL에 재용해
- 1N NaOH 수용액 25mL 첨가
- 80℃에서 30분간 환류
- 5% NaCl 수용액 100mL 첨가
- Ethyl ether 100mL로 분배 추출하여 버림.
- 6N HCl로 pH 1이하로 조절
- Ethyl ether 100mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 acetone 10mL에 재용해
- Acetone에 용해한 1% pentafluorobenzyl bromide 용액 1mL + 30% K_2CO_3 수용액 0.1mL 첨가 후 밀봉
- 50℃에서 1시간 반응 후 방냉



- 5% NaCl 50mL 첨가
- *n*-Hexane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 *n*-hexane 5mL에 재용해
- Florisil 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) + 검체용액 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 50 m, 1.0 μm)
칼럼온도 : 60℃에서 검체를 주입하고 1분간 유지한 후 20℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 250℃에서 일정시간 유지되도록 적절히 조절한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen을 적절하게 조절한다.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- MCPB와 triclopyr는 전형적인 흡수 이행형의 auxin계 제초제이며 acid 뿐만 아니라 ester나 염의 형태로도 등록 사용되고 있다. Ester의 경우 유제와 같은 전면살포용 제형 제조를 위하여 화학구조를 변경한 형태로서 살포 후 환경 및 식물체 중에서 신속하게 대사되어 acid를 방출하며 실제 제초 및 유효성분은 acid 형태이다. 따라서 잔류량은 실제적 유효성분인 acid를 기준으로 총량 환산, 표시된다.

- MCPB와 triclopyr는 pKa가 각각 4.8 및 4.0인 약산성 화합물이므로 GLC로 직접 분석하는 것은 어렵다. 또한 흡광계수가 상당한 장파장의 발색단이나 형광단이 분자 내에 존재하지 않으므로 HPLC로 분석하기에 적절한 검출기가 없다. 따라서 carboxylic acid를 ester화하여 비극성의 휘발성 유도체를 형성, GLC로 분석하는 것이 보편적이다. Triclopyr의 경우는 분자 내에 3개의 염소 원자를 함유하고 있어 ECD 검출기에 대한 반응성이 우수하나 MCPB에는 1개의 염소 원자만을 함유하고 있어 ECD에 대한 반응정도가 너무 낮아 잔류분석에서 요구되는 감도를 달성할 수 없다. 따라서 본 분석법에서는 pentafluorobenzylation에 의하여 MCPB에 5개의 불소 원자를 도입, ECD에 대한 반응성을 대폭 향상시킨다. Pentafluorobenzyl 유도체의 형성 반응은 그림 1과 같다.

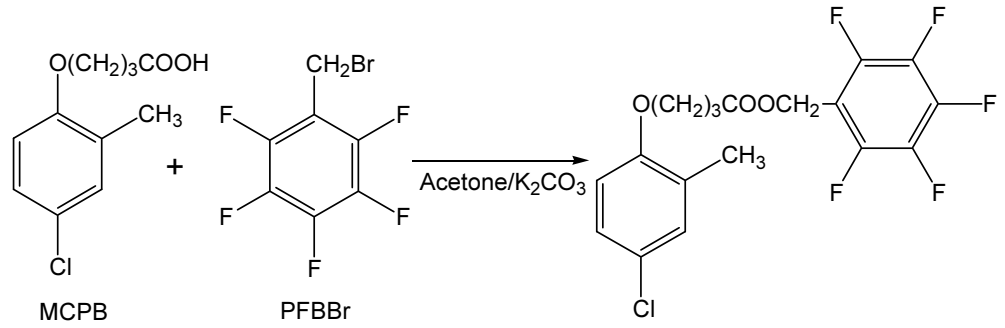


그림 1. MCPB의 pentafluorobenzyl ester 형성 반응

- 추출은 일반적인 약산성 농약의 추출방법을 사용한다. 즉, 검체를 산성화하고 acetone으로 추출하며 이때 ester가 함께 추출된다. Ester는 대부분 이 조건에서 안정하나 일부가 acid로 가수분해 된다 하더라도 acid가 분석 대상성분이므로 분석 상의 문제점은 발생하지 않는다. 따라서 이온억압을 위한 triclopyr의 pKa 4.0을 고려하여 pH는 2 이하가 되도록 충분한 산을 첨가한다.

- 추출액의 1차 분배는 산성의 추출액에 NaCl 수용액을 첨가, 이온강도를 높이고 ethyl ether로 분배하여 acid와 ester를 함께 분배 추출한다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 및 비극성 간섭물질을 먼저 제거하여 가수분해 반응에서 발생하는 간섭물질을 미리 최소화하기 위한 과정이다.

- 가수분해는 methanolic NaOH 조건에서 수행하며 대상성분의 ester는 그 결합의 취약성으로 인하여 용이하게 acid로 분해된다. Acid 전환 후에는 ion-associated 분배법을 이용하여 반응액을 정제한다. 즉, 알칼리성의 가수분해액 중에서 대상 acid 성분들은 수용성이므로 ether로 분배 추출하여 버리면 비극성 간섭물질이 효율적으로 제거된다. 이후 수용액 층을 산성화하고 재차 ether로 분배 추출하면 대상 acid 성분들이 회수된다.

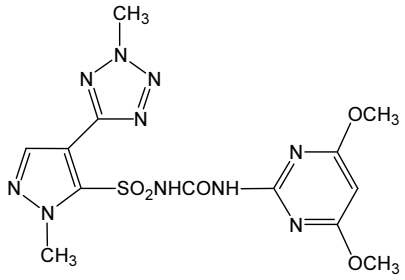
- Pentafluorobenzylation에 사용되는 pentafluorobenzyl bromide는 최루성 시약이며 수분에 취약하므로 취급 및 관리에 주의하여야 하는데 시약을 수회 개봉한 후에는 반응성이 떨어지므로 폐기하는 것이 좋다. 따라서 적은 용량의 시약 단위로 사용하는 것이 합리적이다. 생성된 유도체는 안정성이 그다지 높지 않으므로 가급적 정제 및 분석과정을 신속히 수행하여야 한다. Pentafluorobenzylation은 대상성분에 불소 원자 5개를 도입함으로써 ECD에 대한 감도가 매우 높아지나, carboxylic acid나 phenol 작용기를 분자 내에 포함하고 있는 간섭물질들도 함께 유도체화되므로 불순물의 간섭 정도가 심하다. 따라서 Florisil column chromatography와 같은 추가의 정제과정이 필요하다.

8.3.19 잔류농약 분석법 4.1.3.26

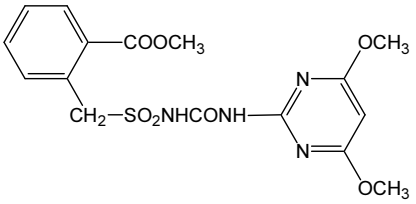
아짐설푸론(Azimsulfuron), 벤설푸론-메칠(Bensulfuron-methyl), 클로르설푸론(Chlorsulfuron), 시노설푸론(Cinosulfuron), 사이클로설파무론(Cyclosulfamuron), 에톡시설푸론(Ethoxy-sulfuron), 플루세토설푸론(Flucetosulfuron), 할로설푸론-메칠(Halosulfuron-methyl), 이마조설푸론(Imazosulfuron), 아이오도설퓨론-메칠-나트륨(Iodosulfuron-methyl-sodium), 메트설푸론-메칠(Metsulfuron-methyl), 피라조설푸론-에칠(Pyrazosulfuron-ethyl) 및 치펜설푸론-메칠(Thifensulfuron-methyl)

1) 대상 농약의 특성

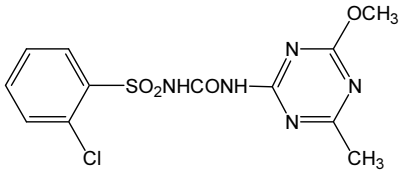
- 분자구조



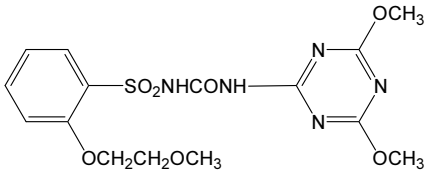
Azimsulfuron



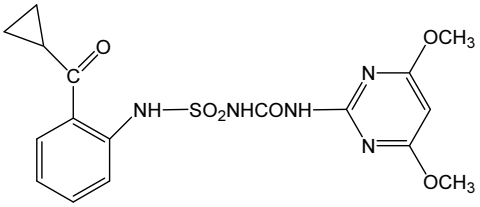
Bensulfuron-methyl



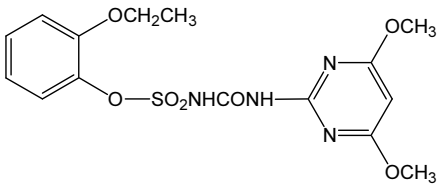
Chlorsulfuron



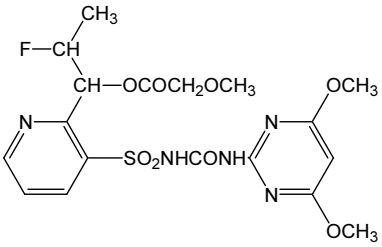
Cinosulfuron



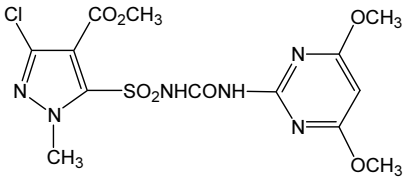
Cyclosulfamuron



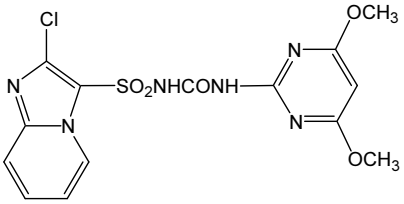
Ethoxy-sulfuron



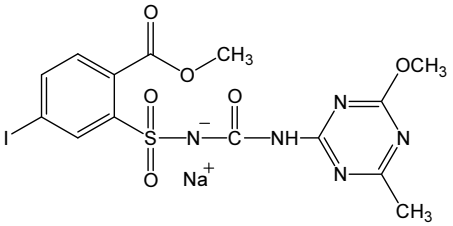
Flucetosulfuron



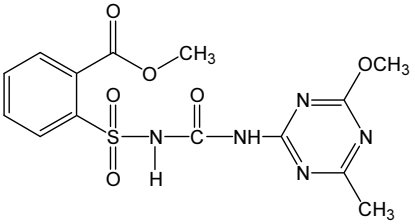
Halosulfuron-methyl



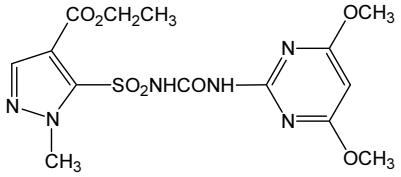
Imazosulfuron



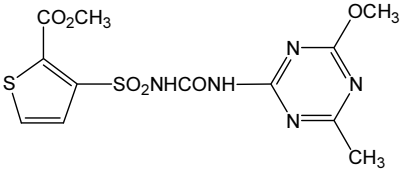
Iodosulfuron-methyl-sodium



Metsulfuron-methyl



Pyrazosulfuron-ethyl



Thifensulfuron-methyl

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Azimsulfuron	1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-methyl-4-(2-methyl-2*H*-tetrazol-5-yl)pyrazol-5-ylsulfonyl]urea
Bensulfuron-methyl	methyl α-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-*o*-toluate
Chlorsulfuron	1-(2-chlorophenylsulfonyl)-3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)urea
Cinosulfuron	1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-3-[2-(2-methoxyethoxy)phenylsulfonyl]urea

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Cyclosulfamuron	1-[2-(cyclopropylcarbonyl)phenylsulfamoyl]3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea
Ethoxysulfuron	1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(2-ethoxyphenoxysulfonyl)urea
Flucetosulfuron	1{3-[4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl)sulfamoyl]-2-pyridyl}-2-fluoropropyl methoxyacetate
Halosulfuron-methyl	methyl 3-chloro-5-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-1-methylpyrazole-4-carboxylate
Imazosulfuron	1-(2-chloroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)urea
Iodosulfuron-methyl -sodium	methyl 4-iodo-2-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamo-sulfamoyl)benzoate, sodium salt
Metsulfuron-methyl	methyl 2-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoylsulfamoyl) benzoate
Pyrazosulfuron-ethyl	ethyl 5-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-1-methyl-pyrazole-4-carboxylate
Thifensulfuron-methyl	methyl 3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-thiophen-2-carboxylate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Azimsulfuron	$C_{13}H_{16}N_{10}O_5S$	424.4	424.1
Bensulfuron-methyl	$C_{16}H_{18}N_4O_7S$	410.4	410.1
Chlorsulfuron	$C_{12}H_{12}ClN_5O_4S$	357.8	357.0
Cinosulfuron	$C_{15}H_{19}N_5O_7S$	413.4	413.1
Cyclosulfamuron	$C_{17}H_{19}N_5O_6S$	421.4	421.1
Ethoxysulfuron	$C_{15}H_{18}N_4O_7S$	398.4	398.1
Flucetosulfuron	$C_{18}H_{22}FN_5O_8S$	487.5	487.1
Halosulfuron-methyl	$C_{13}H_{15}ClN_6O_7S$	434.8	434.0
Imazosulfuron	$C_{14}H_{13}ClN_6O_5S$	412.8	412.0
Iodosulfuron-methyl-sodium	$C_{14}H_{13}IN_5NaO_6S$	529.2, (507.3, H-form)	529.0 (507.0, H-form)
Metsulfuron-methyl	$C_{14}H_{15}N_5O_6S$	381.4	381.1
Pyrazosulfuron-ethyl	$C_{14}H_{18}N_6O_7S$	414.4	414.1
Thifensulfuron-methyl	$C_{12}H_{13}N_5O_6S_2$	387.4	387.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow} (pH)	물에 대한 용해도 (mg/L) (pH)	증기압 (mPa)	pKa
Azimsulfuron	4.43(5), 0.043(7), 0.008(9)	72.3(5), 1050(7), 6536(9)	4.0×10^{-6}	3.6
Bensulfuron-methyl	2.18(5), 0.79(7), -0.99(9)	2.1(5), 67(7), 3100(9)	2.8×10^{-9}	5.2
Chlorsulfuron	-0.99(7)	876(5), 12500(7), 134000(9)	1.2×10^{-6}	3.4
Cinosulfuron	2.04(2.1)	120(5), 4000(6.7), 19000(8.1)	〈0.01	4.7
Cyclosulfamuron	2.05(5), 1.41(7), 0.7(8)	0.17(5), 6.52(7), 549(9)	2.2×10^{-2}	5.0
Ethoxysulfuron	2.89(3), 0.004(7), -1.2(9)	26(5), 1353(7), 9628(9)	6.6×10^{-2}	5.3
Flucetosulfuron	1.05	114	〈1.86×10^{-2}	3.5
Halosulfuron-methyl	-0.019(7)	15(5), 1650(7)	〈0.01	3.4
Imazosulfuron	1.88(4), 1.59(7), 〈0.29(9)	0.37(5), 160(7), 2200(9)	〈6.3×10^{-1}	2.2, 3.8, 9.3
Iodosulfuron-methyl -sodium	1.07(5), -0.70(7), -1.22(9)	160(5), 25000(7), 65000(9)	2.6×10^{-6}	3.2
Metsulfuron-methyl	0.018(7)	548(5), 2790(7), 213000(9)	3.3×10^{-7}	3.8
Pyrazosulfuron-ethyl	3.16	9.76	4.2×10^{-5}	3.7
Thifensulfuron-methyl	1.06(5), 0.02(7), 0.008(9)	223(5), 2240(7), 8830(9)	1.7×10^{-5}	4.0

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Azimsulfuron	0.1	0.1			-	-	-
Bensulfuron-methyl	0.2	0.02	-	-	-	-	-
Chlorsulfuron	0.05	0.1	-	-	-	-	-
Cinosulfuron	-	0.05	-	-	-	-	-

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cyclosulfamuron	0.03	0.1	-	-	-	-	-
Ethoxysulfuron	0.04	0.1	-	-	-	-	-
Flucetosulfuron	0.041	0.1	-	-	-	-	-
Halosulfuron-methyl	0.1	0.05	-	-	-	-	-
Imazosulfuron	0.089	0.1	-	-	-	-	-
Iodosulfuron-methyl-sodium	0.03	-	-	-	-	-	-
Metsulfuron-methyl	0.01	-	-	-	-	-	-
Pyrazosulfuron-ethyl	0.043	0.05	-	-	-	-	-
Thifensulfuron-methyl	0.01	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체를 산성화한 후 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 pH 조절에 의한 세척 및 추출과정으로 구성된 ion-associated partition법으로 정제한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착 chromatography와 aminopropyl 약이온교환 chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

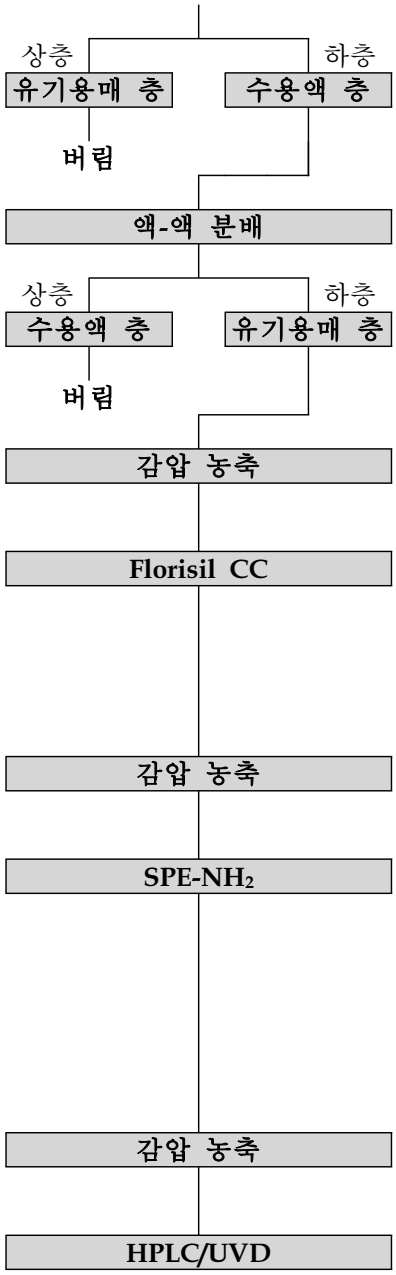
식품 검체
- 검체 25g (곡류 및 콩류)
  0.2M ammonium chloride 수용액 (pH 2.5) 25mL을 가하여 10분간 습윤 산성화

용매 추출
- Acetonitile 100mL, 2분간 고속 마쇄 추출

흡인 여과
- 여분의 acetonitile 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

감압 농축
- Acetonitile 증발 농축

액-액 분배
- 2% Disodium phosphate 수용액 40mL + 포화 NaCl 수용액 2mL 첨가 후 1N NaOH 수용액으로 pH 9.0 조절
- Dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 (20/80) 50mL로 분배 세척



- 6N 및 1N hydrochloric acid를 첨가, pH 3.0으로 조절
- Dichloromethane 30mL × 2회 분배 추출
-
- 건고 후 acetonitrile/dichloromethane 혼합액 (50/50) 10mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 5g
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Acetonitrile 50mL → 버림
- Methanol/acetonitrile (10/90) 60mL → 받음
- 건고 후 acetonitrile/dichloromethane 혼합액 (50/50) 5mL에 재용해
- SPE-NH_2 (aminopropyl) 500mg 카트리지
- Dichloromethane 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 5mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Acetonitrile/dichloromethane (50/50) 5mL → 버림
- Methanol 10mL → 버림
- Dichloromethane/acetic acid (100/0.2) 10mL → 버림
- Dichloromethane/acetic acid (100/1) 10mL → 받음
- 건고 후 acetonitrile/20mM phosphate buffer (pH 2.5) 혼합액 (50/50) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)

검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 35℃
이동상 : acetonitrile/20 mM phosphate buffer (pH 2.5) (45/55, v/v)
이동상 유량 : 0.8 mL/min
검출기 파장 : UV 230 nm 및 240 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계

대상성분	검출파장 (nm)	정량한계 (mg/kg)	대상성분	검출파장 (nm)	정량한계 (mg/kg)
Azimsulfuron	240	0.005	Halosulfuron-methyl	240	0.01
Bensulfuron-methyl	240	0.01	Imazosulfuron	240	0.005
Chlorsulfuron	230	0.005	Iodosulfuron-methyl-Na	230	0.005
Cinosulfuron	230	0.005	Metsulfuron-methyl	230	0.005
Cyclosulfamuron	230	0.01	Pyrazosulfuron-ethyl	240	0.005
Ethoxysulfuron	240	0.01	Thifensulfuron-methyl	230	0.005
Flucetosulfuron	240	0.01			

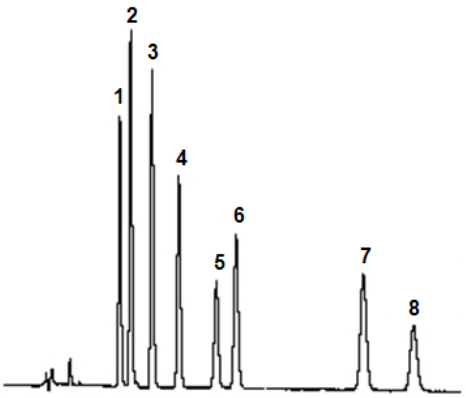


그림 1. 액체크로마토그래프에서 1 그룹 표준품의 크로마토그램
(이동상 45/55, 검출파장 230 nm)

1, thifensulfuron-methyl (6.6분); 2, metsulfuron-methyl (7.2분); 3, chlorsulfuron (8.3분); 4, azimsulfuron (10.0분); 5, flucetosulfuron (12.0분); 6, bensulfuron-methyl (13.2분); 7, pyrazosulfuron-ethyl (20.3분); 8, ethoxysulfuron (23.2분) 각 10 ng.

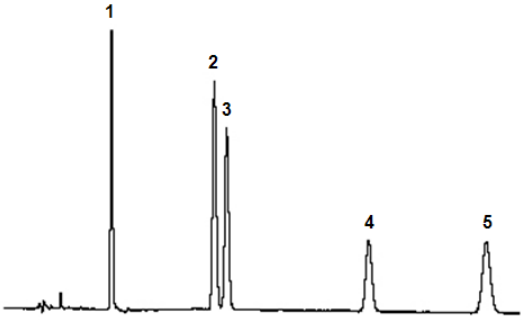


그림 2. 액체크로마토그래프에서 2 그룹 표준품의 크로마토그램
(이동상 45/55, 검출파장 230 nm)
1, cinosulfuron (7.1분); 2, imazosulfuron (13.8분); 3, iodosulfuron-methyl-sodium (14.6분); 4, halosulfuron-methyl (24.1분); 5, cyclosulfamuron (31.6분) 각 10 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/0.2% acetic acid (35/65, v/v)
이동상 유량 : 0.3 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Capillary temperature : 330℃
Cone voltage : 75 V
분자량 범위 (*m/z*) : 200~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Azimsulfuron	5.5	424	425
Bensulfuron-methyl	8.2	410	411
Chlorsulfuron	4.7	357	358
Cinosulfuron	4.0	413	414
Cyclosulfamuron	21.8	421	422
Ethoxysulfuron	15.7	398	399

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온 (계속)

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Flucetosulfuron	7.9	487	488
Halosulfuron-methyl	13.9	434	435
Imazosulfuron	8.3	412	413
Iodosulfuron-methyl-sodium	8.6	529 (Na), 507 (H)	508, 530
Metsulfuron-methyl	4.0	381	382
Pyrazosulfuron-ethyl	12.9	414	415
Thifensulfuron-methyl	3.6	387	388

6) 분석법 해설

- Sulfonylurea계 제초제는 식물의 필수 아미노산인 valine 및 isoleucine 등의 생합성에 관여하는 acetolacetate synthase (ALS)나 acetohydroxyacid synthase (AHAS)를 저해함으로써 고활성의 제초작용을 나타내는 발아후 처리용 선택성 제초제이다. 주로 곡류나 옥수수 재배에 발생하는 다양한 잡초를 방제하기 위하여 전면 살포 또는 토양처리로 사용되는데, 제초활성이 높아 10a 당 유효성분 투하량이 다른 계열 제초제의 1/10이하로 수 g에 불과하다. 따라서 작물체 및 환경 중 잔류량은 살포 초기에도 매우 낮으며 전세계 및 국내에서의 잔류허용기준은 각각 0.02~0.3 mg/kg 및 0.05~0.1 mg/kg으로 엄격하게 설정되어 있어 수확물 중 매우 낮은 잔류수준까지 분석하여야 하는 어려움이 있다. 잔류분의 정의는 대부분 모화합물로 한정되나 iodosulfuron-methyl-sodium의 경우는 작물체 및 환경 중에서 별개의 sulfonylurea계 제초제로 상용화되어 있는 metsulfuron-methyl로 전환되므로 두 성분 모두 분석 대상성분에 포함된다.

- Sulfonylurea계 대상성분들은 그 분자구조에서도 예상할 수 있지만 sulfonyl group의 강한 전자끌기 특성으로 인하여 인접한 nitrogen에 결합된 hydrogen이 해리, pKa가 2.2~5.3 범위인 약산성 화합물들이다. 따라서 휘발성이 매우 낮고 극성이 높아 GLC로는 직접 분석할 수 없으므로 HPLC로 분석한다. 대상 화합물들은 수용액 중에서 해리하는 약산성의 특성을 반영하므로 유기용매 및 pH 조건을 달리한 유기용매/수용액 혼합액 중에서 최대 흡수파장을 달리하는 등 흡수스펙트럼 상에 상당한 변화를 나타낸다. 이러한 이온성 화합물들은 단순한 유기용매/물의 혼합액을 이동상으로 하여 HPLC로 분석할 경우, column 내에서 비이온/이온 형태가 혼재 또는 상호 변환되는 상태로 이동하므로 용출되는 peak의 sharpness 와 symmetry가 매우 불량해지는 경향이 있다. 따라서 완전 해리시키거나 이온억압조건 (ion-suppression)으로 설정하여 하

나의 화학종 상태로 분석하여야 한다. 전자의 경우 ion-pair chromatography법이 가능하나 후자의 이온억압법에 비하여 그 mobile phase 조성이 매우 복잡하고 별도의 분석체계를 설정하여야 하는 단점이 있다. 따라서 이동상의 pH를 산성조건으로 조절, 이온억압법으로 분석하며 이때 검출파장은 산성조건에서 측정한 흡수스펙트럼으로부터 최대 흡수파장 및 흡광계수를 산출, 이용한다. 대상 화합물들은 cyclosulfamuron의 최대흡광파장이 254 nm인 점을 제외하고는 대부분 222~242 nm 범위인데 잔류농약 분석에 있어 단파장을 이용할 경우 검체 중에서 함께 추출되는 불순물에 의한 간섭이 증대되므로 가급적 230 nm 이상의 장파장을 이용하는 것이 유리하다. 따라서 분석법의 선택성과 감도를 고려하여 230 nm 이상의 장파장, 1 × 10^4 $cm^{-1}M^{-1}$ 이상의 흡광계수, 다성분 기준 파장시 각 성분의 70% 이상의 흡광계수를 나타내는 파장을 기준으로 감도가 낮은 성분을 우선하여 전체 성분의 분석이 가능한 230 nm 와 240 nm의 2개 파장을 선정한다.

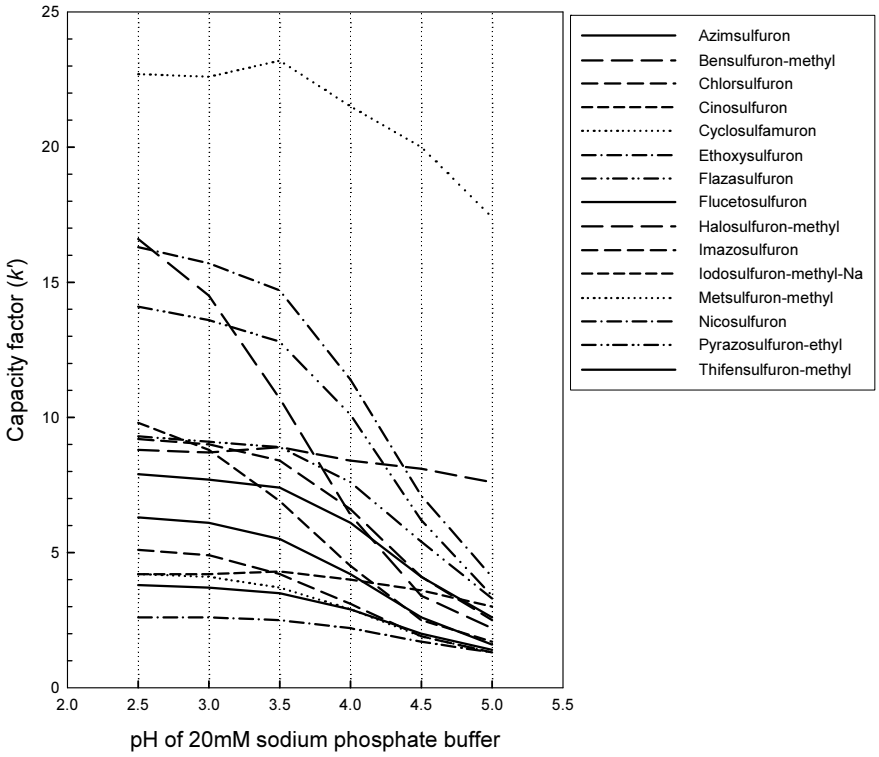


그림 3. Mobile phase의 pH 조건에 따른 sulfonylurea 화합물들의 머무름 특성 변화

- HPLC 기기분석시의 최적 이온억압조건은 각 화합물별로 pKa 값이 상이하나, silica-based C_{18} column의 사용 pH 범위가 통상적으로 pH 2~9인 점을 감안한 이동상의 pH 2.5~3.5에서 halosulfuron-methyl을 제외한 모든 화합물이 충분히 이온억압된다. 설정한 pH 2.5 이외의 조건은 유사한 머무름 특성을 나타내는 화합물간의 분리 및 재확인 과정을 동일 column에서 수행할 때 사용될 수 있다. 즉, 그림 3에 나타낸 바와 같이 유사한 머무름 수치를 나타내는 화합물들에 대하여 다른 pH 조건을 사용하면 각 화합물의 이온억압 정도에 따라 상이한 머무름 수치를 나타내며 이에 따라 추가적 정성이 가능하다.

- 실제 검체의 HPLC 분석에서 검체 추출물 중 간섭물질과의 적정한 분리능과 분석 소요시간을 감안 할 때 이동상 중 organic modifier인 acetonitrile의 최적 함량은 45%이다. 그러나 cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, halosulfuron-methyl 및 pyrazosulfuron-ethyl의 경우 머무름 시간이 너무 길어 정량한계를 확보하기 어려우므로 acetonitrile 함량 50%인 이동상 조건을 병용하는 것이 바람직하다.

- 농산물 검체로부터의 추출법은 먼저 검체를 약산성화하여 대상성분들의 이온화를 억압, 유기용매 가용성 형태를 유지시키면서 acetonitrile으로 마쇄 추출한다. Sulfonylurea계 대상성분들은 강산과 알칼리조건에서 쉽게 분해되므로 산성화를 위한 NH_4Cl 용액은 소량의 고농도 용액보다는 다량의 묽은 용액을 첨가하여 급격한 pH 변화를 최소화한다. Acetonitrile은 US FDA법이나 AOAC법 등 이미 많은 연구자들에 의하여 유사특성의 극성농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있으며 acetone에 비하여 상대적으로 적은 량의 불순물이 추출되므로 추출 이후의 정제과정이 간편한 장점이 있다.

- 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위하여 액-액 분배법을 수행하는데 대상성분들의 해리 특성을 이용하여 효과적인 불순물 세정과 분배 추출을 위한 ion-associated partition법을 사용한다. 즉, sulfonylurea계 대상성분들은 약산성의 해리 가능 화합물이므로 알칼리조건에서는 수용성, 산성에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 검체 추출액의 산도를 약알칼리조건으로 조절하고 dichloromethane/n-hexane (20/80) 혼합액과 같은 비극성 유기용매로 분배하여 버리면 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거 할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 약산성으로 조절하면 대상성분들은 유용성의 비해리 형태가 되므로 NaCl을 첨가하여 ionic strength를 보다 증대시킨 조건에서 dichloromethane으로 2회 분배 하였을 때 모든 대상 농약을 우수한 분배효율로 회수할 수 있다. 추출과정 시와 마찬가지로 sulfonylurea계 대상성분들은 강산과 강알칼리조건에서 쉽게 분해되므로 pH는 약산과 약알칼리 범위 내에서 조절한다.

- Sulfonylurea계 대상성분들의 잔류분석법은 매우 높은 감도를 요구하므로 통상적 잔류분석과정 보다 검체 추출액의 농축정도가 높아야 하며 이에 따라 불순물의 농축정도도 높아지게 된다. 따라서 이러한 ion-associated partition의 효율적 정제과정에도 불구하고 추가적 불순물 제거과정이 요구된다. 따라서 Florisil 흡착크로마토그래피법과 SPE-NH_2를 이용한 약이온크로마토그래피법을 이용하여 추출액을 최종 정제한다. 한 Florisil 및 SPE-NH_2 정제법은 분리원리가 상이하므로 서로 다른 종류의 불순물들이 매우 효과적으로 제거된다. 즉, Florisil 흡착 정제법에서는 각각 비극성/극성의 중성 불순물, SPE-NH_2 약음이온교환 정제법에서는 이온성 불순물들이 주로 제거되어 최종 분석용액은 색깔이 거의 없는 매우 잘 정제된 상태로 조제된다 (그림 4).

- 현미, 밀 및 콩 등 대표 농산물 3종에 대한 회수율 및 분석오차는 분석성분, 처리수준, 농산물 검체종류에 관계없이 잔류분석기준인 70~120% 범위 및 10% 이내를 만족한다. 무처리 검체에서 성분별 분석에 간섭하는 방해물질은 거의 관찰되지 않으며 정량한계는 0.005~0.01 mg/kg 수준이다.

- Florisil 정제법만으로도 검체 분석이 가능하므로 신속한 분석을 목적으로 SPE-NH_2 약음이온교환 정제법을 생략하는 것이 가능하나 이때의 정량한계는 0.02~0.05 mg/kg 수준이다.

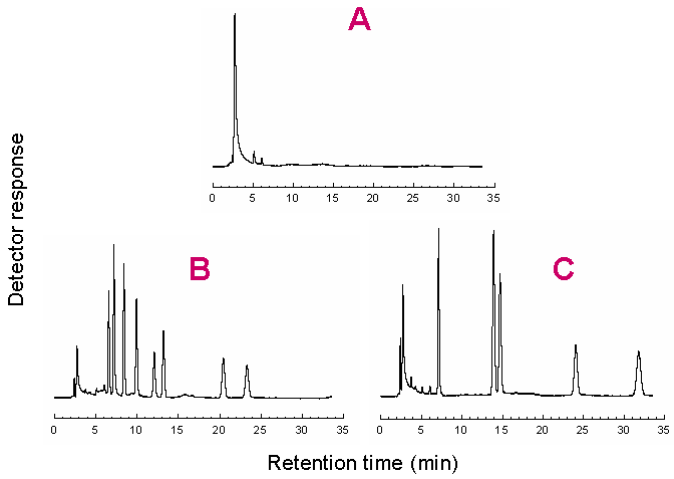


그림 4. 현미검체 중 HPLC 분석 chromatogram의 예.

A, 무처리 현미검체; B 및 C, 표준혼합액 I 및 II를 각각 0.1 mg/kg 처리한 검체

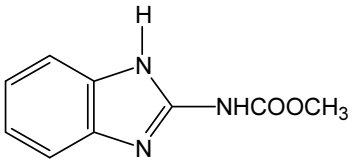
- LC-MS 재확인법에서 sulfonylurea계 대상성분들은 분자 내에 lone pair를 보유한 질소 원자가 다수 존재하여 protonation이 용이하므로 이온화법으로는 ESI, positive ion법이 최선이다. Flucetosulfuron, iodosulfuron-methyl-sodium 및 halosulfuron-methyl의 경우 이온화정도가 다소 약하기는 하나 모든 화합물들의 $[M+H]^+$ ion은 충분한 intensity로 관찰되므로 감도 부족의 문제는 없다. Sulfonyl group에 인접한 nitrogen에 결합된 hydrogen이 해리되는 특성을 이용하여 ESI negative-ion 법도 가능하나 대상성분들의 크로마토그래피 특성 개선을 위하여 약산성의 이동상을 사용하므로 이온화가 억압되어 deprotonation에 의한 충분한 감도를 얻기 어렵다. Iodosulfuron-methyl- sodium의 경우 $[M+H]^+$ ion 보다 sodium이 proton으로 대체된 $[M-Na+2H]^+$ ion (m/z 508)의 생성율이 더 크므로 이를 재확인용 이온으로 이용한다.

8.3.20 잔류농약 분석법 4.1.3.27

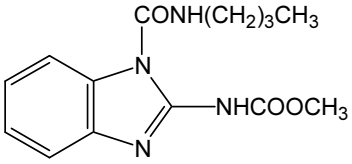
카벤다짐(Carbendazim), 베노밀(benomyl)

및 티아벤다졸(thiabendazole)

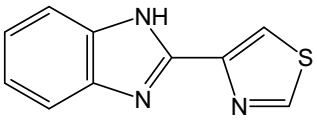
1) 대상 농약의 특성



Carbendazim



Benomyl



Thiabendazole

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Carbendazim	methyl benzimidazol-2-ylcarbamate
Benomyl	methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazol-2-ylcarbamate
Thiabendazole	2-(thiazol-4-yl)benzimidazole

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Carbendazim	$C_9H_9N_3O_2$	191.2	191.1
Benomyl	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290.3	290.1
Thiabendazole	$C_{10}H_7N_3S$	201.3	201.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Carbendazim	1.38 (pH 5) 1.51 (pH 7)	29 (pH 4) 8 (pH 7)	0.15 (20℃)	4.2, 약염기
Benomyl	1.37	0.002~0.004	$<5.0\times10^{-3}$ (25℃)	-
Thiabendazole	2.4 (pH 7)	160 (pH 4) 30 (pH 7)	4.6×10^{-4} (25℃)	pKa_1 4.7, pKa_2 12.0, 약염기성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

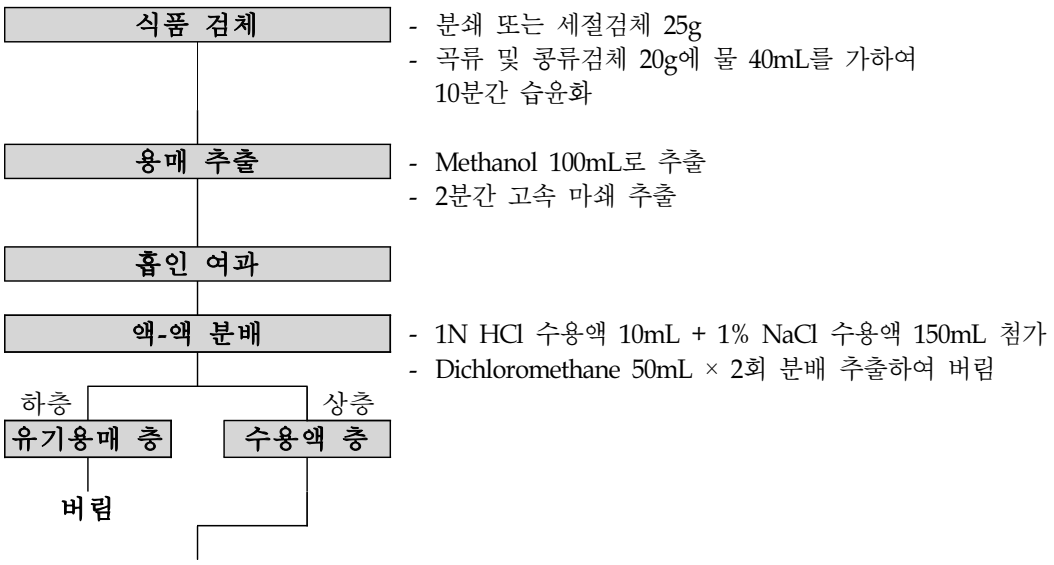
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Carbendazim	0.03	0.05~0.5	0.5~5.0	0.05~15.0	0.2	0.05	-
Thiabendazole	0.1	0.2	3.0~10.0	-	-	-	5.0

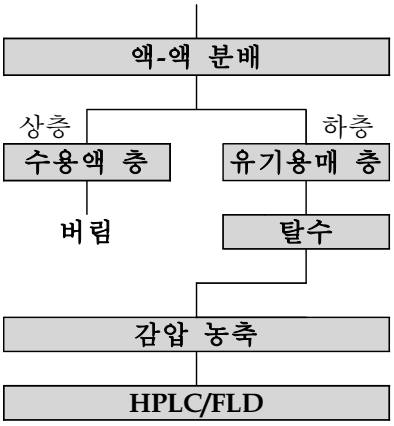
* Benomyl은 carbendazim 기준으로 환산 표시.

2) 분석법 개요

습윤화한 검체에 methanol을 가하고 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 흡인 여과하며 추출 및 여과 과정에서 benomyl은 carbendazim으로 변환된다. 추출액에 1% NaCl 및 1N HCl 수용액을 가하여 추출액의 산도를 산성으로 조절하고 dichloromethane으로 분배 추출하여 버린다. 수용액 층의 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 dichloromethane으로 carbendazim 및 thiabendazole을 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 5N 및 1N NaOH 수용액을 첨가, pH 7.8~8.0으로 조절
- Dichloromethane 50mL × 3회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 건고 후 잔류물을 acetonitrile/methanol/20mM phosphate buffer (pH 7.0) (20/10/70) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
이동상 : acetonitrile/methanol/20mM phosphate buffer, pH 7.0 (20/10/70, v/v/v)
이동상 유량 : 0.7 mL/min
검출기 파장 : 285 nm
검체 주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : carbendazim 및 thiabendazole 각 0.02 mg/kg.
benomyl 0.03 mg/kg (carbendazim으로 전환, 분석)

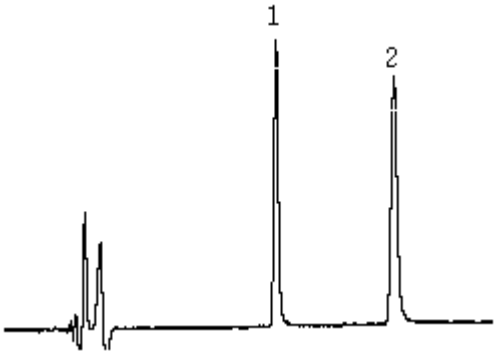


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
1, carbendazim (11.2분); 2, thiabendazole (16.3분) 각 10 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : 메탄올/0.2% ammonium acetate 수용액 (35/65, v/v)
칼럼온도 : 40℃
이동상 유량 : 0.2 mL/min
검체주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 87 V
Capillary temperature : 330℃
분자량 범위 : 100~300

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Carbendazim	6.5	191	192
Thiabendazole	9.1	201	202

6) 분석법 해설

- Carbendazim, benomyl 및 thiabendazole은 곡류 및 과실 재배 시에 광범위하게 사용되는 benzimidazole계 침투성 살균제로서 그 잔류허용기준은 0.05~15 mg/kg으로 설정되어 있다. 또한 국내뿐만 아니라 수입 과실에서 운송 중 방역용으로 빈번히 사용되는 수확 후 살균제이기도 하다.

- Benomyl의 경우 살포 후 생체 및 환경 중에서 매우 신속하게 carbendazim으로 변환되며 실제 살균성분도 carbendazim으로 알려져 있다. 따라서 benomyl의 잔류량은 carbendazim을 기준으로 환산, 표시된다. Benomyl은 유기용매 중에서도 안정성이 취약하고 잔류 분석 과정 중 방법에 따라 일부 또는 전부가 carbendazim으로 변환되므로 benomyl을 정량적으로 carbendazim으로 전환, 분석하는 방법이 일반적으로 사용된다.

- Benzimidazole계 대상성분들은 그 분자구조에서도 예상된 바와 같이 약하게 해리하는 약염기성 화합물들이다. 따라서 휘발성이 매우 낮고 극성이 높아 GLC로는 직접 분석할

수 없으므로 기기분석법으로는 HPLC를 이용한다. 검출기로는 carbendazim과 thiabendazole이 발색단 및 형광단을 모두 함유하고 있으므로 자외흡광검출기나 형광검출기를 사용하는 것이 가능하다.

- 이러한 약이온성 화합물들은 HPLC로 분석할 경우 column 내에서 비이온/이온 형태가 혼재 또는 상호 변환되는 상태로 이동하므로 용출되는 peak의 sharpness 와 symmetry가 매우 불량해지는 경향이 있다. 따라서 완전 해리시키거나 이온억압 (ion-suppression) 조건으로 분석하여야 한다. 전자의 경우 ion-pair chromatography법이 가능하나 후자의 이온억압법에 비하여 그 mobile phase 조성이 매우 복잡하고 별도의 분석체계를 설정하여야 하는 단점이 있다. 따라서 본 분석법에서는 이온억압법을 이용한다. HPLC 기기분석 시의 ion-suppresion 조건은 carbendazim과 thiabendazole 짝산의 pKa가 각각 4.2 및 4.7인 점을 감안하여 pH 7.0으로 설정한다. 잔류 분석에서 검체 추출물 중 불순물과의 적정한 분리능과 분석 소요시간을 감안할 때 이동상의 최적 조건은 50%의 methanol과 30%의 acetonitrile/methanol 혼합 수용액이나 50%의 methanol을 사용할 경우 일부 검체 중에서 불순물과의 간섭이 관찰된다.

- 농산물 검체로부터 극성 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 methanol을 사용한다. Methanol은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이며 특히 다른 수용성 용매에 비하여 carbendazim의 용해도가 우수하다. 추출 및 여과 과정 중에서 benomyl은 정량적으로 carbendazim으로 전환된다.

- 분배과정은 세정과 추출을 위하여 ion-associated partition법을 사용한다. 즉, carbendazim과 thiabendazole은 약염기성의 해리가능 화합물이므로 산성조건에서는 수용성, 알칼리성에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 검체 추출액의 산도를 산성조건으로 조절하고 유기용매로 분배하여 버리면 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 8.0으로 조절하면 carbendazim과 thiabendazole은 유용성의 비해리 형태가 되므로 dichloromethane으로 3회 분배 하였을 때 우수한 분배효율로 회수할 수 있다. 산성조건에서의 세정과정에서 carbendazim과 thiabendazole이 2~3% 가량 손실되기는 하나 검체의 불순물 제거 효과가 매우 우수하다. 약알칼리성에서 두 화합물 모두 분배 효율은 90% 이상이다. Ion-associated partition 과정을 수행하였을 경우 거의 모든 색소 및 유지 등이 제거된 추출액을 얻을 수 있으며 추가의 정제과정 없이 직접 HPLC 분석이 가능하다.

- 자외부흡광검출기를 이용한 HPLC 기기분석 시에 대상 화합물들은 수용액 중에서 해리하는 약염기성 화합물들이므로 유기용매 및 pH 조건을 달리한 유기용매/수용액 혼합액 중에서 최대 흡수파장을 달리하는 등 흡수스펙트럼 상에 상당한 변화를 나타낸다. Carbendazime의 최대흡광파장이 285 nm인 반면 thiabendazole은 297 nm에서 최대 흡광도를 나타내는데 두 화합물을 동시에 정량할 경우의 파장은 흡광계수를 고려할 때 285 nm가 최적이다. 즉, carbendazim은 297 nm에서 흡광계수가 현저히 낮은 반면 thiabendazole은 285 nm에서 297 nm의 72%에 해당하는 흡광도를 나타내고 흡광계수도 모두 1×10^4 $cm^{-1}M^{-1}$ 이상이므로 고감도 분석이 가능하다.

- Carbendazim과 thiabendazole은 형광성을 나타내므로 분석법에서 제시한 자외흡광 검출기 대신 형광검출기를 사용하는 것도 가능하다. 형광검출기에서의 최적 excitation/emission 파장은 동시 정량의 경우 285/315 nm, thiabendazole 개별 정량의 경우 297/350 nm가 적절하다. 동시 정량 시에 자외흡광 및 형광검출기에서의 정량한계는 약 1 ng이며 thiabendazole만을 형광검출기로 개별 정량할 경우의 정량한계는 0.1 ng이다.

표 2. 농산물 검체 중 회수율

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회수율 (%)*				
		현미	사과	고추	콩	감자
Benomyl	0.3	87.5±4.6	88.9±5.9	84.3±3.8	82.4±6.3	88.4±4.8
	1.5	82.6±2.8	86.5±1.6	83.3±4.1	83.2±4.2	85.7±3.1
Carbendazim	0.2	86.6±0.8	80.7±1.7	87.6±1.4	85.8±2.4	83.9±2.7
	1.0	83.7±1.1	80.9±3.1	87.3±1.0	82.2±0.8	80.7±1.5
Thiabendazole	0.2	88.1±0.6	84.0±0.5	91.6±1.6	85.1±3.1	83.8±2.3
	1.0	88.6±0.9	84.4±1.7	89.3±2.5	85.7±1.4	83.2±2.1

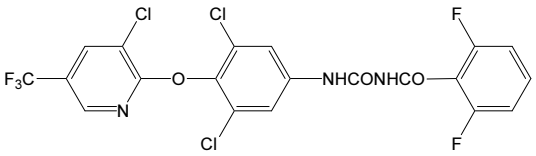
* 3반복 평균±표준편차

8.3.21 잔류농약 분석법 4.1.3.28

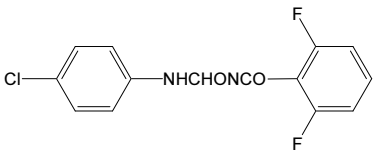
클로르풀루아주론(Chlorfluazuron), 디프루벤주론(Diflubenzuron), 플루페녹수론(Flufenoxuron), 헥사프루무론(Hexaflumuron), 루페누론(Lufenuron), 노발루론(Novaluron), 테프루벤주론(Teflubenzuron), 트리플루무론(Triflumuron)

1) 대상 농약의 특성

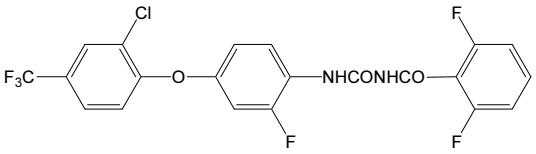
- 분자구조



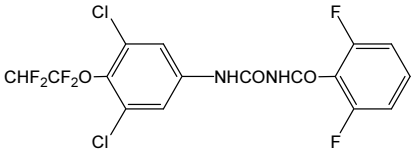
Chlorfluazuron



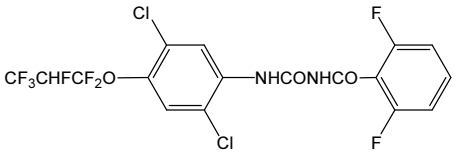
Diflubenzuron



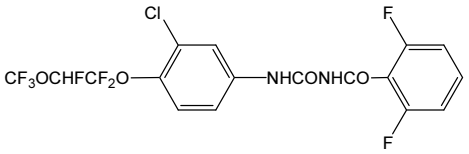
Flufenoxuron



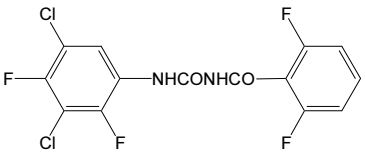
Hexaflumuron



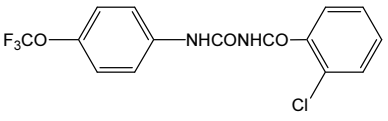
Lufenuron



Novaluron



Teflubenzuron



Triflumuron

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Chlorfluazuron	1-[3,5-dichloro-4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Diflubenzuron	1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Flufenoxuron	1-[4-(2-chloro-α,α,α-trifluoro-*p*-tolyloxy)-2-fluorophenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Hexaflumuron	1-[3,5-dichloro-4-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Lufenuron	(*RS*)-1-[2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Novaluron	(±)-1-[3-chloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluoromethoxyethoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Teflubenzuron	1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
Triflumuron	1-(2-chlorobenzoyl)-3-(4-trifluoromethoxyphenyl)urea

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Chlorfluazuron	$C_{20}H_9Cl_3F_5N_3O_3$	540.7	539.0
Diflubenzuron	$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$	310.7	310.0
Flufenoxuron	$C_{21}H_{11}ClF_6N_2O_3$	488.8	488.0
Hexaflumuron	$C_{16}H_8Cl_2F_6N_2O_3$	461.1	460.0
Lufenuron	$C_{17}H_8Cl_2F_8N_2O_3$	511.2	510.0
Novaluron	$C_{17}H_9ClF_8N_2O_4$	492.7	492.0
Teflubenzuron	$C_{14}H_6Cl_2F_4N_2O_2$	381.1	380.0
Triflumuron	$C_{15}H_{10}ClF_3N_2O_3$	358.7	358.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Chlorfluazuron	5.9	0.012	$<1.6 \times 10^{-3}$	8.1
Diflubenzuron	3.9	0.08	1.2×10^{-4}	비해리성
Flufenoxuron	4.0	0.002	6.5×10^{-9}	10.1
Hexaflumuron	5.6	0.027	5.9×10^{-6}	비해리성
Lufenuron	5.1	<0.06	$<4.0 \times 10^{-3}$	>8.0
Novaluron	4.3	0.048	1.6×10^{-2}	비해리성
Teflubenzuron	4.3	<0.01	1.3×10^{-5}	비해리성
Triflumuron	4.9	0.025	4.0×10^{-5}	비해리성

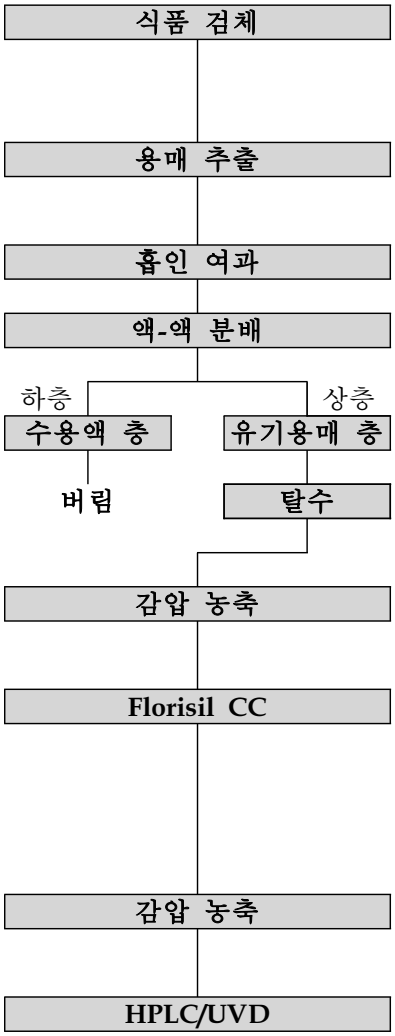
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Chlorfluazuron	0.005	-	0.1~1.0	0.1~2.0	0.1	0.01~0.05	-
Diflubenzuron	0.02	-	1.0	0.3~2.0	0.05	0.1~1.0	-
Flufenoxuron	0.02	-	0.3~1.0	0.05~3.0	-	-	-
Hexaflumuron	0.02	-	0.5~0.7	0.3~0.5	-	-	-
Lufenuron	0.02	-	0.05~2.0	0.2~3.0	-	-	-
Novaluron	0.01	-	0.5~5.0	0.1~5.0	-	-	-
Teflubenzuron	0.01	-	0.05~2.0	0.2~2.0	-	-	-
Triflumuron	0.007	-	0.5	-	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 마쇄 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g
- 곡류 및 콩류의 경우 분쇄 검체에 증류수 40mL을 가하여 10분간 습윤화
- Acetone 100mL
- 1시간 진탕 추출 (200rpm)
- 여분의 acetone 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 10g
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Acetone/*n*-hexane (5/95) 100mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (25/75) 100mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (60/40) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (65/35, v/v) - diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, novaluron

acetonitrile/물 (75/25, v/v) - teflubenzuron, lufenuron, flufenoxuron, chlorfluazuron

이동상 유량 : 1.0 mL/min

검출기 파장 : UV 254 nm

주입량 : 20 μL

분석법의 정량한계 : chlorfluazuron, diflubenzuron, flufenoxuron, hexaflumuron, lufenuron, novaluron, teflubenzuron 및 triflumuron 각 0.02 mg/kg

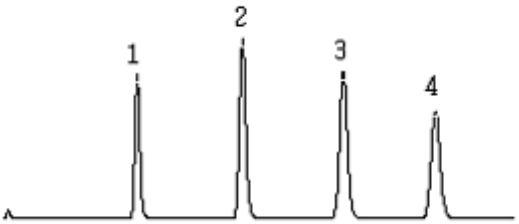


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
1, diflubenzuron (6.9분); 2, triflumuron (9.2분); 3, hexaflumuron (11.7분); 4, novaluron (13.9분) 각 10 ng

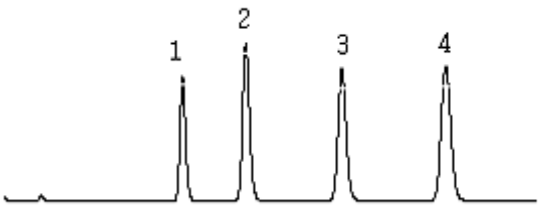


그림 2. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
1, teflubenzuron (7.4분); 2, lufenuron (8.7분); 3, flufenoxuron (10.7분); 4, chlorfluazuron (12.0분) 각 10 ng

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/물 (65/35, v/v) - diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, novaluron
acetonitrile/물 (75/25, v/v) - teflubenzuron, lufenuron, flufenoxuron, chlorfluazuron
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 10 μL
이온화 : ESI, negative-ion mode
Cone voltage : -80 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Chlorfluazuron	9.2	539	538, 518
Diflubenzuron	5.3	310	309
Flufenoxuron	7.7	488	487
Hexaflumuron	9.0	460	459, 439
Lufenuron	6.6	510	509, 339
Novaluron	10.2	492	491, 471
Teflubenzuron	5.5	380	379, 339
Triflumuron	7.0	358	357

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 benzoylphenylurea계 살충제는 해충의 탈피에 필수적인 chitin 생합성 저해제이다. 해충의 탈피시에 비로소 약효가 발현되는 단점은 있으나 해충/포유동물간의 생리생화학적 차이를 이용한 고선택성의 저독성 살충제로서 과수 및 채소류를 중심으로 다양한 작물에서 널리 사용되고 있다. 주로 희석용 제형으로 제제되어 전면살포용으로 사용되며 10a 당 유효성분 투하량은 기존 살충제에 비하여 대등 혹은 그 이하이다. 생체 및 환경 중 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분의 정의는 모화합물로 한정된다.

- 대상성분들은 log P_{ow}가 3.9~5.9 범위인 비극성 화합물들이나 증기압은 10^{-2}~10^{-9} mPa 범위로 낮다. 특히 분자 내에 존재하는 urea기로 인하여 GLC 분석 시에 열분해 가능성이 높으므로 기기분석은 HPLC법을 이용한다.

- 대부분의 대상 화합물들은 pKa 값이 알려지지 않은 비해리성 화합물이며 chlorfluazuron과 flufenoxuron의 경우도 pKa가 각각 8.1과 10.1로 해리성이 미미하다. 따라서 HPLC 분석 시에 이동상을 ion-suppression 조건으로 사용하지 않아도 peak 모양은 대칭형으로 sharp한 특성을 나타낸다. Benzoylphenylurea 기의 conjugation system 존재로 인하여 비교적 장파장을 강하게 흡수하는 자외흡광 특성을 나타내는데, 모든 화합물들의 최대흡광파장은 245~255 nm 범위이고 흡광계수도 10^4 $cm^{-1}M^{-1}$ 이상을 나타낸다. 검출기로는 자외흡광검출기를 사용하는데 화합물간의 최대흡광파장의 범위가 넓지 않으므로 공통적으로 254 nm를 정량파장으로 설정할 수 있다.

- 검체 추출은 비극성 농약의 분석법에서 일반적으로 사용하는 acetone을 추출용매로 사용한다. 곡류 등 건조 검체의 경우, 소정의 추출 효율을 얻기 위해서 acetone 추출 전에 미리 증류수를 가하여 10분간 방치, 습윤화 과정을 수행하는 것이 필수적이다. 추출용매로는 acetone 및 acetonitrile 두 용매 모두 적용이 가능하지만, 고유지 검체인 대두 검체의 경우 acetone에 비하여 극성이 높은 용매인 acetonitrile로 추출하면 검체가 잘 혼합되지 않고 응집되는 경향을 나타내는 단점이 있다. 분배는 acetone 추출액을 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석하고 직접 hexane으로 분배하는 간편한 과정으로 수행하는 데 다소 극성이 강한 화합물들의 완전 회수를 위하여 2회 분배 추출하며 이때 분배효율은 모든 화합물에서 90% 이상이다. 분배용매로 dichloromethane을 사용, 2회 추출하는 것도 충분히 적용 가능하나 hexane에 비하여 불순물 양이 많아지므로 이 후의 정제과정이 복잡해지게 된다.

- 분배 추출액의 최종 정제는 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용한다. 대상 화합물들은 비극성 화합물들이므로 acetone/n-hexane 용출용매에서 용이하게 용출된다. 용출분획에는 황색의 색소가 일부 포함되나 분석에는 큰 문제가 없다.

- 곡류 및 콩류와 같은 유지 함량의 높은 검체는 Florisil 흡착크로마토그래피법에 앞서 hexane-acetonitrile 분배법을 적용, 탈지과정을 필수적으로 수행하여야 한다. 즉, 분배추출액을 감압 농축한 후 건고물을 30 mL의 *n*-hexane (acetonitrile로 미리 포화시킴)에 재용해, 분액여두에 옮기고 30 mL씩의 acetonitrile (*n*-hexane으로 미리 포화시킴)로 2회 분배 추출한다. 대두의 경우 2회 분배로 대상성분을 90% 이상 회수하며 유지 제거효율은 70% 이상이다.

- HPLC 기기분석 시에 이동상을 gradient 조건으로 사용, 대상 화합물 모두를 1회의 검체 주입으로 분석하는 것도 가능하다. 즉, acetonitrile/water (v/v) 혼합액을 50/50 (4 min)에서 90/10으로 18분간에 걸쳐 직선적 구배조건으로 사용하면 대상 화합물 8종을 모두 baseline 분리할 수 있다. 그러나 gradient 조건을 사용하기에 앞서 검체별 간섭물질의 혼입 여부를 확인하여야 하며, 정량의 재현성이 isocratic 조건에 비하여 다소 열등해진다는 점을 감안하여야 한다.

표 2. 농산물 검체 중 benzoylphenylurea계 농약들의 회수율

분석 성분	처리농도 (mg/kg)	회수율(%)*				
		배추	사과	감귤	고추	콩
Diflubenzuron	0.2	116.9±0.5	102.5±3.1	104.0±3.2	94.3±1.1	114.0±7.0
	1.0	85.1±0.4	108.6±5.9	98.4±2.7	97.1±4.8	110.0±3.3
Triflumuron	0.2	108.3±2.9	97.6±9.3	108.0±1.3	101.8±2.7	96.6±3.7
	1.0	83.3±3.4	108.5±5.6	87.0±1.3	82.8±1.1	108.6±2.8
Hexaflumuron	0.2	107.3±3.1	98.4±4.5	107.5±2.5	92.4±6.5	87.4±2.3
	1.0	80.8±2.2	99.7±2.8	83.5±4.6	81.8±3.2	107.8±1.0
Teflubenzuron	0.2	93.3±0.5	80.5±6.7	101.0±5.5	90.2±1.8	86.0±2.4
	1.0	82.1±2.3	91.8±7.2	83.3±4.8	83.7±2.2	103.6±0.4
Novaluron	0.2	103.6±3.3	94.2±6.9	106.9±0.7	89.9±5.8	89.1±0.9
	1.0	80.6±1.4	103.2±8.2	88.9±2.8	83.3±5.7	117.0±0.9
Lufenuron	0.2	106.9±3.0	94.1±8.,1	109.4±0.7	93.9±3.6	94.1±2.4
	1.0	84.0±0.2	97.2±3.0	85.3±7.7	82.9±6.7	109.1±2.3
Flufenoxuron	0.2	116.7±1.1	101.1±7.1	108.7±2.1	103.1±1.9	103.5±1.0
	1.0	94.2±5.9	104.3±7.1	90.5±4.2	90.8±9.2	110.3±5.1
Chlorfluazuron	0.2	117.6±2.1	102.8±6.2	101.6±5.5	108.9±6.6	94.4±0.9
	1.0	83.7±0.2	94.2±6.7	82.6±7.1	86.6±4.8	100.6±2.7

* 3반복 평균±표준편차.

- 과실, 채소 및 콩류 등 대표 농산물 5종에 대한 회수율 및 분석오차는 표 2의 회수율 시험의 예에서 나타낸 바와 같이 분석성분, 처리수준, 농산물 검체종류에 관계없이 잔류분석기준인 70~120% 범위 및 10%이내를 만족한다. 무처리 검체에서 성분별 분석에

간섭하는 방해물질은 고추에서 일부 성분에 대하여 분석성분 인근에서 다소 관찰되나 정성 및 정량 분석시의 문제점은 없다. 고추이외의 검체에서 분석에 간섭하는 방해물질은 거의 관찰되지 않는다. 분석법의 정량한계는 검체 종류에 관계없이 0.02 mg/kg 수준이다.

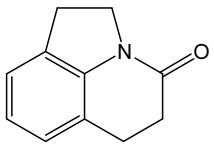
- LC-MS에 의한 재확인은 분자 내 urea 구조의 carbonyl group에 인접한 -NH기에서의 deprotonation 용이성을 감안하여 ESI (negative ion) 이온화법을 적용한다. 대상 화합물들은 분자 내에 염소 원자를 1~3개를 함유하고 있으므로 $_{35}Cl$와 $_{37}Cl$간의 동위원소 존재비 100:32를 이용, 염소 원자의 수에 따라 $[M-H]^-$, $[M-H+2]^-$ 및 $[M-H+4]^-$의 존재 비율을 검증함으로써 매우 정확한 정성적 확인이 가능하다. Chlorfluazuron, hexaflumuron, lufenuron, novaluron 및 teflubenzuron은 분자이온의 intensity가 다소 약하므로 감도가 불충분할 경우 base peak로 나타난 fragment ion을 이용, 재확인을 수행한다.

8.3.22 잔류농약분석법 4.1.3.29

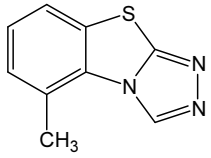
피로퀼론(Pyroquilon), 트리싸이클라졸(Tricyclazole)

1) 대상 농약의 특성

- 분자구조



Pyroquilon



Tricyclazole

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Pyroquilon	1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-*ij*]quinolin-4-one
Tricyclazole	5-methyl-1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3]benzothiazole

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Pyroquilon	$C_{11}H_{11}NO$	173.2	173.1
Tricyclazole	$C_9H_7N_3S$	189.2	189.0

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Pyroquilon	1.60	4000	5.0 (25℃)	비해리성
Tricyclazole	1.42	596	5.9×10^{-4} (20℃)	비해리성

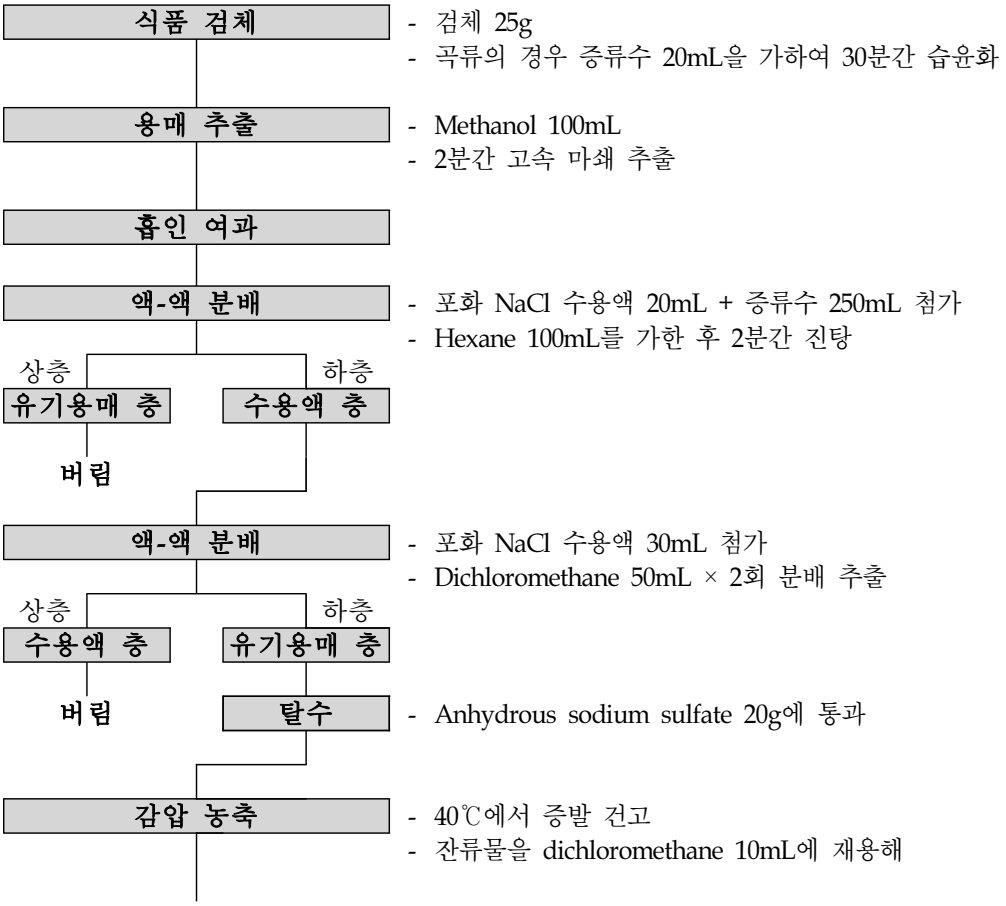
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Pyroquilon	0.015	0.1	-	-	-	-	-
Tricyclazole	0.03	0.7	-	0.2~3.0	-	-	-

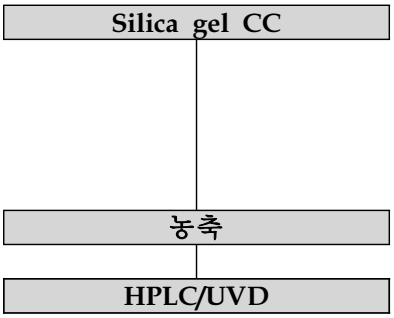
2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 methanol을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액으로 희석한 후 hexane으로 분배 추출하여 버린다. 수용액 층에 포화 NaCl 수용액을 추가로 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



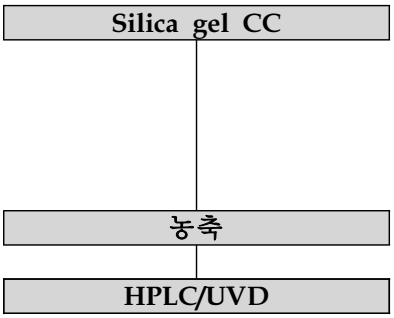
Pyroquilon



- Silica gel 60 (70~230mesh), 5g
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- Dichloromethane 추출액 10mL (검체 25g 해당량)
- Ethyl acetate/dichloromethane (15/85) 40mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (40/60) 50mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (30/70) 10mL에 재용해

Tricyclazole



- Silica gel 60 (70~230mesh), 5g
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- Dichloromethane 추출액 10mL (검체 25g 해당량)
- Ethyl acetate/dichloromethane (40/60) 50mL → 버림
- Ethyl acetate 50mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (30/70) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

Pyroquilon, tricyclazole

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} column, 평균입경 5 μm의 구형 충전제, 길이 4.0 mm i.d. × 250 mm 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (30/70, v/v) - pyroquilon
acetonitrile/물 (25/75, v/v) - tricyclazole
이동상 유량 : 0.8 mL/min
검출기 파장 : UV 256 nm (pyroquilon) 및 226 nm (tricyclazole)
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : pyroquilon 및 tricyclazole 각 0.02 mg/kg

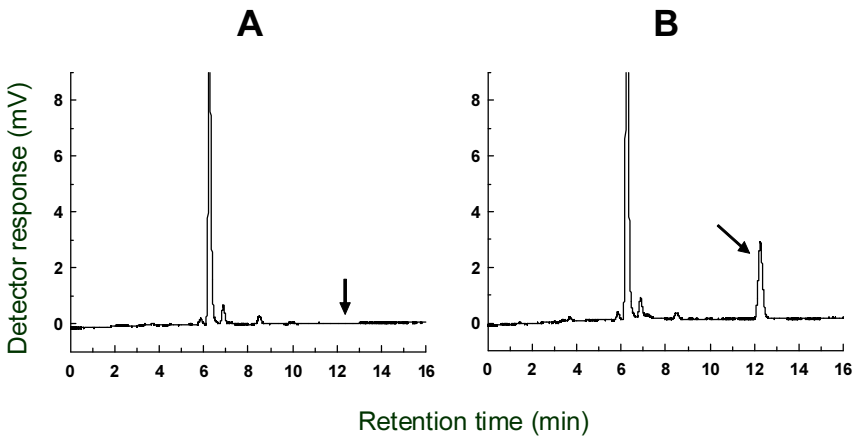


그림 1. 현미 검체 중 pyroquilon 분석 크로마토그램
A, 무처리 검체; B, 0.2 mg/kg 처리 검체

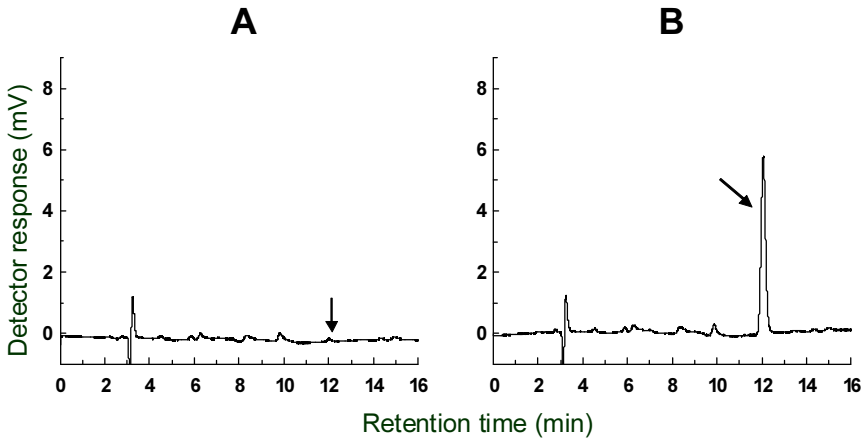


그림 2. 현미 검체 중 tricyclazole 분석 크로마토그램
A, 무처리 검체; B, 0.2 mg/kg 처리 검체

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

분리용 칼럼 : C_{18} column, 평균입경 3 μm의 구형 충전제, 길이 2.1 mm i.d. × 150 mm 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (30/70, v/v) - pyroquilon
acetonitrile/물 (25/75, v/v) - tricyclazole
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 10 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 70 V
Probe temp. : 450℃ (pyroquilon), 400℃ (tricyclazole)
Needle votage : 3.5 KV
분자량 범위 (*m/z*) : 100~300 (TIC 및 mass spectrum 측정)

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Pyroquilon	7.4	173	174 $(M+H)^+$
Tricyclazole	7.3	189	190 $(M+H)^+$

6) 분석법 해설

- Pyroquilon 및 tricyclazole은 주로 벼를 위시한 곡류 작물에 발생하는 병원균 체내의 melanine 생합성 저해함으로써 살균작용을 나타내는 침투성 살균제이다. 작물체내에서 분자구조 중 일부분에서 hydroxyl화된 일부 대사산물들이 보고되어 있으나 두 화합물 모두 최종 잔류분은 모화합물로 정의되어 있다. 잔류허용기준은 pyroquilon의 경우 0.1 mg/kg, tricyclazole의 경우 0.2~3 mg/kg 범위로 설정되어 있으므로 잔류분석법의 정량한계는 0.05 mg/kg 또는 그 이하의 수준이 요구된다.

- Pyroquilon과 tricyclazole은 비해리성의 중성화합물이나 log P_{ow} 값이 각각 1.4 및 1.6으로 비교적 극성이 높은 화합물이므로 최적 기기분석법으로서 GLC를 이용하는 것은 적당하지 않다. 즉, GLC에서 보편적으로 사용되는 DB-5 나 DB-17 등의 methyl-phenylsiloxane column에서 두 화합물들은 고정상/이동상간 분배의 불균일성이나 흡착에 의하여 backward tailing 현상이 관찰되므로 정량성 및 재현성이 좋지 않다. 또한 pyroquilon 분자내에는 1개의 질소원자만이 존재하므로 NPD에서의 감도가 열등하다. 따라서 기기분석법으로는 HPLC를 이용하는 것이 보다 유리하다.

- 역상의 HPLC를 이용할 경우 일반적 C_{18} column에서 두 화합물 모두 바람직한 Gaussian peak 형태로 나타난다. 검출기로는 통상의 자외흡광검출기 (UVD)가 이용 가능한데 pyroquilon과 tricyclazole의 최대흡광파장은 각각 256 및 226 nm이며 이때 흡광계수는 1.2~2.6 × 10^4 $cm^{-1}M^{-1}$ 범위이므로 잔류분석에서 요구되는 감도조건에 충분한 흡광성을 나타낸다. 그러나 tricyclazole의 경우 최대흡광파장이 비교적 단파장에서 관찰되므로 검체로부터 함께 추출되는 방해물질들에 의하여 간섭의 가능성이 높아 보다 정교한 검체 정제과정이 요구된다.

- 대상 화합물들은 그 극성이 높은 편이므로 methanol을 사용하여 통상적 방법으로 추출한다. 곡류의 경우 건조 상태에서는 추출효율이 열등하므로 20 mL의 증류수를 가하여 30분간 방치, 습윤화한다. 추출액은 농축 없이 분액여두에 옮겨 포화식염수와 증류수를 첨가하여 희석하고 분배 과정을 수행한다.

- 이 분석법에서의 분배 과정은 간편하면서도 가장 효율적인 간섭물질 제거 과정이다. 즉, 대상 화합물들의 극성이 높은 점에 착안, 극성이 낮은 *n*-hexane으로 추출하여 버리면 대상 화합물은 분배 추출되지 않으면서 유지 및 색소를 포함한 비극성 방해물질을 대부분 제거할 수 있다. 이 후 포화식염수를 추가로 첨가하고 dichloromethane으로 분배하면 비로소 대상 화합물들이 추출된다. Hexane 세척 과정 중에 pyroquilon은 5~6% 손실되나 tricyclazole의 손실은 전혀 없다. 반면에 dichloromethane 2회 분배 추출로 pyroquilon은 전량 회수되나 tricyclazole은 2~3% 손실된다. 불순물 제거 효율은 총 추출물의 80% 이상이며 현미를 포함한 유지 검체에 대해서도 유지 제거를 위한 hexane-acetonitrile partition 과정이 불필요하다.

- 최종 크로마토그래피 정제 과정에는 대상 화합물의 극성을 감안, 용출을 용이하게 하기 위하여 흡착력이 Florisil 보다 약한 silica gel을 사용한다. 일상적 검체 중에 두 화합물의 잔류분이 동시에 존재할 가능성이 거의 없을 것으로 예상되기 때문에 이 분석법에서는 크로마토그래피 과정의 재현성을 보다 확실하게 확보하고자 pyroquilon 및 tricyclazole에 대하여 개별적으로 용출 체계를 설정하였다. 그러나 column 중에서 pyroquilon과 tricyclazole의 용출 속도가 확연히 차이가 나기 때문에 하나의 검체로부터 두 화합물을 순차적으로 용출시키는 것도 충분히 가능하다. 이 경우에는 ethyl acetate/dichloromethane의 15/85 혼합액 40 mL, 40/60 혼합액 40 mL 및 ethyl acetate 50 mL를 순차적으로 용출시킨다. Silica gel은 제조회사 및 제조번호 (LOT 번호)에 따라 흡착력이 다소 상이하므로 이 분석법을 적용하기 전에 미리 그 용출 양상을 확인하거나 용출 용매의 혼합 비율의 조절, 용출 강도를 최적화하여야 한다.

- Acetonitrile/water (30/70, v/v) 혼합액에 용해한 최종 용액은 현미검체의 경우 다소 흐린 무색의 용액상태이나 냉장 보관 시에도 침전은 관찰되지 않으며 기기주입 전에 미세필터 할 필요는 없다. 고추 검체의 경우 아주 약한 황색, 사과 및 배추 검체는 무색의 투명한 용액으로 정제 정도가 뛰어나다. 기기분석 시에 모든 검체에서 분석 성분보다 늦게 용출되는 성분 (late-eluting peak)들이 거의 관찰되지 않으므로 검체는 15~20분 간격으로 연속 주입이 가능하다.

- 분석법의 회수율은 80~95%이며 간섭물질이 거의 없어 처리 수준간의 회수율 변이는 매우 적은 편이다. 분석오차는 정량한계인 0.02 mg/kg 처리 수준에서도 10% 미만으로 뛰어난 재현성을 나타낸다. 정량한계는 신호/잡음비 10 이상에서 0.02 mg/kg으로 최소 MRL의 1/2~1/5이므로 일상적 검사/정량용 분석법으로 적합하다.

표 2. 농산물중 회수율 및 정량한계

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*			
		현미	사과	고추	배추
Pyroquilon	0.02	85.2±1.7	95.7±3.7	89.3±5.6	91.0±2.1
	0.2	81.4±2.6	86.4±1.8	86.0±1.0	87.3±0.9
	2.0	82.9±0.5	84.1±1.9	82.8±1.9	86.4±2.2
Tricyclazole	0.02	89.8±3.3	89.3±1.3	81.6±1.9	97.4±2.7
	0.2	90.0±1.1	91.7±0.4	86.3±1.7	88.4±2.4
	2.0	82.9±1.3	94.4±2.3	89.8±0.4	86.6±3.7

* 3반복 평균±표준편차

- 이 분석법에서 제시한 LC-MS 분석조건으로 재확인뿐만 아니라 정량분석도 가능하다. 대상 화합물들은 극성이 높고 분자 내에 질소 원자를 함유하고 있어 protonation 가능성이 높으므로 이온화법으로는 ESI, positive-ion mode가 최선이다. ESI mass spectrum 상에서 pyroquilon 및 tricyclazole은 각각 m/z 174와 190인 $(M+H)^+$ ion이 대부분이며 acetonitrile과의 adduct ion도 일부 관찰된다. 이온화율은 pyroquilon에 비하여 tricyclazole이 다소 높다.

- 각 대상성분을 LC-MS로 정량하고자 할 때에는 검체 용액별로 이온억압 (ion-suppresion)이 상이하게 관찰되므로 반드시 matrix-matched calibration법을 사용하여야 한다. 최종 검체용액은 전반적으로 정제 정도가 우수하므로 이온억압 비율은 neat 표준용액에 비

하여 15% 이하이다. 그러나 tricyclazole 분석 시의 배추 검체용액은 이온억압 비율이 약 50%에 달하므로 이온억압 보정에 특히 세심한 주의를 요한다. 검체를 연속적으로 분석할 경우에는 검체 간 이온화율의 정상적 회복에 의한 재현성을 확보하기 위하여 검체 주입간격을 20분 이상으로 설정하는 것이 바람직하다. 또한 검체와 검체 사이에 matrix-matched 표준용액을 주입, 보정하는 bracketing calibration 법을 적용하여야 한다.

- LC-MS 정량법을 적용하였을 경우 HPLC/UVD법에 비하여 최소 10배 이상의 뛰어난 감도를 나타내므로 정량한계를 대폭 낮출 수 있다. 그러나 HPLC/UVD법에 비하여 회수율이 70~100% 범위로 넓고 분석오차도 다소 크다. 또한 bracketing matrix-matched calibration법의 사용에 따른 번거로움과 긴 분석 소요시간 등을 감안할 때 분석 목적에 따라 HPLC/UVD법과 선별적으로 취사, 적용하는 것이 바람직하다.

표 3. LC-MS에 의한 농산물 중 회수율 및 정량한계

대상성분	처리농도	회 수 율 (%)*				정량한계
	(mg/kg)	현미	사과	고추	배추	(mg/kg)
Pyroquilon	0.02	80.8±1.1	93.6±9.7	93.8±5.3	78.5±5.0	0.002
	0.2	92.5±3.6	92.1±2.5	97.7±3.0	93.9±2.4	
	2.0	95.1±1.9	91.3±6.0	96.8±3.2	90.7±4.0	
Tricyclazole	0.02	75.5±3.9	93.1±7.1	96.9±3.3	83.0±3.4	0.0005~0.001
	0.2	92.5±3.4	95.3±5.3	74.8±3.3	91.9±8.5	
	2.0	92.3±1.5	87.3±9.3	94.2±3.2	93.4±4.1	

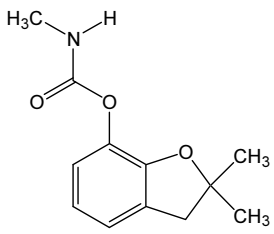
* 3반복 평균±표준편차

8.3.23 잔류농약분석법 4.1.3.30

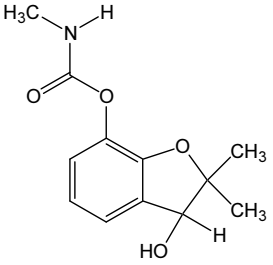
카보후란(Carbofuran 및 3-Hydroxycarbofuran), 벤푸라카브(Benfuracarb), 카보설판(Carbosulfan), 푸라치오카브(Furathiocarb)

1) 대상 농약의 특성

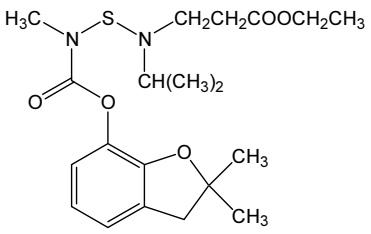
- 분자구조



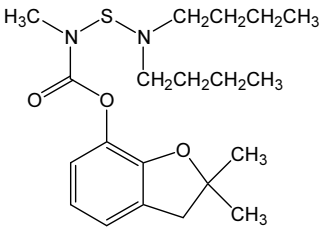
Carbofuran



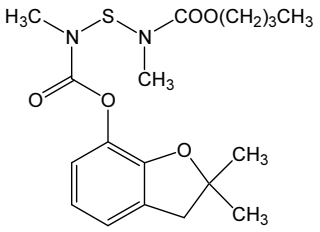
3-Hydroxycarbofuran



Benfuracarb



Carbosulfan



Furathiocarb

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Carbofuran	2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate
3-Hydroxycarbofuran	2,3-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate
Benfuracarb	ethyl *N*-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yloxycarbonyl(methyl) aminothio *N*-isopropyl-β-alaninate
Carbosulfan	2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl (dibutylaminothio)-methylcarbamate
Furathiocarb	butyl 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl *N,N'*-dimethyl-*N,N'*-thiodicarbamate

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Carbofuran	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.3	221.1
3-Hydroxycarbofuran	$C_{12}H_{15}NO_4$	237.3	237.1
Benfuracarb	$C_{20}H_{30}N_2O_5S$	410.5	410.2
Carbosulfan	$C_{20}H_{32}N_2O_3S$	380.6	380.2
Furathiocarb	$C_{18}H_{26}N_2O_5S$	382.5	382.2

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Carbofuran	1.52	320	0.072 (25℃)	비해리성
3-Hydroxycarbofuran	1.45	6200	0.067 (25℃)	비해리성
Benfuracarb	4.22	8.4	〈 0.01	비해리성
Carbosulfan	5.40	3.0	0.036 (25℃)	비해리성
Furathiocarb	4.60	11.0	0.0039 (25℃)	비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

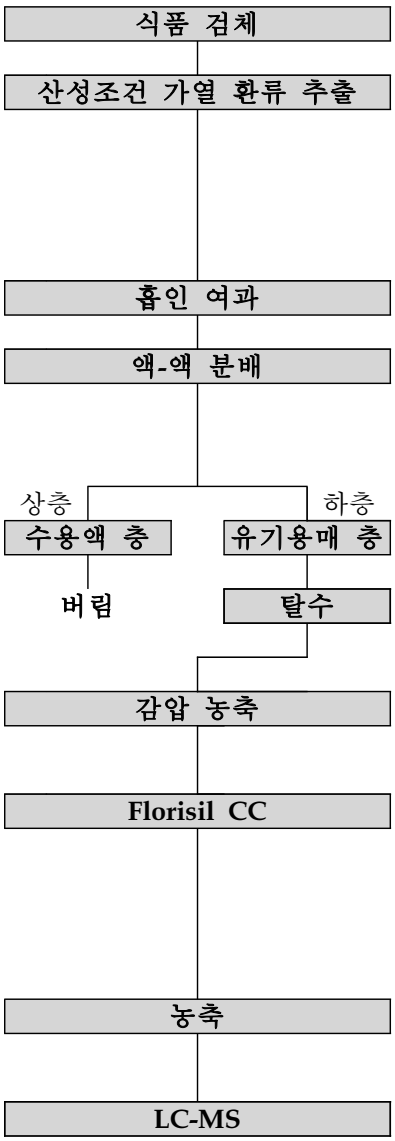
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Carbofuran	0.002	0.1~0.2	0.1~2.0	0.1~0.5	0.2~0.5	0.1	0.5
Benfuracarb	0.015	0.01	0.05~0.2	0.01~0.7	-	-	-
Carbosulfan	0.01	0.1	0.05~0.7	0.05~0.3	0.05	-	0.05
Furathiocarb	0.0035	0.3	0.1~0.5	0.1~2.0	-	-	0.1

2) 분석법 개요

마쇄 또는 세절 검체에 0.25 N HCl을 가하여 carbofuran, 유리 및 conjugated 3-hydroxycarbofuran을 환류 추출한다. 이 과정에서 benfuracarb, carbosulfan 및 furathiocarb는 carbofuran으로 전환되고 정량적으로 추출된다. 추출액을 흡인 여과한 후 여액을 분액여두에 옮겨

NaCl을 첨가, 용해하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 LC-MS로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 마쇄 검체 20g (현미 10g, 콩류 5g 사용)
- 0.25N HCl 수용액 150mL
- 가열하여 1시간 동안 환류 추출 후 신속 방냉
- 0.25N HCl 50mL + acetone 20mL로 냉각관 및 플라스크를 세정하여 합함
- (현미 및 콩류는 여과보조제 Hyflo-Super Cel 2g 첨가)
- Acetone 5mL + 0.25N HCl 50mL로 추가 세정
- NaCl 20g 첨가 후 진탕 용해
- Dichloromethane 100 + 50mL로 2회 분배 추출
- (층 분리가 불완전할 경우 4% sodium dodecylsulfate 수용액 1~5mL 첨가)
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 dichloromethane 10mL에 재용해
- Florisil 5g
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- Dichloromethane 추출액 10mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (0.5/99.5) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (30/70) 50mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (20/80) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : LC-MS

분리용 칼럼 : C_{18} column, 평균입경 3 ㎛의 구형 충전제, 길이 2.1 mm i.d. × 150 mm 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 40℃

이동상 : acetonitrile/물 (15/85, v/v)에서 acetonitrile/물 (60/40, v/v)으로 15분간 직선적으로 농도 구배조건으로 흘린 후 10분간 acetonitrile/물 (60/40, v/v)을 유지한다.

이동상 유량 : 0.2 mL/min

주입량 : 10 ㎕

이온화 : ESI, positive-ion mode

Cone voltage : 45 V

Probe temp. : 450℃

Needle votage : 3.5 KV

분자량 범위 (*m/z*) : 150~350 (TIC 및 mass spectrum 측정)

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Carbofuran	18.6	221	222 $(M+H)^+$
3-Hydroxycarbofuran	10.7	237	238 $(M+H)^+$ 및 220 $(M+H-H_2O)^+$

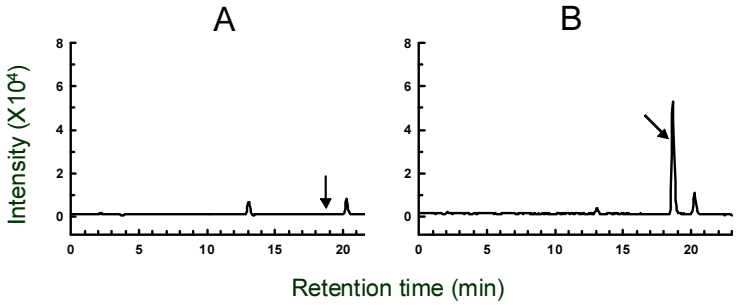


그림 1. 현미 검체 중 carbofuran 분석 LC-MS SIM 크로마토그램
A, 무처리 검체; B, 0.05 mg/kg 처리 검체

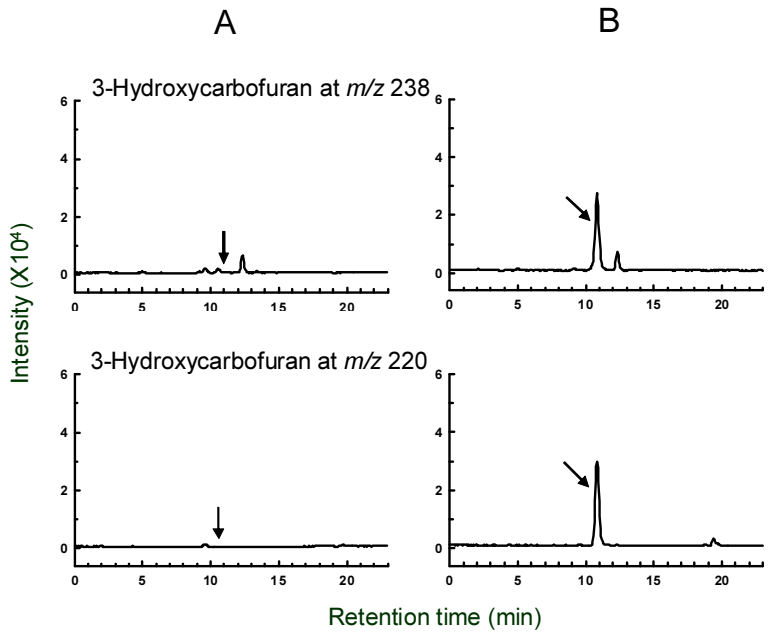


그림 2. 현미 검체 중 3-hydroxycarbofuran 분석 LC-MS SIM 크로마토그램
A, 무처리 검체; B, 0.05 mg/kg 처리 검체

5) 분석법 해설

- Carbofuran은 전형적인 *N*-monomethylcarbamate계 살충제로 1960년대부터 국내뿐만 아니라 전세계적으로 각종 작물재배 시에 널리 사용되는 약제이다. Carbofuran은 강한 급성경구독성으로 인하여 살포자에 대한 위해성이 우려되므로 희석살포제로는 상용화되지 않았고 주로 입제로 사용된다. Benfuracarb, carbosulfan 및 furathiocarb는 carbofuran의 aminothio 유도체로서 급성독성을 경감, 유제 등과 같은 희석살포제로 사용할 목적으로 개발된 carbofuran의 전구물질 (precursor) 들이다. 즉, 급성독성이 상대적으로 낮은 aminothio 유도체의 형태로 농약 제형을 제조, 안전하게 유통 및 사용되도록 하면서 살포 후 동식물 및 환경 중에서 빠른 속도로 분해, carbofuran이 방출되도록 분자 설계된 화합물들이다. 따라서 이들 농약들의 실제 유효성분은 최종적으로 carbofuran이다.

- Carbofuran은 생체 및 환경 중에서 상당량의 3-hydroxycarbofuran으로 대사되는데 이 대사산물의 독성학적 중요성이 인정된다. 또한 3-hydroxycarbofuran은 분자내 hydroxyl기와 생체 내에 존재하는 당류 등의 내생물질 간에 conjugation 반응이 용이

하게 일어나는데 이들 conjugation 화합물들의 독성학적 중요성 또한 인정되고 있다. 따라서 carbofuran의 잔류분은 전세계적으로 carbofuran, 유리 (遊離) 및 conjugation 형태의 3-hydroxycarbofuran으로 정의된다. Benfuracarb, carbosulfan 및 furathiocarb의 경우는 모화합물과 함께 주요 방출성분인 carbofuran에 대한 잔류분 정의가 추가된다.

- 본 분석법의 분석 대상성분은 benfuracarb, carbosulfan 및 furathiocarb의 모화합물, carbofuran, 유리 및 conjugation 형태의 3-hydroxycarbofuran이다. Benfuracarb, carbosulfan 및 furathiocarb 모화합물의 경우 유기용매 추출에 의한 GLC 분석이 가능하나 산성 및 염기성 조건에서 매우 취약하므로 추출 및 정제과정에서 세심한 pH 조절이 요구되는 등 분석과정이 용이하지 않다. Carbofuran 및 유리의 3-hydroxycarbofuran은 유기용매 추출에 의한 GLC 또는 HPLC (특히 post-column 유도체 형성법) 분석이 비교적 용이하나 이 경우 conjugated 3-hydroxycarbofuran은 분석되지 않는다. Conjugated 3-hydroxycarbofuran은 내생물질의 종류에 따라 화합물 종류가 달라지므로 이를 가수분해, 유리의 3-hydroxycarbofuran 단일 형태로 분석하는 것이 보편적인 방법이다. 이를 위해서는 검체를 산성조건에 가수분해, 추출하는 과정이 수행되어야 하므로 aminothio 유도체들의 취약성을 감안할 때, 별개의 방법으로 수행되어야 한다.

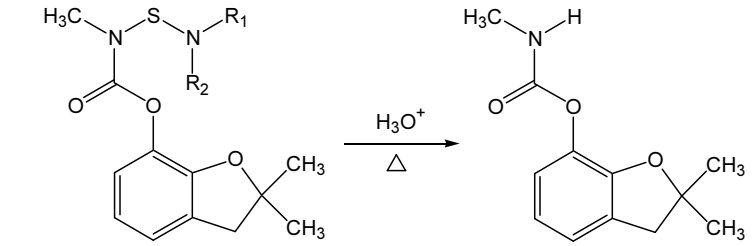


그림 3. Carbofuran aminothio 유도체들의 산 가수분해

- 본 분석법은 산성조건에서 carbofuran 및 3-hydroxycarbofuran이 어느 정도 안정하다는 점에 착안, aminothio 유도체들을 정량적으로 carbofuran으로 전환시키면서 conjugated 3-hydroxycarbofuran을 동시에 가수분해하여 추출하는 단일 추출조건을 최적화하여 분석법을 확립하였다. 따라서 본 분석법에서는 aminothio 유도체들은 모두 carbofuran으로 전환되어 검체 중에 원래 존재하는 carbofuran 잔류분과 합산, 총량 분석되며 유리 및 conjugation 형태의 3-hydroxycarbofuran도 총 3-hydroxycarbofuran 잔류분으로 분석된다. 최종 잔류분 표시는 3-hydroxycarbofuran 잔류분에 carbofuran과의 분자량 차이에 따른 전환계수 0.93을 곱하여 carbofuran 잔류분과 합산, 총 carbofuran 잔류량으로 표시한다.

- 본 분석법에서 가장 중요한 과정은 추출이다. 즉, 세절 또는 마쇄한 검체를 증류플라스크에 달아 넣고 0.25 N HCl 수용액 10 0mL을 가한 후 가열, 완만한 조건으로 끓이면서 1시간 동안 환류 추출한다. 이 과정에서 3-hydroxycarbofuran은 손실률 2% 이내로 안정하나 carbofuran은 약 5~7%가 가수분해, 손실된다. 따라서 손실률을 최소화하기 위하여 추출용액의 비등 전까지는 빠르게 가열하고 온도를 조절, 완만하게 끓이면서 1시간 동안 추출한 후 급속 냉각시킨다. Aminothio 유도체들은 30분 이내에 모두 carbofuran으로 정량적으로 전환되며 추출효율은 90~93% 범위이다. 검체량은 채소 및 과실의 경우 20 g을 사용하여도 전혀 문제가 없으나 곡류 및 콩류의 경우 환류 추출 시의 거품 발생, 여과 과정에서의 clogging, 분배 과정의 층 분리성 등의 난점이 있으므로 검체량을 5~10 g 으로 줄여 공시한다. 환류 추출 후 검체에 여분의 0.25 N HCl과 함께 소량의 acetone을 첨가하여 검체를 세정한다. 이는 곡류 및 콩류의 경우 여과 과정에서 여과보조제인 Hyflo SuperCel (또는 일반 Celite)의 첨가가 필수적인데 이로 인하여 발생하는 carbofuran의 일부 손실을 최소화하기 위함이다. 또한 분배과정 중 첨가한 acetone 상당 부분이 dichloromethane 층으로 전이, 혼합되어 극성을 높임으로써 3-hydroxycarbofuran의 분배 효율을 향상시킨다.

- 분배 과정은 먼저 NaCl을 첨가, 이온 강도를 높이고 dichloromethane으로 분배 추출하는데 carbofuran은 분배 효율이 높아 dichloromethane 1회 추출로도 완전 회수된다. 3-Hydroxycarbofuran은 극성이 높아 2회 추출하여야 95% 정도의 분배 회수율을 얻을 수 있다. 앞서 언급한 바와 같이 추출과정에서 acetone이 첨가됨으로써 분배 효율에 큰 영향을 미치는 데, acetone을 첨가하지 않았을 때는 2회 추출로도 80~85%의 낮은 회수율을 나타낸다. 회수율 95%의 분배 효율을 얻기 위해서는 3회 추출하거나 NaCl 첨가량을 50g으로 증가시켜야 하는 불편함이 있다. 실제 분배 과정을 수행할 때 중요한 사항은 진탕 강도와 층 분리이다. 진탕은 너무 격렬하게 하지 않아야 거품 발생을 최소화하고 깨끗한 층 분리를 얻을 수 있으므로 완만한 강도로 충분한 시간 동안 진탕한다. 진탕 후 층 분리가 불완전 할 경우에는 층 분리 보조제로서 4% sodium dodecylsulfate 수용액을 1~ 5mL 첨가하여 간단히 혼합, 정치한다. 특히 현미 및 콩류 검체는 층 분리가 서서히 이루어지므로 충분한 시간에 걸쳐 분리작업을 수행한다.

- 최종 크로마토그래피 정제 과정에는 잔류농약 분석에서 보편적으로 사용되는 Florisil을 흡착제로 사용한다. 본 분석법에서는 LC-MS의 고선택성을 감안, 동시 분석법으로 분석 효율을 높이고자 Florisil column 중에서 carbofuran과 3-hydroxycarbofuran을 하나의 분획으로 동시에 용출시킨다. 그러나 HPLC 등의 선택성이 상대적으로 낮은 분석기기를 이용함에 따라 검체 정제도를 높일 필요가 있거나 isocratic 조건으로 개별 분석하고자 할 때에는, column 중에서 carbofuran과 3-hydroxycarbofuran의 용출 속도는 확연히

차이가 나기 때문에 하나의 검체로부터 두 화합물을 개별적으로 순차 용출시키는 것도 가능하다. 이 경우에는 ethyl acetate/dichloromethane의 0.5/99.5 혼합액 50 mL, 5/95 혼합액 50 mL (carbofuran 용출) 및 30/70 혼합액 50 mL (3-hydroxycarbofuran 용출)를 순차적으로 용출시킨다.

- Acetonitrile/water (20/80, v/v) 혼합액에 용해한 최종 용액은 현미 및 콩류검체의 경우 다소 흐린 무색의 용액상태이나 냉장 보관 시에도 침전은 관찰되지 않으며 기기 주입 전에 미세필터 할 필요는 없다. 사과, 고추 및 배추 검체의 경우 무색~아주 약한 황색의 투명한 용액으로 정제 정도가 뛰어나다. 기기분석 시에 모든 검체에서 분석 성분보다 늦게 용출되는 성분 (late-eluting peak)들이 거의 관찰되지 않으므로 검체는 연속 주입이 가능하다.

- LC-MS 분석 대상 화합물인 carbofuran과 3-hydroxycarbofuran은 극성이 높고 분자 내에 monomethylcarbamoyl moiety를 함유하고 있고 특히 3-hydroxycarbofuran은 hydroxyl 기의 존재로 인하여 protonation 가능성이 높으므로 이온화법으로는 ESI, positive-ion mode가 최선이다. ESI mass spectrum 상에서 carbofuran은 거의 대부분 m/z 222인 $(M+H)^+$ ion으로 이온화되어 검출되나 3-hydroxycarbofuran의 경우 m/z 238인 $(M+H)^+$ ion과 더불어 protonation 후 물 분자가 이탈된 m/z 220도 상당한 intensity를 나타낸다. 따라서 간섭을 최소화하거나 추가적 정성/정량 이온으로 사용할 수 있다. 반면 이온의 fragmentation으로 인하여 3-hydroxycarbofuran은 carbofuran에 비하여 그 감도가 상대적으로 낮다.

- 각 대상성분을 LC-MS로 정량하고자 할 때에는 검체 용액별로 이온억압 (ion-suppresion)이 상이하게 관찰되므로 반드시 matrix-matched calibration법을 사용하여야 한다. 최종 검체용액은 전반적으로 정제 정도가 우수하므로 이온억압 비율은 neat 표준용액에 비하여 대부분 15% 이하이다. 그러나 carbofuran 분석 시의 고추 검체용액은 이온억압 비율이 최대 35%에 달하므로 이온억압 보정에 특히 세심한 주의가 요구된다. 또한 검체와 검체 사이에 matrix-matched 표준용액을 주입, 보정하는 bracketing calibration 법을 적용하여야 한다. 검체별 분석 소요시간은 25분이나 gradient elution 조건의 초기화 및 평형시간으로 각 10분 정도를 추가 배정하면 검체 간 이온화율의 정상적 회복에 의한 재현성이 확보되므로 45분 간격으로 검체의 연속 주입이 가능하다.

표 2. 현미 중 회수율 및 정량한계

화합물	처리농도 (mg/kg)	회수율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Carbofuran	0.005	95.9±3.4	
	0.05	95.7±2.9	0.005
	0.5	91.8±5.0	
3-Hydroxycarbofuran	0.01	87.8±2.2	
	0.1	85.6±0.9	0.01
	1.0	82.3±6.4	
Benfuracarb	0.01	72.3±1.6	
	0.1	73.5±6.2	0.01
	1.0	83.9±5.2	
Carbosulfan	0.01	70.9±4.8	
	0.1	81.7±2.3	0.01
	1.0	81.0±0.6	
Furathiocarb	0.01	76.5±10.9	
	0.1	79.7±6.8	0.01
	1.0	75.8±0.2	

* 3반복 평균±표준편차

표 3. 사과, 고추 및 배추 중 회수율 및 정량한계

화합물	처리농도 (mg/kg)	회수율 (%)*			정량한계 (mg/kg)
		사과	고추	배추	
Carbofuran	0.0025	96.0±5.2	88.2±5.1	82.7±4.6	
	0.025	78.1±0.4	79.8±7.0	88.1±0.9	0.003
	0.25	91.0±6.3	95.6±4.6	93.6±7.6	
3-Hydroxycarbofuran	0.005	85.5±2.8	72.2±1.1	76.3±6.5	
	0.05	83.3±3.3	82.3±4.8	77.4±3.9	0.005
	0.5	93.5±2.4	83.1±2.4	93.4±3.8	
Benfuracarb	0.005	75.7±4.7	77.9±3.8	77.5±3.8	
	0.05	75.9±3.8	73.2±0.8	71.8±2.8	0.005
	0.5	95.8±2.7	93.0±0.5	95.6±0.9	
Carbosulfan	0.005	78.4±1.5	89.5±1.9	70.2±8.3	
	0.05	75.4±3.7	72.7±4.0	78.9±6.8	0.005
	0.5	89.7±2.1	88.7±3.6	78.8±0.9	
Furathiocarb	0.005	82.4±3.9	82.9±2.4	89.6±3.9	
	0.05	79.7±3.9	74.4±2.9	78.5±2.5	0.005
	0.5	89.4±4.1	86.3±2.9	90.2±2.8	

* 3반복 평균±표준편차

표 4. 대두 중 회수율 및 정량한계

화합물	처리농도 (mg/kg)	회수율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Carbofuran	0.01	89.1±3.8	
	0.1	73.5±5.7	0.01
	1.0	73.8±2.6	
3-Hydroxycarbofuran	0.02	81.4±5.3	
	0.2	82.8±5.0	0.02
	2.0	86.6±3.4	
Benfuracarb	0.02	76.9±4.9	
	0.2	70.6±0.7	0.02
	2.0	86.8±6.6	
Carbosulfan	0.02	75.9±2.1	
	0.2	83.5±6.9	0.02
	2.0	84.6±3.6	
Furathiocarb	0.02	91.1±2.3	
	0.2	92.8±2.6	0.02
	2.0	83.2±6.8	

* 3반복 평균±표준편차

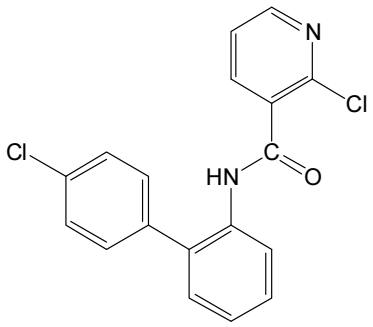
- 분석법의 회수율은 화합물, 검체 종류 및 처리 수준에 큰 영향이 없이 70~100% 범위이다. 정량한계는 신호/잡음비 10 이상에서 검체에 따라 carbofuran은 0.003~0.01 mg/kg, 3-hydroxycarbofuran은 0.005~0.02 mg/kg, 그리고 aminothio 유도체들은 0.005~0.02 mg/kg 범위로 benfuracarb의 경우 쌀에서 MRL 수준인 점을 제외하고는 최소 MRL의 1/2~1/30이므로 일상적 검사/정량용 분석법으로 적합하다.

8.3.24 잔류농약 분석법 4.1.3.31

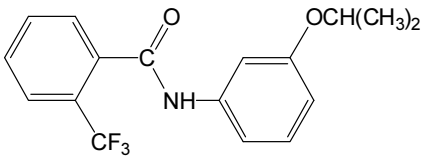
보스칼리드(Boscalid), 플루토라닐(Flutolanil),
메프로닐(Mepronil), 티플루자마이드(Thifluzamide)

1) 대상 농약의 특성

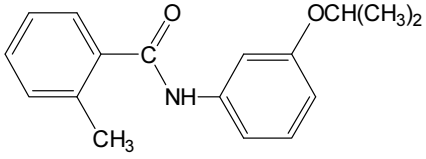
- 분자구조



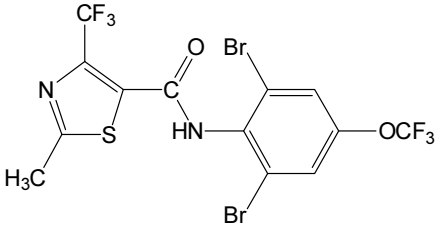
Boscalid



Flutolanil



Mepronil



Thifluzamide

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Boscalid	2-chloro-N-(4′-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide
Flutolanil	α , α , α -trifluoro-3’ -isopropoxy-o-toluanilide
Mepronil	3′-isopropoxy-o-toluanilide
Thifluzamide	2′,6′-dibromo-2-methyl-4′-trifluoromethoxy-4-trifluoromethyl-1,3-thiazole-5-carboxanilide

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Boscalid	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	343.2	342.0
Flutolanil	$C_{17}H_{16}F_3NO_2$	323.3	323.1
Mepronil	$C_{17}H_{19}NO_2$	269.3	269.1
Thifluzamide	$C_{13}H_6Br_2F_6N_2O_2S$	528.1	525.8

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Boscalid	3.0	4.6	7.2×10^{-4} (20℃)	비해리성
Flutolanil	3.2	8.0	4.1×10^{-4} (20℃)	비해리성
Mepronil	3.7	8.2	2.2×10^{-2} (25℃)	비해리성
Thifluzamide	4.2	1.6 (pH 5.7) 7.6 (pH 9.0)	1.0×10^{-6} (20℃)	11.0~11.5

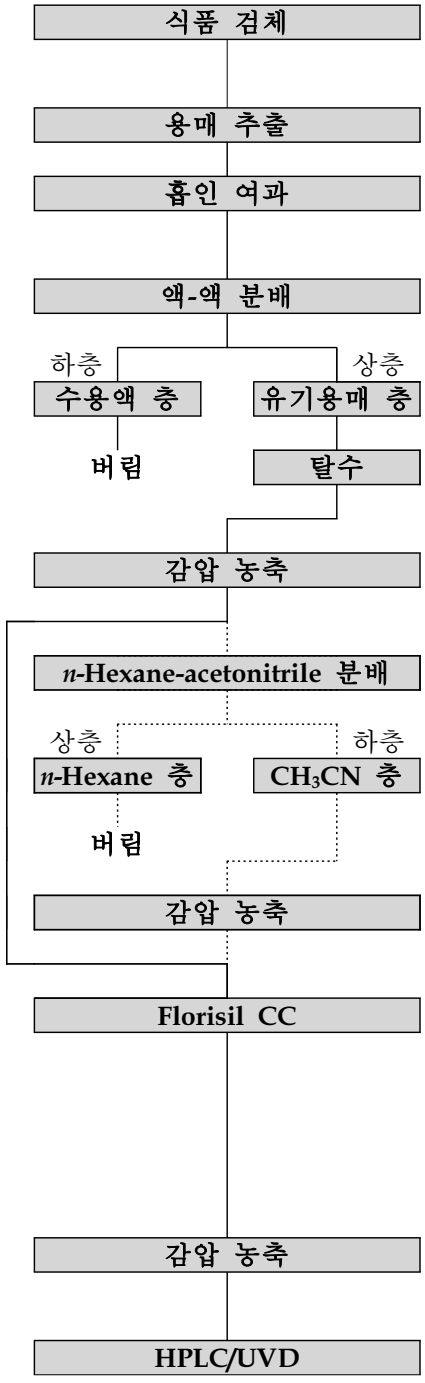
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Boscalid	0.04	-	0.2~5.0	0.3~30	-	-	-
Flutolanil	0.09	1.0	-	0.05~5.0	0.2	-	-
Mepronil	0.05	-	-	-	-	-	0.05
Thifluzamide	0.014	0.1	0.5	0.05~0.5	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 균질 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 다량의 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 혼합액으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압농축하고 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하여 유지 및 비극성 방해물질을 제거한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 콩류 검체의 경우 물 20mL를 가하여 30분간 습윤화
- Acetone 100mL을 가하여 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- Acetone 40mL로 잔류물을 씻어 합침
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 100mL로 분배
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- **곡류 및 콩류 등 유지검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 40mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 40mL × 2회 분배추출
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 dichloromethane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (30/70) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (25/75) 150mL → 받음
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (58/42) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/물 (58/42, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : 220 nm
검체 주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : boscalid, flutolanil, mepronil, thifluzamide 각 0.04 mg/kg

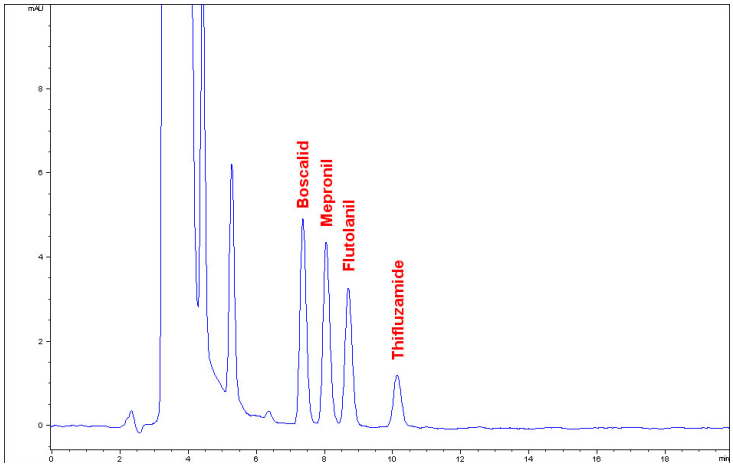


그림 1. 고성능 액체크로마토그래피에서 표준품의 크로마토그램

1, boscalid (7.4분); 2, mepronil (8.1분); 3, flutolanil (8.8분); 4, Thifluzamide (10.2분)

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/0.1% formic acid 수용액 (55/45, v/v)
이동상 유량 : 0.3 mL/min

검체 주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Capillary temperature : 350℃
Needle voltage : 4.0 kV
분자량 범위 (*m/z*) : 200~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Boscalid	8.0	342	343 [$(M+H)^+$], 345 [$(M+2+H)^+$]
Flutolanil	11.1	323	324 [$(M+H)^+$]
Mepronil	10.0	269	270 [$(M+H)^+$]
Thifluzamide	14.9	526	527 [$(M+H)^+$], 529 [$(M+2+H)^+$], 531 [$(M+4+H)^+$],

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 boscalid, flutolanil, mepronil 및 thifluzamide는 각종 식물병원균의 호흡과정 중 succinate dehydrogenase나 그와 연관된 전자전달계를 저해함으로써 살균작용을 나타내는 phenylbenzamide계 살균제들이다. 침투 또는 반침투성 약제들로서 각종 작물 재배 시에 예방 및 치료의 목적으로 주로 전면살포용으로 사용된다. 대상성분들은 모화합물이 유효성분이고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 모화합물 잔류량으로 정의된다.

- 대상 성분들은 log P_{ow} 값이 3.0~4.2 범위로 비극성 화합물이며 해리성이 없거나 매우 미약하여 GLC로 분석이 가능할 것으로 생각되나, 휘발성이 비교적 낮고 분자 내에 존재하는 amide기의 열에 대한 취약성으로 인하여 분석의 재현성이 불량한 단점이 있다. 따라서 제시한 분석법에서는 HPLC를 분석기기로 이용한다. 대상 성분들은 분자 내에 자외영역을 강하게 흡광하는 발색단을 모두 가지고 있으므로 검출기는 UVD를 사용한다. 그러나 240 nm 이상에서 흡광계수 10^4 이상을 나타내는 장파장의 발색단은 관찰되지 않아 측정 파장이 220 nm의 단파장이므로 검체 중에서 함께 추출되는 불순물에 의한 간섭이 우려되고 이에 따라 추출액의 면밀한 정제과정이 필수적이다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 비극성 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이므로 추출효율에 대한 문제는 없다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. Acetone 추출액을 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 직접 비극성 유기용매로 분배하는 방법을 이용하는데 농축 과정을 생략할 수 있어 간편하고 비극성 또는 중간 극성인 대상 화합물 모두에 대하여 우수한 분배효율을 나타낸다. 분배 용매로서 *n*-hexane은 비극성 정도가 너무 크므로 대상 성분들의 분배 효율이 65~90%로 불량하다. Dichloromethane이나 dichloromethane/ *n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액은 분배 효율이 모두 95%이상으로 우수하나, 분배되는 불순물의 양을 최소화하기 위하여 상대적으로 보다 비극성인 dichloromethane/ *n*-hexane 혼합액을 사용한다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. Acetonitrile로 2회 추출하였을 때의 분배효율은 대상성분 모두 90% 이상이다. 추출회수를 3회로 하였을 경우 효율 증가는 5% 미만이고 상대적으로 불순물의 양이 크게 증가하므로 분배 추출은 2회로 한정한다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략할 수 있다.

- 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 흡착크로마토그래피법은 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 정제 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. 용출체계는 용출 강도를 달리하여 세척 및 용출 분획으로 구분, 간섭물질을 최대한 제거한다. 대상 성분들의 극성 차이가 어느 정도 있으므로 세척용매의 강도가 다소 약한데, 더 이상 높이면 thifluzamide 등 일부 비극성 성분들의 손실을 초래할 수 있다. 용출용매는 ethyl acetate/dichloromethane 혼합액을 사용하는데 두 용매가 비슷한 극성이면서도 흡착제에 대한 용출강도가 서로 다른 특성을 이용, 간섭물질과의 분리 가능성을 최대화하기 위한 것이다.

- HPLC 분석 시 측정 파장이 220 nm로 짧으므로 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성이 높다. 따라서 HPLC 상 머무름 시간을 가급적 길게 설정하여 간섭의 가능성을 최소화하는 것이 필요하다. 제시한 분석법의 정량한계는 0.04 mg/kg이고 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 78~112%와 10% 미만이므로 대부분의 농산물 중 잔류허용기준에 대하여 적부판정을 정확히 수행할 수 있다.

- 검출된 잔류량의 재확인을 위한 LC-MS에서 이온화는 electrospray ionization법을 사용하는데 대상농약들은 소량의 formic acid를 protonation enhancer로서 첨가한 이동상 조건에서 용이하게 $(M+H)^+$ ion을 생성한다. 이온화 정도는 mepronil과 flutolanil이 높고 boscalid와 thifluzamide는 상대적으로 낮은 편이다. Selected-ion monitoring (SIM)용 ion은 mepronil과 flutolanil에 대해서는 $(M+H)^+$ ion을 적용하나 boscalid와 thifluzamide는 각각 분자 내에 염소와 브롬 원자를 2개씩 함유하고 있으므로 isotope abundance에 의하여 $(M+H)^+$:$(M+2+H)^+$:$(M+4+H)^+$가 각각 100:64:10과 51:100:49의 비율로 나타난다. 따라서 boscalid의 경우 $(M+2+H)^+$, thifluzamide의 경우 $(M+2+H)^+$:$(M+4+H)^+$를 SIM용 ion으로 추가 설정할 수 있어 보다 정확한 정성이 가능하다. 최종 검체용액은 충분히 정제된 상태이므로 재확인법으로 설정된 LC-MS로도 분석이 가능하다. 즉, 정량한계가 0.05 mg/kg으로 설정된 일부 농산물 검체에 대해서는 LC-MS를 이용하여 보다 고감도로 분석하는 것이 가능한데 정량성 확보를 위해서는 반드시 matrix-matched calibration법을 적용하여야 한다.

표 2. 농산물 검체 중 회수율

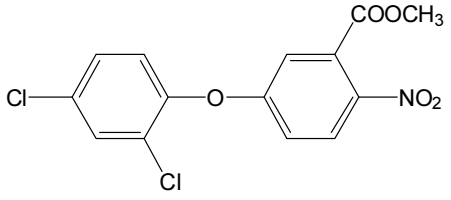
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	고추	배추	대두
Boscalid	0.04	111.9±9.8	96.8±3.2	84.9±3.0	84.2±2.1	84.2±5.6
	0.4	93.3±2.0	94.9±4.6	79.8±4.2	82.3±2.5	84.0±1.6
	2	84.7±2.5	95.1±3.9	78.0±1.3	80.9±2.4	85.6±0.8
Flutolanil	0.04	98.4±5.4	94.5±2.0	84.1±2.0	88.7±1.5	110.9±3.9
	0.4	90.4±3.1	93.9±1.4	83.7±4.9	82.8±2.6	89.0±2.3
	2	81.8±2.1	97.0±4.1	82.8±1.8	80.5±3.1	86.4±1.7
Mepronil	0.04	89.2±3.6	95.2±2.1	83.0±1.8	84.9±1.0	83.0±4.9
	0.4	87.2±2.3	93.2±0.8	81.0±2.1	82.5±3.0	83.8±2.1
	2	82.0±2.3	97.9±4.0	82.1±2.1	80.8±3.6	84.7±0.9
Thifluzamide	0.04	98.7±5.9	99.6±6.3	88.9±2.0	104.3±1.5	82.9±3.2
	0.4	96.1±6.6	93.3±2.7	82.3±2.7	83.6±3.1	88.3±1.4
	2	89.9±4.1	95.0±2.9	78.4±3.2	83.1±1.9	85.4±0.9

8.3.25 잔류농약 분석법 4.1.3.32

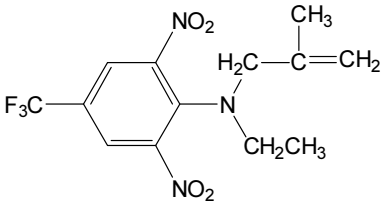
비페녹스(Bifenox), 에탈풀루라린(Ethalfluralin), 메토라크로르(Metolachlor), 옥시풀루오르펜(Oxyfluorfen), 프레틸라클로르(Pretilachlor), 테닐클로르(Thenylchlor), 트리풀루라린(Trifluralin)

1) 대상 농약의 특성

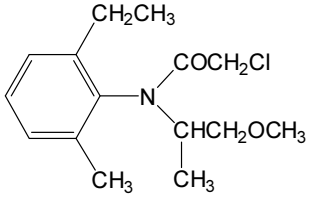
- 분자구조



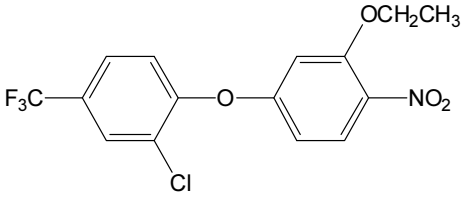
Bifenox



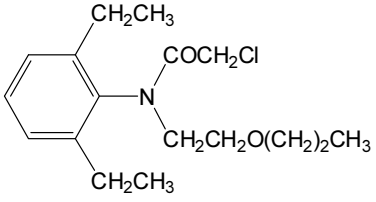
Ethalfluralin



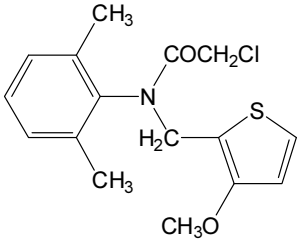
Metolachlor



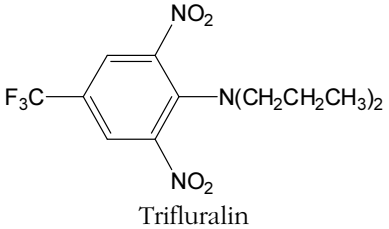
Oxyfluorfen



Pretilachlor



Thenylchlor



Trifluralin

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Bifenox	methyl 5-(2,4-dichlorophenoxy)-2-nitrobenzoate
Ethalfluralin	*N*-ethyl-α,α,α-trifluoro-*N*-(2-methylallyl)-2,6-dinitro-*p*-toluidine
Metolachlor	2-chloro-6'-ethyl-*N*-(2-methoxy-1-methylethyl)aceto-*o*-toluidine
Oxyfluorfen	2-chloro-α,α,α-trifluoro-*p*-tolyl 3-ethoxy-4-nitrophenyl ether
Pretilachlor	2-chloro-2',6'-diethyl-*N*-(2-propoxyethyl)acetanilide
Thenylchlor	2-chloro-*N*-(3-methoxy-2-thenyl)-2',6'-dimethylacetanilide
Trifluralin	α,α,α-trifluoro-2,6-dinitro-*N,N*-dipropyl-*p*-toluidine

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Bifenox	$C_{14}H_9Cl_2NO_5$	342.1	341.0
Ethalfluralin	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	333.3	333.1
Metolachlor	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	283.8	283.1
Oxyfluorfen	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	361.7	361.0
Pretilachlor	$C_{17}H_{26}ClNO_2$	311.9	311.2
Thenylchlor	$C_{16}H_{18}ClNO_2S$	323.8	323.1
Trifluralin	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335.3	335.1

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Bifenox	4.5	0.35	0.32 (30℃)	비해리성
Ethalfluralin	5.1	0.30	11.7 (25℃)	비해리성
Metolachlor*	2.9	488	4.2 (25℃)	비해리성
Oxyfluorfen	4.5	0.12	2.7×10^{-2} (25℃)	비해리성
Pretilachlor	3.9	74	0.65 (25℃)	비해리성
Thenylchlor	3.5	26	2.8×10^{-2} (25℃)	비해리성
Trifluralin	4.8	0.22	6.1 (25℃)	비해리성

* 거울상입체이성질체의 라세미체.

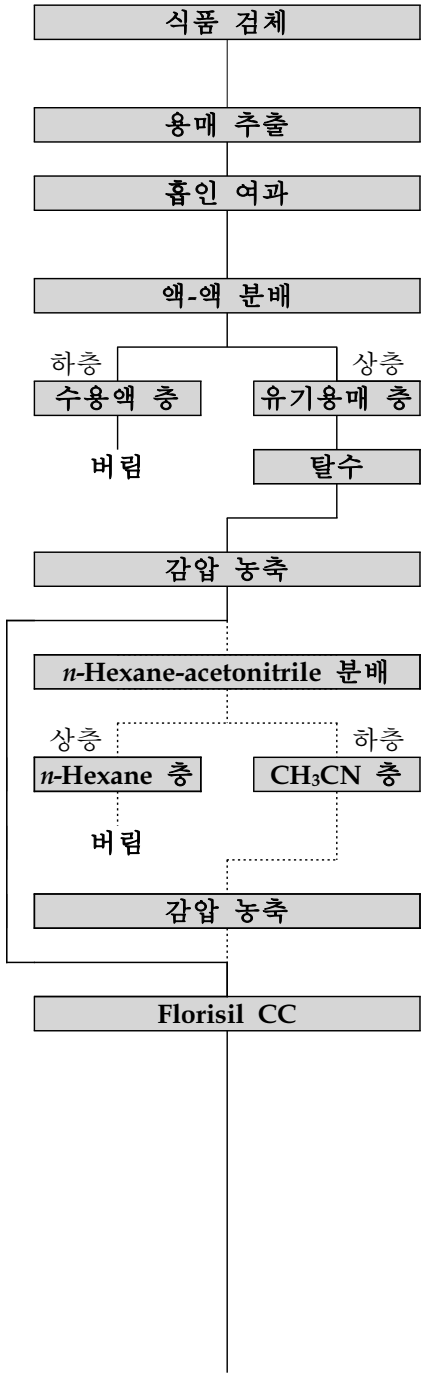
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bifenox	0.3	0.05	-	-	0.05	-	-
Ethalfluralin	0.039	0.05	-	0.05	0.05	0.05	0.05
Metolachlor	0.097	0.1~0.3	0.1	0.1~1.0	0.3	0.1~0.5	0.2
Oxyfluorfen	0.003	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Pretilachlor	0.018	0.1	-	-	-	-	-
Thenylchlor	0.068	0.05	-	-	-	-	-
Trifluralin	0.015	0.05	0.05	0.05~1.0	0.1	0.05	0.05

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 균질 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 다량의 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 혼합액으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압농축하고 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하여 유지 및 비극성 방해물질을 제거한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 최종 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 콩류 검체의 경우 물 20mL를 가하여 30분간 습윤화
- Acetone 100mL을 가하여 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- Acetone 40mL로 잔류물을 씻어 합침
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- CH_2Cl_2/*n*-hexane (20/80) 100mL로 분배
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- **곡류 및 콩류 등 유지검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (CH_3CN 포화) 40mL에 재용해
- CH_3CN (*n*-hexane 포화) 40mL × 2회 분배추출
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 100mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- CH_2Cl_2/*n*-hexane (10/90) 150mL → 버림
- CH_2Cl_2/*n*-hexane (40/60) 150mL → 받음 (ethalfluralin 및 trifluralin 분획)
- CH_2Cl_2/CH_3CN/*n*-hexane (50/0.5/49.5) 150mL → 받음 (bifenox 및 oxyfluorfen 분획)
- CH_2Cl_2/CH_3CN/*n*-hexane (50/4/46) 150mL → 받음 (metolachlor, pretilachlor 및 thenylchlor 분획)

감압 농축
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해

GLC/ECD

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 140℃에서 검체를 주입하고 240℃까지 4℃/min의 비율로 온도를 상승시키고 재차 280℃까지 10℃/min의 비율로 온도를 상승시킨다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10 mL/min
메이크업 가스 및 유량 : nitrogen, 55 mL/min
주입량 : 1 μL, 직접주입법

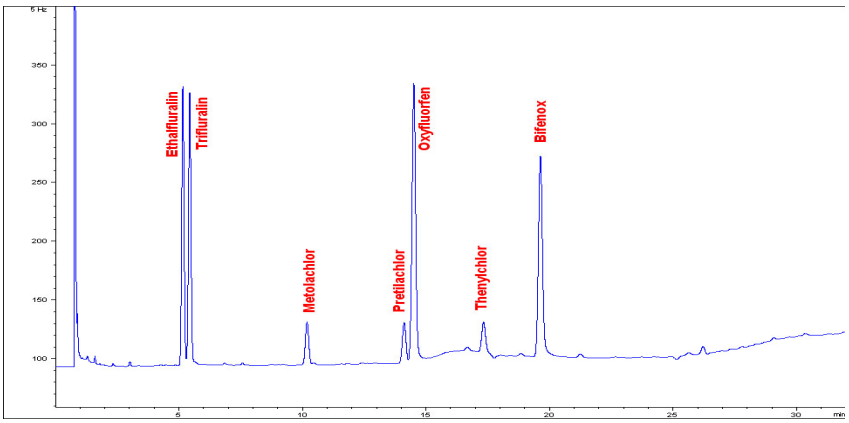


그림 1. 기체크로마토그래피에서 표준품의 크로마토그램

1, bifenox (19.7분); 2, ethalfluralin (5.1분); 3, metolachlor (10.2분); 4, oxyfluorfen (14.6분); 5, pretilachlor (14.1분); 6, thenylchlor (17.3분); 7, trifluralin (5.5분), 각 0.05 ng.

분석법의 정량한계

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Bifenox	0.006	Pretilachlor	0.008
Ethalfluralin	0.004	Thenylchlor	0.02
Metolachlor	0.008	Trifluralin	0.004
Oxyfluorfen	0.002		

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 220℃에서 3분간 유지한다. 다시 240℃까지 3℃/min의 비율로 온도를 상승시키고 재차 280℃까지 20℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 15분간 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
Interface 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 2 mL/min
주입량 : 1 μL, split (1:30)
이온화 : 전자충격 (electronic impact, EI), 70 eV
분자량 범위 (*m/z*) : 50~500

표 1. 기체크로마토그래프·질량분석기 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Bifenox	21.1	341	311, 341, 343
Ethalfluralin	5.2	333	276, 316
Metolachlor	10.3	283	162, 238
Oxyfluorfen	14.5	361	252, 300, 361
Pretilachlor	14.2	311	162, 176, 238
Thenylchlor	18.2	323	127, 288
Trifluralin	5.3	335	264, 306

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 bifenox, ethalfluralin, oxyfluorfen 및 trifluralin은 diphenyl ether계, metolachlor, pretilachlor 및 thenylchlor는 chloroacetamide계의 선택성 제초제로서 다양한 작물 재배 시 각종 잡초를 방제하기 위하여 전면살포용 또는 토양처리용 제형으로 사용된다. 대상성분들은 모화합물이 유효성분이고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 모화합물 잔류량으로 정의된다.

- 대상 성분들은 log P_{ow} 값이 2.9~5.1 범위로 비극성 화합물이고 해리성이 없는 중성화합물이며 증기압이 0.027~11.7 mPa 범위로 휘발성도 어느 정도 있으므로 충분히 GLC로 분석이 가능하다. 검출기로는 diphenyl ether계 화합물의 경우 분자 내에 최소한 염소원자 2개 또는 불소원자 3개 그리고 nitro기 1개 이상을 함유하고 있으므로 ECD에 대한 감도가 매우 높다. Chloroacetamide계 화합물의 경우 분자 내에 질소원자를 1개만 함유하고 있어 NPD에 대한 감도는 그다지 높지 않다. 염소원자는 1개만을 함유하고 있으나 conjugated carbonyl기의 존재에 따라 ECD에 대한 감도는 높은 편이다. 따라서 대상 화합물 모두를 분석하기 위한 검출기로는 ECD가 최선이다. 대상 성분들의 GLC/ECD에 대한 감도가 높은 편이므로 검체 조제과정은 과다한 농축과정 없이 일상적인 비극성 농약의 잔류분석과정을 준용하여도 큰 무리가 없다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 비극성 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이므로 추출효율에 대한 문제는 없다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. Acetone 추출액을 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 직접 비극성 유기용매로 분배하는 방법을 이용하는데 농축과정을 생략할 수 있어 간편하고 비극성 또는 중간 극성인 대상 화합물 모두에 대하여 우수한 분배효율을 나타낸다. 분배 용매로서 *n*-hexane은 비극성 정도가 너무 크므로 극성이 다소 큰 metolachlor의 분배 효율이 86%로 다소 불량하다. Dichloromethane이나 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액은 분배 효율이 모두 90%이상으로 우수하나, 분배되는 불순물의 양을 최소화하기 위하여 상대적으로 보다 비극성인 dichloromethane/*n*-hexane 혼합액을 사용한다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. 유지 등은 GLC 분석 시 분리용 column을 오염시켜 column efficiency가 급격히 열등해지므로 분리능의 항상성을 위하여 필수적으로 제거한다. Acetonitrile로 2회 추출

하였을 때의 분배효율은 대상성분 모두 90% 이상이다. 추출회수를 3회로 하였을 경우 효율은 대등하거나 5% 미만의 증가를 나타내고 상대적으로 불순물의 양이 크게 증가하므로 분배 추출은 2회로 한정한다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략할 수 있다.

- 검체액의 최종 정제에는 잔류농약분석법에서 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 가장 많이 사용하는 흡착크로마토그래피법을 적용한다. 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용하고 용출체계는 용출 강도를 달리하여 세척 및 용출 분획으로 구분, 간섭물질을 최대한 제거한다. 대상 성분들의 극성 차이가 상당히 있으므로 용출용매의 강도를 조절, 극성에 따라 3개 분획으로 대상 성분들을 선별하여 용출시킨다.

- GLC에서 분리용 column으로는 100% methylsilicone (DB-1 등)을 liquid phase로 사용하는 것이 가장 화합물별 분리 정도가 우수하다. Phenylsilicone이 5% (DB-5 등) 또는 50% (DB-17 등) 함유되었을 때는 ethalfluralin과 trifluralin이 부분 분리 또는 겹침이 관찰된다. Column 온도는 승온법을 사용하였는데 이는 ethalfluralin과 trifluralin을 완전 분리하기 위한 것이며 그 외 성분들은 등온조건에서 분석하여도 분리 상의 문제는 없다. Metolachlor의 경우 2-methoxy-1-methylethyl기의 1번 탄소가 chiral성이므로 거울상이성질체가 존재하며 *S*-이성질체 위주로 별도의 제초제가 시판되고 있으나 일상적 GLC에서는 분리되지 않는다. 검체 분석은 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용하여 정량 분석의 재현성을 확보한다. 제시한 분석법의 정량한계는 diphenyl ether계의 경우 0.002~0.006 mg/kg, chloroacetamide계의 경우 0.008~0.02 mg/kg 범위이다. 가장 감도가 낮은 thenylchlor의 경우도 최소 잔류허용기준의 1/2이하를 검출할 수 있는 충분한 감도를 나타낸다. 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 76~115%와 10% 미만이므로 농산물 중 잔류허용기준에 대하여 정확한 적부판정을 수행할 수 있다.

- 재확인을 위한 GC-MS의 electronic impact (EI) 조건에서 대상농약들은 충분한 intensity로 이온화된다. 특히 bifenox와 oxyfluorfen의 경우 분자이온 (M^+)이 충분한 강도로 관찰되므로 보다 정확한 정성이 가능하다. Bifenox의 경우 분자이온 (M^+)이 base peak이고 2개의 염소원자 함유에 따라 isotope abundance에 의한 $(M)^+$:$(M+2)^+$의 비율이 100:64로 나타나므로 $(M+2)^+$ ion을 SIM용 ion으로 추가 설정할 수 있다. 그 외 성분들에서는 분자이온 (M^+)이 충분한 강도로 관찰되지 않으므로 분자구조를 최대한 반영할 수 있는 fragment ion을 SIM용 ion으로 설정한다.

표 2. 농산물 검체 중 회수율

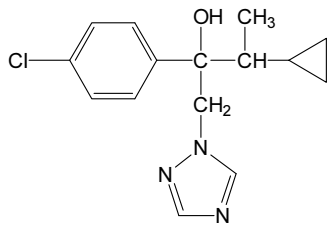
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	고추	배추	대두
Bifenox	0.006	107.2±1.2	108.2±2.4	106.6±4.9	92.0±2.0	105.4±6.2
	0.06	103.3±2.0	93.9±3.7	83.0±2.5	89.0±4.7	101.1±8.2
	0.3	103.4±2.2	86.0±1.1	82.2±2.3	93.5±1.2	95.8±1.5
Ethalfluralin	0.004	97.6±4.6	94.5±3.7	98.8±8.4	91.6±4.5	94.8±5.2
	0.04	89.6±4.3	89.8±6.8	98.1±3.9	91.0±7.2	86.7±2.4
	0.2	93.1±3.6	90.5±1.5	105.2±2.1	108.8±4.5	86.6±3.4
Metolachlor	0.008	107.6±1.6	86.9±7.5	89.4±4.8	78.3±2.5	105.2±3.3
	0.08	79.2±5.0	83.2±2.4	76.3±4.2	83.6±3.9	84.5±8.0
	0.4	97.4±1.8	102.4±3.0	89.7±0.6	92.8±2.4	93.4±0.5
Oxyfluorfen	0.002	77.9±2.1	102.6±4.5	90.9±1.1	88.7±2.8	107.8±2.6
	0.02	99.2±2.5	107.9±1.4	89.9±4.6	94.4±4.3	97.5±2.6
	0.1	101.2±8.6	109.1±1.5	106.3±3.2	107.0±1.1	98.3±0.9
Pretilachlor	0.008	83.3±1.7	89.6±4.4	79.1±5.3	85.8±6.2	109.6±4.0
	0.08	92.2±3.9	96.0±1.3	81.1±4.5	85.1±0.8	99.8±1.9
	0.4	93.8±1.3	101.5±1.7	82.7±0.8	89.7±1.7	92.6±1.3
Thenylchlor	0.02	108.2±7.9	107.3±0.6	75.7±1.6	99.1±5.7	110.7±8.2
	0.2	95.0±2.0	101.2±1.0	80.3±1.5	81.6±0.3	104.9±1.8
	1	90.2±1.4	99.3±1.8	79.1±0.6	83.6±2.6	108.1±0.7
Trifluralin	0.004	99.4±3.8	99.3±2.8	104.9±5.3	103.4±8.1	98.8±4.8
	0.04	92.9±4.0	98.2±5.8	104.6±5.7	96.9±8.8	89.7±3.0
	0.2	92.0±4.9	92.3±1.3	114.8±2.1	113.2±4.0	86.7±3.2

8.3.26 잔류농약 분석법 4.1.3.33

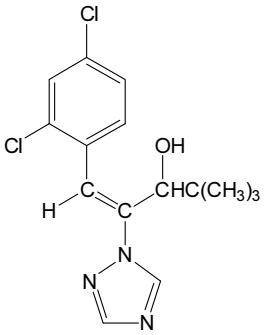
싸이프로코나졸(Cyproconazole), 디니코나졸(Diniconazole), 푸루실라졸(Flusilazole), 펜코나졸(Penconazole), 터부코나졸(Tebuconazole)

1) 대상 농약의 특성

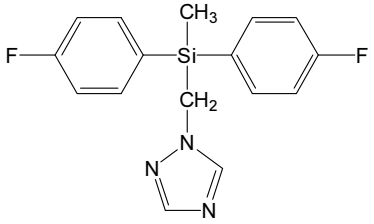
- 분자구조



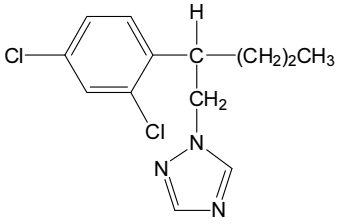
Cyproconazole



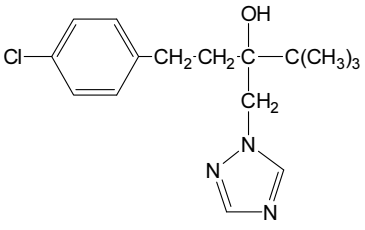
Diniconazole



Flusilazole



Penconazole



Tebuconazole

- 화학명

일반명 (ISO)	화학명 (IUPAC)
Cyproconazole	(*2RS,3RS;2RS,3SR*)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl) butan-2-ol
Diniconazole	(*E*)-(*RS*)-1-(2,4-duchlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl) pent-1-en-3-ol
Flusilazole	bis(4-fluorophenyl)(methy)(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)silane
Penconazole	1-(2,4-dichloro-β-propylphenethyl)-1*H*-1,2,4-triazole
Tebuconazole	(*RS*)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol

- 화학식량

대상성분	분자식	평균분자량	질량분석 시의 M+질량
Cyproconazole	$C_{15}H_{18}ClN_3O$	291.8	291.1
Diniconazole	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O$	326.2	325.1
Flusilazole	$C_{16}H_{15}F_2N_3Si$	315.4	315.1
Penconazole	$C_{13}H_{15}Cl_2N_3$	284.2	283.1
Tebuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	307.8	307.2

- 물리화학적 특성

대상성분	Log P_{ow}	물에 대한 용해도 (mg/L)	증기압 (mPa)	pKa
Cyproconazole*	3.1	93	2.6×10^{-2} (25℃)	비해리성
Diniconazole**	4.3	4.0	4.9 (25℃)	비해리성
Flusilazole	3.7	45 (pH 7.8) 54 (pH 7.2) 900 (pH 1.1)	3.9×10^{-2} (25℃)	2.5 (짝산)
Penconazole**	3.7	73	0.37 (25℃)	1.5 (짝산)
Tebuconazole**	3.7	36	1.7×10^{-3} (20℃)	비해리성

* 부분입체이성질체의 혼합물.

** 거울상입체이성질체의 혼합물.

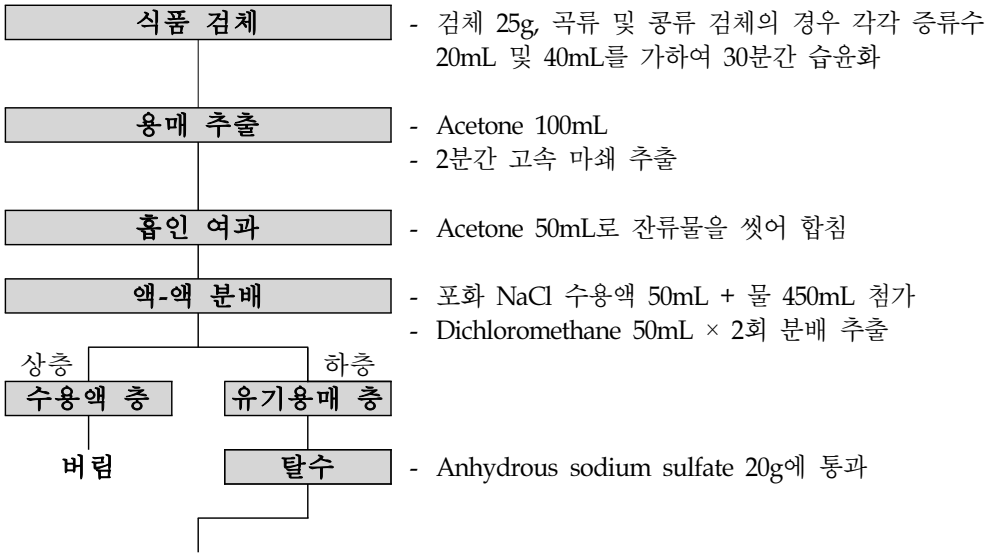
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

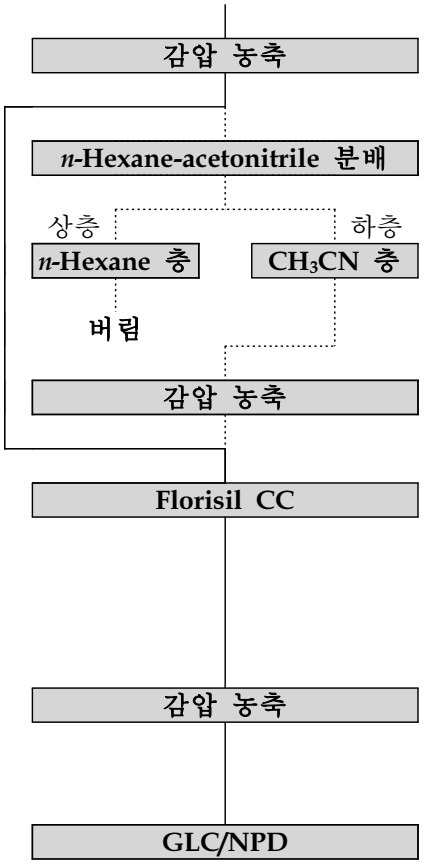
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cyproconazole	0.02	-	0.1~0.2	-	-	-	-
Diniconazole	0.02	-	1.0	0.05~0.3	-	-	-
Flusilazole	0.007	-	0.2~0.5	0.05~2.0	-	-	-
Penconazole	0.03	-	0.1~0.5	0.1~0.3	-	-	-
Tebuconazole	0.03	0.05	0.05~10	0.05~5.0	-	0.1	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 균질 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 다량의 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압농축하고 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하여 유지 및 비극성 방해물질을 제거한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 최종 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 40℃이하에서 농축 건고

- **곡류 및 콩류 등 유지검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 40mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배추출

- 40℃이하에서 농축 건고
- 건고 후 dichloromethane 10mL에 재용해

- Florisil 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (4/96) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (40/60) 50mL → 받음

- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 ethyl acetate에 녹인 DAMAB 0.4mg/L 용액 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 180℃ (cyproconazole, penconazole)
190℃ (diniconazole, flusilazole, tebuconazole)
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 200℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 20 mL/min
메이크업 가스 및 유량 : helium, 5 mL/min
연료가스 및 유량 : hydrogen 및 air 유량을 검출기 최적조건으로 조정

주입량 : 1 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 :

대상성분	정량한계 (mg/kg)	대상성분	정량한계 (mg/kg)
Cyproconazole	0.02	Penconazole	0.02
Diniconazole	0.02	Tebuconazole	0.03
Flusilazole	0.02		

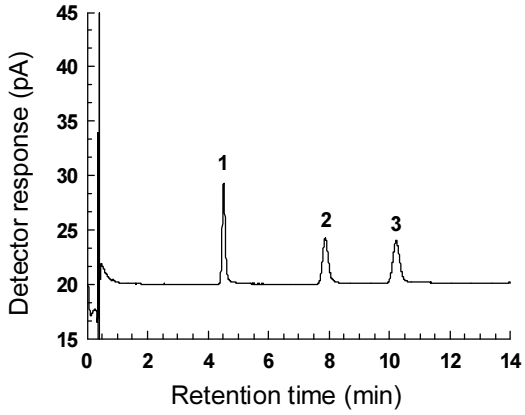


그림 1. 기체크로마토그래피에서 표준혼합액1의 크로마토그램

1, 펜코나졸 (4.5분) 0.5 ng; 2, 싸이프로코나졸 (7.9분) 0.5 ng;
3, DAMAB (내부표준물질, 10.3분) 0.4 ng

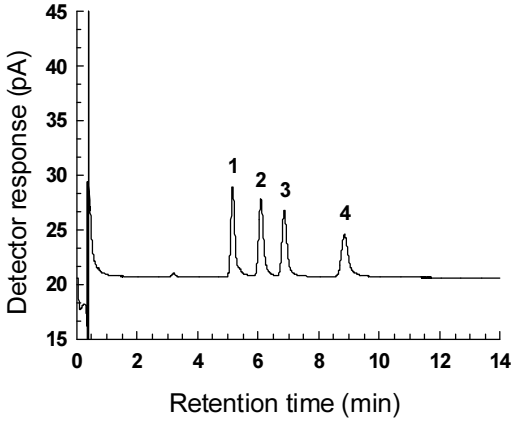


그림 2. 기체크로마토그래피에서 표준혼합액2의 크로마토그램

1, 푸루실라졸 (5.1분) 0.5 ng; 2, 디니코나졸 (6.0분) 0.5 ng;
3, DAMAB (내부표준물질, 6.8분) 0.4 ng; 4, 터부코나졸 (8.8분), 0.5 ng

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 20℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 200℃에서 2분간 유지한다. 다시 5℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 240℃
Interface 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 2 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless (purge time 1.0분)
이온화 : 전자충격 (electronic impact, EI), 70 eV
분자량 범위 : 100~400

표 1. GC-MS 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Cyproconazole	18.1, 18.2	291	222, 224, 139
Diniconazole	18.7	325	268, 270
Flusilazole	17.6	315	233, 206
Penconazole	15.5	283	248, 159, 161, 250
Tebuconazole	20.6	307	250, 125

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 cyproconazole, diniconazole, flusilazole, penconazole 및 tebuconazole은 각종 식물병원균의 세포막 형성에 필수적인 steroid 생합성 과정 중 ergosterol의 생합성 단계를 저해하는 EBI계 살균제이다. 침투성 약제들로서 각종 작물 재배 시에 예방 및 치료의 목적으로 주로 전면살포용으로 사용된다. 대상성분들은 모화합물이 유효성분이고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 전적으로 모화합물 잔류량으로 정의된다.

- 대상 성분들은 log P_{ow} 값이 3.1~4.3 범위인 비교적 극성이 낮은 성분들이다. 이들 농

약은 aryl-aryl 또는 aryl-alkyl의 bridge구조를 가지고 있으며 bridge내 특정 탄소에 triazole ring이 결합되어 있는 점이 특징적이다. Flusilazole을 제외한 대상 성분의 bridge내 특정 탄소는 chiral성이므로 거울상이성질체가 존재하나 광학활성을 제외한 물리적 특성이 동일하므로 일상적 크로마토그래피에서는 분리되지 않는다. Cyproconazole은 분자 내에 2개의 chiral carbon을 갖고 있어 diastereoisomer가 존재하며 물리적 특성이 상이하므로 크로마토그래피에서 column의 분리능에 따라 2개의 분리 peak로 나타난다. Diniconazole은 분자 내에 2개의 chiral carbon과 이중결합에서 *cis-trans* isomerism이 관찰되나 이 중 *E*-isomer만을 시판하므로 거울상이성질체 쌍과 마찬가지로 일반적인 크로마토그래피에서는 분리되지 않는다.

- 분석성분들은 비극성이며 증기압이 0.0017~4.9 mPa 범위로 휘발성이 다소 낮은 편이나 열에 대해 안정성이 있어 기기분석법으로는 GLC가 충분히 가능하다. 대상 화합물들의 분자구조 내 triazole ring에 모두 3개의 질소를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD가 좋으나 다소 불안정한 검출기이므로 재현성 확보를 위한 최적화가 요구된다. Flusilazole과 penconazole은 염기성 화합물이나 짝산의 pKa가 1.5~2.5로 알려져 있어 그 해리 정도가 매우 약하므로 비해리 중성 화합물로 취급, 분석하여도 무리가 없다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 사용되는 표준적 용매이므로 추출효율에 대해서는 아무런 문제가 없다. 검체 추출액으로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. Acetone 추출액을 물로 희석하고 포화 NaCl 수용액을 첨가하여 dichloromethane으로 분배하는 방법은 농축과정을 생략할 수 있어 간편하고 비극성 또는 중간 극성인 대상 화합물 모두에 대하여 우수한 분배효율을 나타낸다. 분배 용매로서 *n*-hexane은 비극성 정도가 너무 크므로 대상성분들의 분배 효율이 46~86%로 불량하다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. 유지 등은 GLC 분석 시 NPD의 반응성에는 큰 영향이 없으나 분리용 column을 오염시켜 column efficiency가 급격히 열등해지므로 분리능의 항상성을 위하여 필수적으로 제거한다. Acetonitrile로 2회 추출하였을 때의 분배효율은 대상성분 모두 95% 이상이다. 추출회수를 3회로 하였을 경우, 효율은 대등하나 상대적으로 불순물의 양이 크게 증가하므로 분배 추출은 2회로 한정한다. *n*-Hexane- acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략할 수 있다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/dichloromethane 혼합액으로 구성된 세정 및 용출 용매체계는 두 용매가 비슷한 극성이면서도 흡착제에 대한 용출강도가 서로 다른 특성을 최대한 이용한 것이다. 화합물별 용출 순서는 flusilazole 〉 penconazole 〉 diniconazole 〉 tebuconazole ≒ cyproconazole 순이다. Tebuconazole과 cyproconazole이 다른 3성분에 비하여 상당히 늦게 용출되나 별도의 분획화는 어렵다. 따라서 세척용으로 ethyl acetate/dichloromethane (4/96, v/v) 혼합액을 사용하고 전 대상 성분을 ethyl acetate/dichloromethane (40/60, v/v) 혼합액 1개 분획으로 용출시킨다. 용출강도의 차이가 상당히 있음에도 불구하고 기기분석을 위한 최종용액은 일부 황색 색소만이 혼입되며 전체적으로 정제정도가 우수하여 GLC에 연속적으로 검체용액을 주입하는 것이 가능하다.

- GLC에서 분리용 column으로는 화합물들의 극성을 고려하여 5% phenylsilicone이 함유된 methylsilicone (DB-5 등)의 liquid phase를 사용하는데 50% phenylsilicone이 함유된 극성 liquid phase (DB-17 등)에서도 분석이 가능하나 column 온도가 상대적으로 높아 열분해 가능성이 크고 감도도 낮은 편이다. 대상 화합물들은 GLC 분석 대상농약 중 휘발성이 다소 낮은 편이며 극성이 어느 정도 있는 화합물이 포함되어 있으므로 0.25나 0.32 mm 내경의 capillary column을 승온조건으로 하여 splitless 주입법을 사용할 경우 재현성이 불량할 가능성이 높다. 따라서 충분히 conditioning된 내경 0.53 mm의 capillary column을 등온조건으로 채용하고 packed inlet 상에서 직접 검체 주입하는 방법을 사용하면 비교적 용이하게 우수한 재현성을 얻을 수 있다. 아울러 NPD의 안정성 등을 포함한 기기분석의 재현성을 보다 높이기 위하여 내부표준법 (internal standardization)을 적용한다. 내부표준물질로는 4-dimethylamino-2-methylazobenzene (DAMAB)을 사용하는데 검체 중에서 간섭하는 물질은 관찰되지 않으므로 일정량이 함유된 내부표준용액으로 최종 검체용액을 조제 한다.

- 제시한 분석법의 정량한계는 0.04 mg/kg이고 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 77～114%와 10% 미만이므로 대부분의 농산물 중 잔류허용기준에 대하여 적부판정을 정확히 수행할 수 있다.

- 재확인을 위한 GC-MS의 electronic impact (EI) 조건에서 대상농약들은 충분한 intensity로 이온화된다. 모든 대상성분에서 분자이온 (M^+)이 충분한 강도로 관찰되지 않으므로 분자구조를 최대한 반영할 수 있는 fragment ion을 SIM용 ion으로 설정한다. 특히 diniconazole은 염소원자 2개, cyproconazole, penconazole 및 tebuconazole은 염소원자

1개를 함유한 fragment들이 높은 강도로 관찰된다. 따라서 isotope abundance에 의한 $(A)^+$:$(A+2)^+$의 비율이 각각 100:64 및 100:32로 나타나므로 $(A+2)^+$ ion을 SIM용 ion으로 추가 설정, 정성의 신뢰성을 높이는 것이 가능하다.

표 2. 농산물 검체 중 회수율

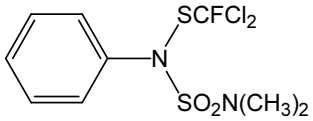
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	고추	배추	대두
Cyproconazole	0.03	99.8±1.6	93.7±1.1	77.0±2.2	97.5±1.3	92.9±3.4
	0.05	92.6±0.6	96.0±4.2	84.2±0.8	98.3±2.9	84.4±1.0
	0.5	96.8±4.3	91.0±1.8	90.1±1.0	100.1±0.6	81.1±1.2
	4.0	98.9±2.5	91.1±1.1	98.4±2.7	99.1±2.6	82.3±2.3
Diniconazole	0.03	105.6±1.0	93.6±0.7	107.7±5.8	95.8±6.3	84.8±2.9
	0.05	91.9±2.4	90.1±4.4	94.7±4.8	93.4±1.6	83.0±2.3
	0.5	84.8±1.9	93.6±0.9	90.5±1.8	95.4±1.5	81.0±0.7
	4.0	87.0±3.9	89.4±2.3	91.2±1.3	102.2±1.5	80.5±1.3
Flusilazole	0.03	110.7±2.2	96.5±1.2	108.2±5.3	95.1±0.9	81.7±1.5
	0.05	95.7±1.4	95.1±6.0	90.9±6.2	94.7±2.8	80.5±1.4
	0.5	86.6±2.0	94.0±1.1	85.5±1.4	96.3±1.1	84.9±1.4
	4.0	88.4±4.8	89.0±2.2	89.2±0.7	103.8±0.7	83.0±1.3
Penconazole	0.03	114.3±1.8	101.1±2.8	94.7±2.6	100.0±1.8	83.9±5.6
	0.05	97.2±1.4	93.9±1.4	93.4±2.6	95.7±1.3	82.4±1.9
	0.5	95.1±3.5	85.5±0.7	89.5±1.1	97.6±1.6	81.4±1.1
	4.0	97.3±3.1	86.8±1.6	94.8±1.9	99.7±1.7	81.2±1.5
Tebuconazole	0.03	103.4±2.9	90.5±1.3	101.2±5.4	97.2±1.8	85.2±3.4
	0.05	87.4±1.6	88.3±5.1	88.1±3.6	97.2±0.6	80.2±1.1
	0.5	83.0±2.5	95.2±0.8	87.1±2.1	93.1±3.2	83.5±1.1
	4.0	85.5±2.2	91.3±3.0	89.8±1.7	102.8±3.6	82.0±2.0

8.4 단성분 분석법

8.4.1 잔류농약 분석법 4.1.4.1

디크로프루아니드(Dichlofluanid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : dichlofluanid
화학명 (IUPAC) : *N*-dichlorofluoromethylthio-*N*,*N*-dimethyl-*N*-phenylsulfamide
분자식 : $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$
평균분자량 : 333.2
질량분석 시의 M+질량 : 332.0
Log P_{ow} : 3.7
물에 대한 용해도 : 1.3 mg/L
증기압 : 0.014 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

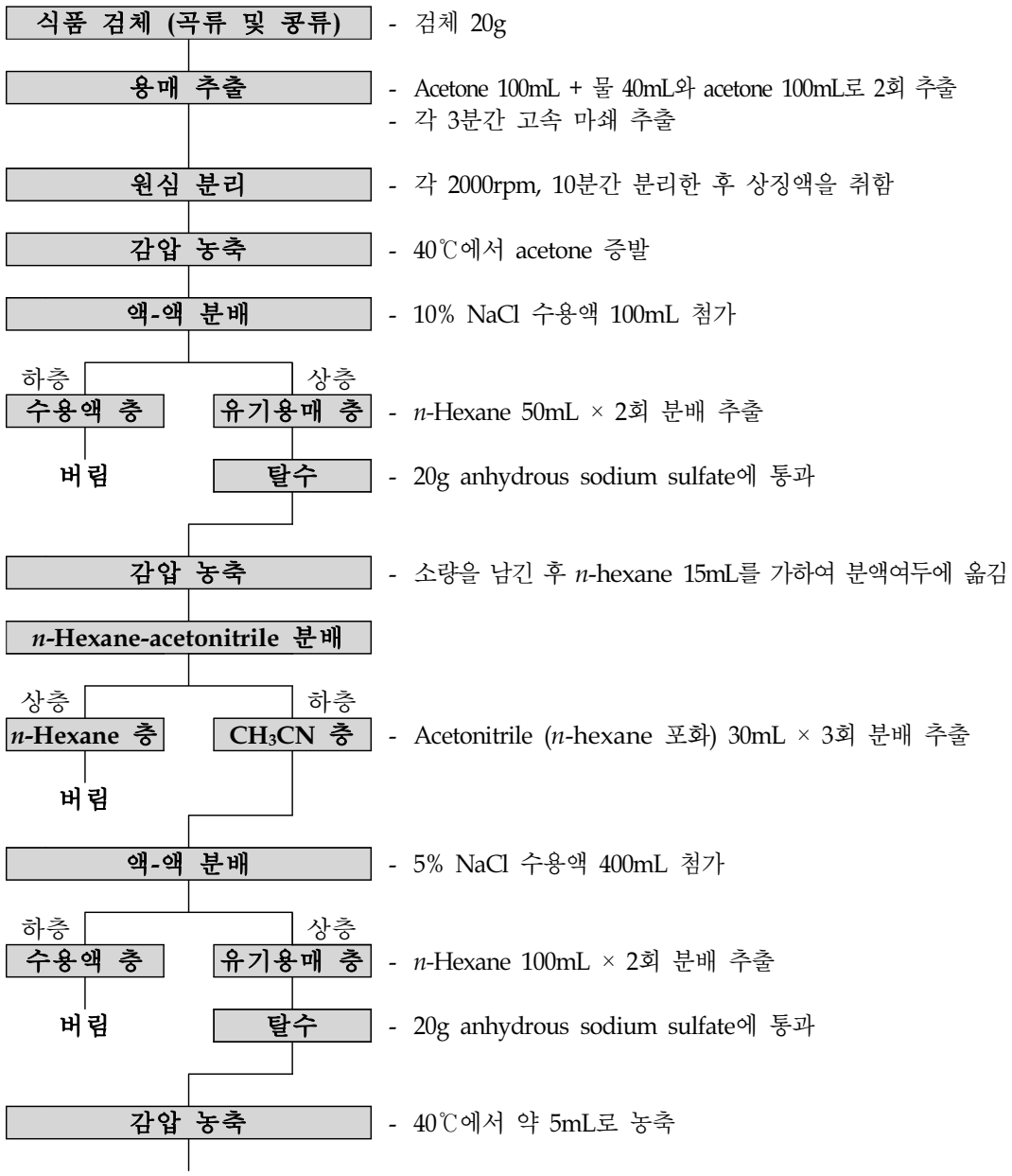
ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
	곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
0.3	0.1	2.0~15.0	0.1~15.0	0.2	0.2~15.0	0.1

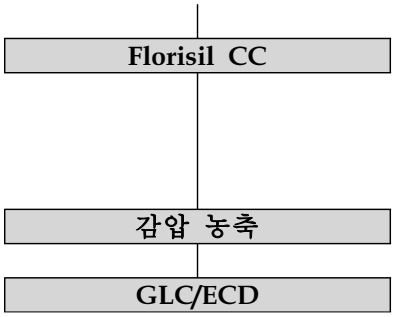
2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용액층에 NaCl 수용액을 가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexnae 추출액을 감압농축하고 현미, 콩 등 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 유지성분을 제거한 후 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

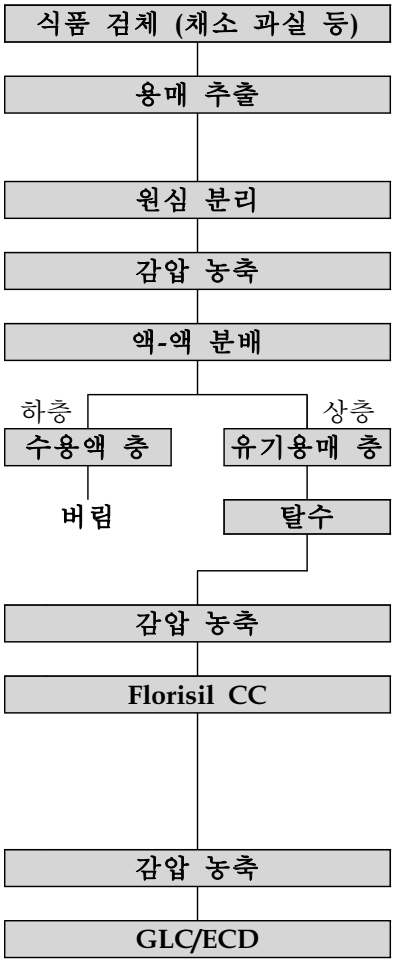
① 곡류 및 콩류





- Florisil 20g (내경 22mm, 30cm 칼럼)
- *n*-Hexane 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함.
- Ethyl ether/*n*-hexane (6/94) 200mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (50/50) 200mL → 받음
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

② 채소류, 과실류, 종실류, 견과류 및 호프



- 검체 20g
- Acetone/물 (70/30) 100mL × 2회 추출
- 각 3분간 고속 마쇄 추출
- 각 2000rpm, 10분간 분리한 후 상징액을 취함
- 40℃에서 acetone 증발
- 10% NaCl 수용액 100mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL + 50mL 2회 분배 추출
- 20g anhydrous sodium sulfate에 통과
- 40℃에서 약 5mL로 농축
- Florisil 20g (내경 22mm, 30cm 칼럼)
- *n*-Hexane 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함
- Ethyl ether/*n*-hexane (6/94) 200mL → 버림
  Ethyl ether/*n*-hexane (50/50) 200mL → 받음
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : glass column (2~3 mm i.d. × 2 m)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP (80~100 mesh) 또는 이와 동등한 것
고정상액체 : 5% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
주입부 온도 : 210℃
검출기 온도 : 210℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen (dichlofluanid가 약 14분에 유출하는 유속으로 조정)
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Dichlofluanid는 sulfamide계 살균제이다. 대상 화합물은 비극성이고 증기압이 높으므로 GLC로 분석이 유리하고 분자 내에 2개의 chlorine 원자를 함유하고 있으므로 ECD 검출기에 높은 감도를 나타낸다.

- 추출 용매로서는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone을 사용하여 대상농약들을 추출한다. 액-액 분배는 대상농약들이 비극성인 점을 감안하여 추출액을 농축한 후 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가하고 비극성 용매인 *n*-hexane으로 분배한다.

- 유지 검체에 대해서는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 이용하여 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. 현미, 콩 등 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 배추, 사과 및 감자 등에 대해서는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법에 의한 정제정도가 미미하며 불순물의 양도 상대적으로 적으므로 생략이 가능하다.

- 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 정제 효과가 뚜렷하다.

- 대표 농산물 무처리 검체에 대상성분들을 각각 2수준 3반복으로 처리하고 상기 검체 조제 및 기기분석과정을 수행하여 회수율을 산출한 결과, 처리수준 및 농산물 검체종류에 관계없이 회수율 및 분석오차는 잔류분석기준인 70~120% 범위와 10% 이내를 만족한다. 무처리 검체에서 성분별 분석에 간섭하는 방해물질은 관찰되지 않으며 정량한계는 0.01~0.05 mg/kg 수준이다.

- Dichlofluanid 잔류분의 재확인을 위한 GC-MS에서 분자이온의 상대 강도가 높지 않으므로 SIM을 위한 fragment (m/z)는 높은 강도이면서 분자구조를 반영할 수 있는 123, 167로 설정한다.

8.4.2 잔류농약 분석법 4.1.4.2

알루미늄포스파이드(Aluminium phosphide)

1) 대상 농약의 특성

AlP

일반명 (ISO) : aluminium phosphide
화학명 (IUPAC) : aluminium phosphide
분자식 : AlP
평균분자량 : 58.0
Phosphine (PH_3)의 평균분자량 : 34.0
질량분석 시 PH_3의 M+질량 : 34.0
Log P_{ow} (AlP) : 1.05 (pH 7, 20℃)
물에 대한 용해도 (AlP) : 260 mg/L (20℃)
증기압 (AlP) : 1.0×10^{-5} mPa (25℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)**					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Aluminium phosphide	0.019	0.1	-	0.01	0.01~0.1	0.01~0.1	-

* EC (2008).
** Phosphine (PH_3) 기준.

2) 분석법 개요

격막이 장착된 밀폐용기내의 검체에 산 용액을 가하고 가열하여 phosphine 가스를 발생시킨다. 용기 내의 헤드스페이스 중 일정량을 질소・인 검출기가 부착된 가스크로마토그래피로 분석하여 phosphine의 존재여부를 정성적으로 확인한다. Phosphine이 검출된 경우에는 정량을 위하여 검체를 2구 증류플라스크에 달아 넣고 질소 기류조건하에서 산을 가한 후 가열, 발생한 phosphine 가스를 포화브롬수에 포집한다. 포집된 포화브롬수를 가열하여 phosphoric acid로 전환시키고 몰리브덴산/황산하이드라진 시약과 반응, 생성된 molybdenum blue를 가시광 분광광도법으로 정량한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

- 정성 (기체크로마토그래피법)

식품 검체	- 격막이 장착된 300mL 용량의 headspace 분석용 시약병 - 분쇄 검체 10g
PH_3 발생	- 10% H_2SO_4 수용액 100mL 첨가 후 즉시 밀봉 - 60℃에서 50분간 가열 후 방냉
Headspace sampling	- Gas-tight syringe를 사용 headspace에서 50μL의 가스 시료채취
GSC/NPD	

- 정량 (분광광도법)

식품 검체	- 질소 기류관와 냉각관이 부착된 2-neck 증류 플라스크 - 분쇄 검체 500g
PH_3 발생 및 포집	- 제1, 2 흡수관에 포화브롬수 100mL를 각각 첨가한 후 외부를 얼음으로 냉각 - 10% H_2SO_4 수용액 2-L 첨가 후 즉시 냉각관 연결 - 질소 기류를 200mL/min 유속으로 30분간 통과시키고 플라스크를 가열하면서 2시간 동안 질소 기류 통과
농축	- 포집액을 500mL beaker에 옮기고 열판 상에서 약 10mL로 농축
여과	- 유리여과기 사용 후 물로 씻어 25mL로 정용
발색	- 시험용액 5.0mL + 5N H_2SO_4 수용액 2.0mL + 0.15% 황산하이드라진 수용액 0.5mL + 2.5% 몰리브덴산암모늄 수용액 1.0mL + 증류수 1.5mL (총 부피 10.0mL) - 비등 수욕 상에서 10분간 가열 후 방냉
가시광 분광광도법	- 730nm

4) 기기분석법

- 정성 (기체크로마토그래피법)

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : PLOT (porous layer open tubular) capillary column,
0.25 mm i.d. × 10 m, 3 μm)
칼럼온도 : 50℃
주입부 온도 : 220℃
검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 50 μL, split mode (50:1)

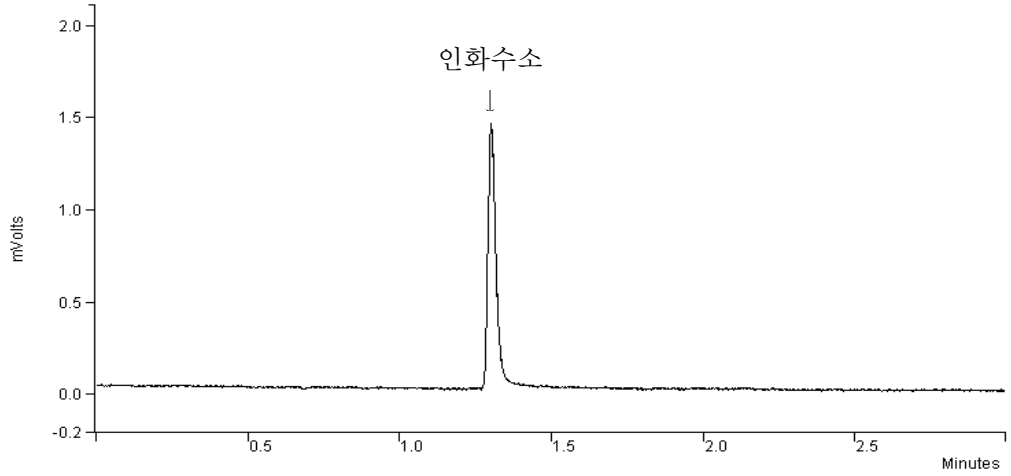


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
(Phosphine의 머무름 시간 1.3분)

- 정량 (분광광도법)

측정기기 : 가시광 분광광도계
Slit width : 2 nm 이하
Cell path : 10 mm
측정 파장 : 730 nm
분석법의 정량한계 : 0.01 mg/kg

5) 분석법 해설

- Aluminium phosphide (AlP)는 주로 저곡해충약으로 사용되는 훈증제로서 phosphine (PH_3) 전구물질 (前驅物質, precursor)이다. 즉, 고체인 AlP는 주로 정제 (錠劑) 형태로 사용하는데 공기 중의 수분에 의하여 가수분해, phosphine을 방출하며 실제 살충성분은 가스체인 phosphine이다. Phosphine은 인체에도 매우 유독한 가스이므로 일상적 농업용 살충제는 아니며 저곡창고 등 특정 밀폐지역 및 취급자에 한하여 사용되는 약제이다. 분석법의 대상 성분은 AlP가 아니라 실제 살충성분인 phosphine이다.

- 분석성분인 phosphine은 가스이므로 GC를 이용한 정량이 가능할 것으로 보이나 환원력이 강한 반응성 화합물이므로 시료 또는 기기분석과정 중 다른 성분/재질과 반응을 일으킬 가능성이 많다. 따라서 phosphine을 직접 분석대상으로 설정할 경우, 일상적 시료조제법을 이용한 GC법으로는 정량의 재현성을 얻기 힘들다. 그러므로 시료조제과정을 최소화한 headspace법과 GC를 이용하여 잔류여부만을 판별하는 정성적 확인만을 수행한다.

- Headspace법은 밀폐된 용기내의 액체상 (液體相) 또는 고체상 (固體相)과 기체상 (氣體相)이 차지하는 공간의 비율이 일정할 때 동일한 조건하에서 액체상 및 고체상 중 화합물의 존재 비율은 기체상 존재 비율 (증기압)과 비례하는 원리에 기초한다. 주로 휘발성 화합물을 대상으로 기체상인 headspace를 분석함으로써 검체인 액체 및 고체 중 화합물의 농도/양을 간접적으로 분석하는 방법이다. 휘발성 성분 중에서도 액체 및 고체에 대한 용해도가 낮은 화합물이 headspace 중 존재 비율이 높으므로 분석이 용이하다.

- Headspace법에서 최대한의 재현성을 확보하기 위해서는 밀폐용기 내 액체상 (液體相) 또는 고체상 (固體相)과 기체상 (氣體相)이 차지하는 공간의 비율이 일정하게 유지하고 온도 등 환경조건을 동일하게 조절하는 것이 중요하다. 따라서 검체별로 동일한 용기, 검체량 및 시약량을 사용함과 동시에 반응 및 온도조건도 동일하게 유지하면서 분석하여야 한다.

- 살포성분인 AlP로부터 phosphine의 발생은 수분조건에서도 충분히 빠른 속도로 이루어지나 산을 가할 경우 가속화되며 정량적으로 완결된다. Phosphine은 반응액 (시료 혼합물)인 물에 대한 용해도가 높지 않아 headspace 중 존재 비율이 높으므로 충분한 감도로 정성이 가능하다.

- Headspace 중 기체 시료의 채취는 gas-tight syringe를 사용하는데 직접 시료를 채취할 경우 plunger 이동에 따른 용기 내 감압 현상에 의하여 시료 채취가 원활하지 않다. 따라서 이러한 손실을 방지하기 위하여 syringe에 미리 채취하고자 하는 시료량에 해당하는 공기를 채우고 격막을 통과시킨 후 주입, 용기 내 압력을 높이고 수차례의 pumping을 수행하여 시료 가스로 교환, 채취한다.

- GC에서 사용하는 column의 고정상은 가스나 휘발성 화합물을 대상으로 하는 porous polymer 재질의 고체이므로 분리 원리는 GSC (gas-solid chromatography)에 해당한다. 주입량은 50 μL로 많은 것처럼 보이나 기체 시료이므로 일상적 액체 시료의 주입구 중 기화에 의한 기체 시료량 보다 많은 량은 아니다. 주입모드는 시료가 기체이므로 주입 시료의 재응축을 요구하는 splitless mode는 사용할 수 없고 split mode로 가동한다.

- Phosphine은 앞서 기술한 바와 같이 환원력이 강한 반응성 화합물이므로 분석 중 다른 물질/재질과 반응, 손실의 가능성이 높다. 따라서 시료 조제 및 분석은 최대한 신속하게 수행하여야 분석의 오류를 피할 수 있으며 이는 무처리 시료에 소량의 AlP를 첨가, 간이 회수율 시험을 수행함으로써 확인할 수 있다.

- 정량시험법 중 phosphine 발생은 headspace법과 그 원리가 동일하다. 단, 발생한 phosphine 가스를 질소로 sweeping하여 포화브롬수에 포집한다. 검체 중 phosphine 발생은 황산용액이 아닌 증류수만으로도 가능하므로 시료 중 간섭물질이 관찰될 경우 대체 사용이 가능하다. 포집된 phosphine은 bromine과 반응, PBr_3 (phosphorus tribromide)를 형성하나 이 화합물은 수용액 중 매우 취약하여 다시 가수분해, 최종적으로 인산(H_3PO_4)으로 존재하게 된다. 검체 중 함유되어 있는 인산 또는 유사화합물들은 기체화되지 않으므로 시료로부터 방출된 phosphine 기체에 의하여 형성된 인산과는 구별되어 간섭이 발생되지 않는다.

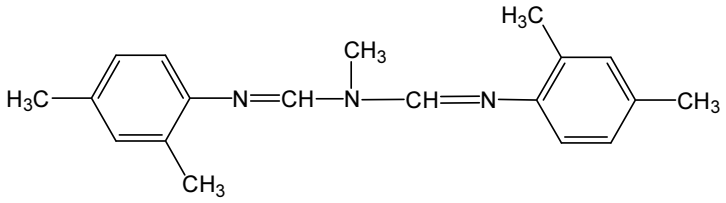
- 정량법은 총 인산정량법에 기초하나 감도를 최대로 높이기 위하여 환원반응을 시켜 heteropolymeric 형태인 소위 “molybdenum blue”로 발색시킨다. 즉, 일상적 인산정량은 황색의 molybdophosphoric acid를 형성하여 380～420 nm에서 정량하는 것이 보통이나 이 발색법은 감도가 낮아 고감도를 요구하는 잔류분석에 적합하지 않다. 따라서 hydrazine sulfate를 환원제로 사용, molybdophosphoric acid를 polymeric 형태로 환원시키면 청색의 강한 발색단을 나타내는 molybdenum blue를 형성하므로 660～830 nm 범위에서 고감도 분석이 가능하다. 그러나 molybdophosphoric acid에 비하여 발색단의 안정성이 떨어지므로 발색 후 일정한 시간 내에 신속하게 측정하는 것이 요구된다.

- 정량법에서 실제 측정하는 성분은 phosphoric acid이므로 표준품은 고체로서 칭량 등 조작이 용이하고 고순도품을 손쉽게 입수할 수 있는 potassium dihydrogen phosphate를 사용하되 총 인을 기준으로 표준용액을 조제한다. 분광광도법에 의하여 측정된 성분은 총 인을 기준으로 하였으므로 잔류량을 phosphine 기준으로 환산하기 위해서는 환산계수 phosphine 분자량 (34.0) / 인 원자량 (31.0) = 1.1을 곱하여 표시한다.

8.4.3 잔류농약 분석법 4.1.4.3

아미트라즈(Amitraz)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : amitraz
화학명 (IUPAC) : *N*-methylbis(2,4-xylyliminomethyl)amine
분자식 : $C_{19}H_{23}N_3$
평균분자량 : 293.4
질량분석 시의 M+질량 : 293.2
Log P_{ow} : 5.5 (pH 5.8, 25℃)
물에 대한 용해도 : 〈0.1 mg/L (20℃)
증기압 : 0.34 mPa (25℃)
pKa : 4.2, 약염기

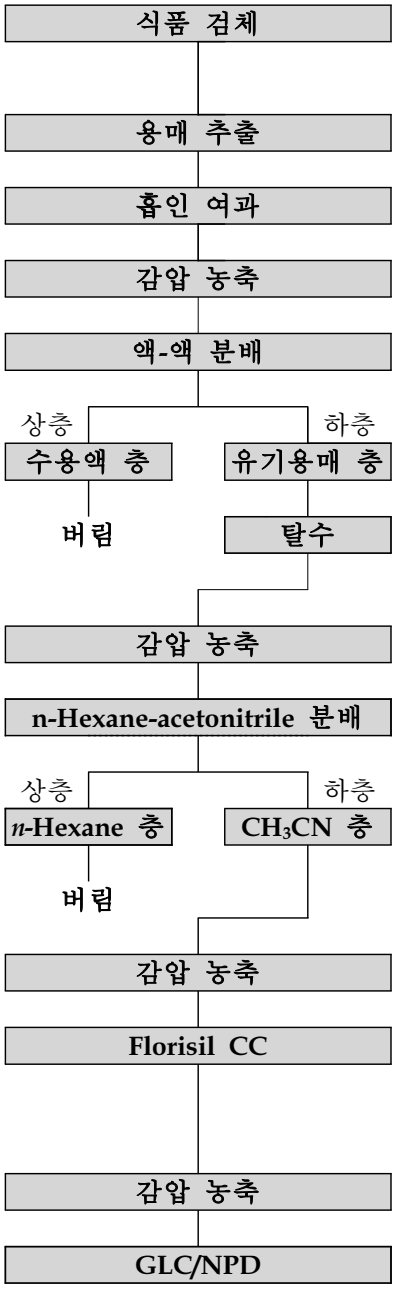
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Amitraz	0.01	-	0.2~2.0	0.5~1.0	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물 검체를 약알칼리성이 되도록 산도를 조절한 후 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 분배액을 감압 농축하고 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 추가로 제거한다. Acetonitrile 분배액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 최종 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 함수 또는 습윤 균질화한 검체 100g
- 5N NaOH를 가하여 pH 10으로 조절
- Acetone 150 + 100mL로 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제 사용
- 40℃에서 약 50mL로 농축
- 5% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃ 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 3회 분배 추출
- 40℃ 농축 건고
- Acetone/*n*-hexane (2/98) 5mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh) 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- Acetone/*n*-hexane (2/98) 50mL로 습식 충전 → 버림
- 검체용액 5mL + acetone/*n*-hexane (2/98) 45mL → 받음
- 40℃ 농축 건고
- Acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-1 또는 100% methylsilicone capillary column
(0.53 mm i.d. × 15 m, 1.5 μm)
칼럼온도 : 210℃
주입부 온도 : 220℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : helium을 적절하게 조절한다.
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Amitraz는 주로 과수 및 채소류에 발생하는 응애류를 방제하기 위해 사용되는 비침투성 살응애제이다.

- Amitraz는 log P_{ow}가 5.5인 비극성 화합물임에도 불구하고 분자 내 amino기의 일부 해리성으로 인하여 약염기성을 나타낸다. 분석은 증기압이 0.34 mPa로 비교적 높고 비극성 화합물임을 감안하여 GLC로 수행가능하며 검출기로는 분자 내에 3개의 질소 원자가 존재하므로 질소・인 검출기를 사용한다.

- 검체 추출에는 비극성 화합물의 추출에서 일반적으로 사용하는 acetone을 사용한다. 짝산의 pKa가 4.2로 알려진 약염기성 화합물이므로 이온억압에 의한 추출 효율의 증대를 위하여 pH를 10으로 조절한다. 그러나 강알칼리 조건에서는 가수분해의 가능성이 있으므로 NaOH 수용액을 첨가할 경우에는 교반하면서 천천히 점적하여 부분적으로 강알칼리성이 되는 것을 방지한다.

- 액-액 분배과정은 비극성 농약의 잔류분석 시 추출액의 조(粗)정제를 위하여 가장 보편적으로 사용하는 방법이다. 추출액 중 acetone을 날려 보내어 분배 대상 액의 부피를 줄임과 동시에 NaCl 수용액을 과량 첨가, salting out 효과에 의한 높은 분배 효율을 확보하는 과정으로 구성되어 있다. 또한 유지 및 비극성 간섭물질을 추가로 제거하기 위

하여 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 적용하는데 amitraz는 극성이 매우 낮아 acetonitrile 층으로의 분배 효율이 다소 불량하므로 3회 분배가 요구된다.

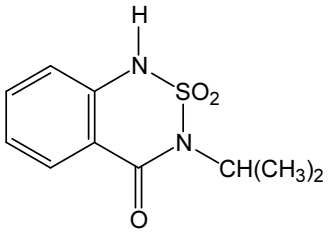
- 액-액 분배에 의하여 대부분의 간섭물질이 제거되므로 NPD의 높은 선택성을 감안할 때, Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정은 세척용 용출용매를 생략하고 하나의 용매로 용출시키는 단순한 과정으로도 깨끗한 최종 용액을 얻을 수 있다. 또한 amitraz는 비극성으로 Florisil column 상에서 낮은 용출강도의 용매로도 충분히 용출이 가능하며 이때 색소 등 대부분의 간섭물질들은 용출되지 않는다.

- Amitraz는 분자 내 imine기와 amino기의 취약성으로 GLC 분석 중 열분해의 가능성이 있으므로 가급적 주입부 온도를 낮추고 분석용 column에서도 빠르게 용출시키는 것이 분석의 재현성 확보측면에서 중요하다.

8.4.4 잔류농약 분석법 4.1.4.4

벤타존(Bentazone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : bentazone
화학명 (IUPAC) : 3-isopropyl-1*H*-2,1,3-benzothiadiazin-4(3*H*)-one 2,2-dioxide
분자식 : $C_{10}H_{12}N_2O_3S$
평균분자량 : 240.3
질량분석 시의 M+질량 : 240.1
Log P_{ow} : 0.77 (pH 5), -0.46 (pH 7), -0.55 (pH 9)
물에 대한 용해도 : 570 mg/L (pH 7, 20℃)
증기압 : 5.4×10^{-3} mPa (20℃)
pKa : 3.3 (24℃)

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

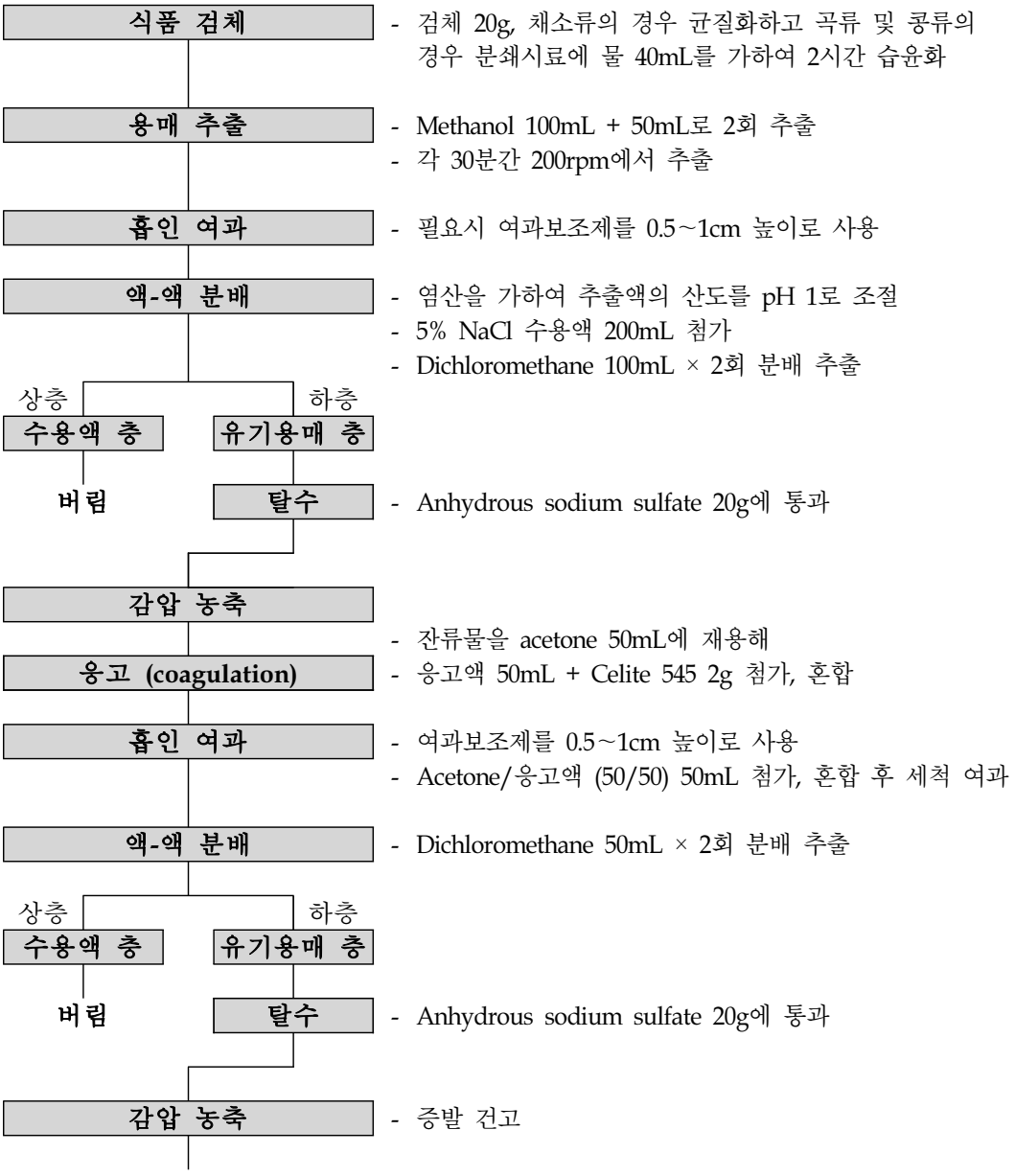
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bentazone	0.1	0.05~0.2	-	0.1~0.2	0.05~0.2	0.05	-

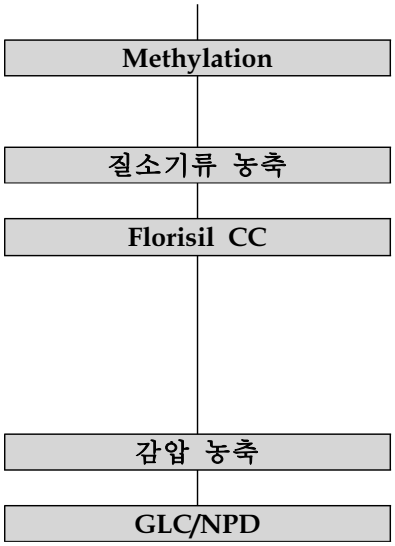
2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물의 균질 검체에 methanol을 가하고 진탕 추출한다. 추출물을 흡인 여과한 후 산성화하고 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압농축하고 acetone과 coagulating 용액을 첨가하여 Celite bed상에서 응고법으로 정제한 후 재차 dichloromethane으로 분배 추출한다.

추출액을 감압 농축하고 diazomethane으로 methylation한 후 최종적으로 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





응고액 : NH_4Cl 2g 및 phosphoric acid 4mL를 물에 녹여 400mL로 함.

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : 14% cyanopropylphenyl-methylsilicone capillary column (DB, HP, SPB-1701 등), 0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm
칼럼온도 : 50℃에서 1분간 유지, 25℃/min의 비율로 200℃까지 온도를 상승시킨 후 1℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 240℃에서 5분간 유지한다.
주입부 온도 : 230℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium을 사용하되 methyl-bentazone이 약 16~17분에 유출되도록 유량을 적절하게 조절한다.
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Bentazone은 잡초 발생 후에 사용되는 선택성 제초제로서 주로 곡류 및 콩류작물 재

배 시에 발생하는 광엽 잡초를 방제하기 위하여 살포되는 약제이다. 식물체의 광합성 작용 중 명반응을 저해하여 살초하며 접촉형이나 토양 중에서 근부로 이행하는 특성도 나타낸다.

- Bentazone은 분자 구조 내에 sulfonyl기의 전자끌기 (electron withdrawing) 특성으로 인하여 인접한 질소 원자에 결합되어있는 수소가 이탈되는 약산성의 화합물이며 pH 5~9 범위에서 log P_{ow} 값이 -0.55~0.77을 나타내는 극성 화합물이다. 따라서 낮은 증기압, 해리특성 및 높은 극성으로 인하여 모화합물을 직접 GLC로 분석하기에는 적당하지 않다.

- 분석법은 모화합물 중 해리하는 질소 원자를 methylation하여 비해리성의 중성 화합물로 유도체를 형성하는 과정이 포함되어 있다. 즉 *N*-methylated bentazone은 GLC 분석에 적합한 화합물 특성을 나타내며 검출은 분자 내에 2개의 질소 원자를 포함하고 있는 점에 착안하여 질소・인 검출기를 사용한다.

- 추출 및 분배, 그리고 응고 정제과정까지는 약산성의 모화합물 형태인데 먼저 추출은 호합물의 극성이 높으므로 수용성 유기용매 중 극성이 높은 methanol을 사용한다. Acetone도 추출용매로 가능하나 이때에는 이온억압을 위하여 시료를 산성화하는 과정이 선행되어야 하며 비극성 간섭물질의 혼입 가능성도 높다.

- 분배는 추출액을 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 추출하는데 bentazone의 해리성을 억압하기 위하여 산성화하는 것이 필수적이다. Bentazone의 pKa는 3.3이므로 pH 1로 산성화하면 99%이상 이온화가 억압, 유기용매에 대한 가용성이 증대되므로 NaCl 수용액에 의한 salting-out 효과와 함께 dichloromethane으로의 높은 분배 효율이 보장된다.

- 추가적 조(粗)정제법으로 응고법을 사용하는데 상당량의 유지 및 색소 성분이 제거되며 응고액의 산도가 산성이므로 dichloromethane 재분배에 의한 분석성분의 회수에는 아무런 문제가 없다.

- Methylation 시약으로는 diazomethane (CH_2N_2)을 사용한다. Diazomethane은 황색의 가스로서 폭발의 위험성이 있으므로 취급에 주의하여야 한다. 보통 ether에 녹여 사용하는데 가스 상태로 직접 입수하는 것은 매우 위험하므로, 필요시 마다 취급이 안전한 황색 고체의 전구체 (precursor)로서 *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluenesulfonamide (Diazald™)를 alkali로 가수분해하여 얻는다. Diazomethane은 유리 기구의 미세한 틈 등에서 고농

도로 농축이 될 경우 폭발할 수 있다. 따라서 사용하는 유리 기구는 사전에 스크래치 등을 면밀히 확인한 후 사용하여야 한다.

- Methylation 반응은 매우 정량적으로 신속하게 일어나며 diazomethane이 가스이므로 미반응 시약을 제거하기가 매우 용이한 장점이 있다. 반응 시 bentazone 뿐만 아니라 시료 중 추출물 중 다른 성분과도 반응이 일어 날 수 있으므로 충분한 과량을 사용하는데 이는 diazomethane의 황색 색깔이 계속 유지되는 양으로 손쉽게 결정할 수 있다. Bentazone의 methylation 반응식은 다음과 같다. 반응이 완결되면 반응하지 않은 diazomethane을 질소 기류로 날려 보내는데 인체에 대한 독성이 강하므로 fume hood 안에서 수행하도록 한다.

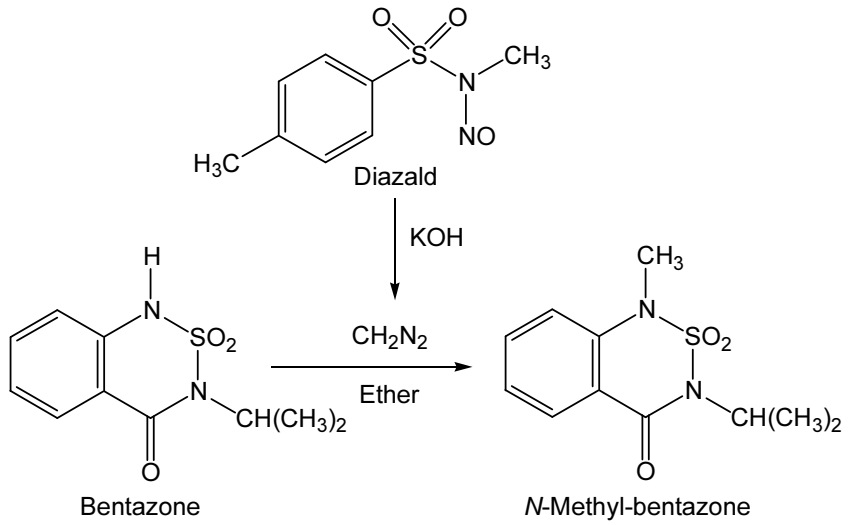


그림 1. Bentazone의 methylation 및 diazomethane 발생 반응

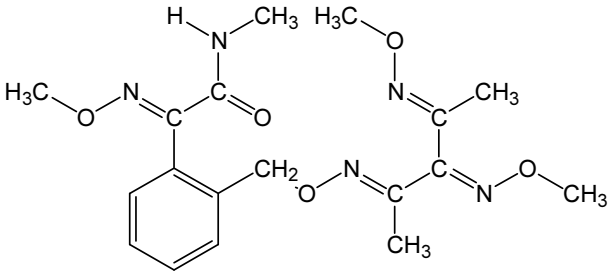
- 반응 후 건고물은 ethyl ether/*n*-hexane (15/85)에 재용해하여 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제한다. 추출액의 정제 과정이 비교적 우수하고 *N*-methyl-bentazone은 극성이 낮아 색소 등 간섭물질보다 빠르게 용출되므로 단일 용출용매 체계로도 깨끗한 최종 용액을 얻을 수 있다.

- GLC 분석용 column으로는 14% cyanopropylphenyl-methylsilicone capillary column을 사용하는데, 고온에서 일부 미반응 phase가 bleeding될 경우 cyano기 (-CN)에 의하여 NPD에 악영향이 미칠 수 있으므로 사용 전에 검출기에 연결하지 않은 상태에서 충분히 conditioning 하여야 한다.

8.4.5 잔류농약 분석법 4.1.4.5

오리사스트로빈(Orysastrobin)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : orysastrobin
화학명 (IUPAC) : 2-[(*E*)-methoxyimino]-2-[(3*E*,6*E*)-2-{5-[(*E*)-methoxyimino)-4,6-dimethyl-2,8-dioxa-3,7-diazanona-3,6-dienyl}phenyl]-*N*-methylacetamide
분자식 : $C_{18}H_{25}N_5O_5$
평균분자량 : 391.4
질량분석 시의 M+질량 : 391.2
Log P_{ow} : 2.36 (20℃)
물에 대한 용해도 : 80.6 mg/L (20℃)
증기압 : 2×10^{-6} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

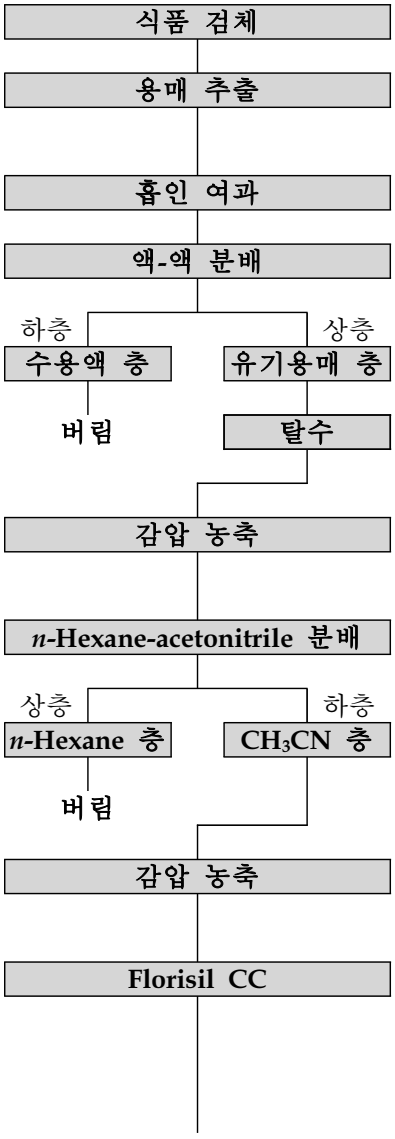
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Orysastrobin	0.052	0.3	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 곡류 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에

옮겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후 dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 (20/80, v/v)으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지성분을 제거한 후 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 곡류검체 25g에 증류수 20mL을 가하여 10분간 습윤화
- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 (20/80) 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 dichloromethane 10mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 10g
- Dichloromethane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (3/97) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (10/90) 100mL → 받음

감압 농축
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (50/50) 10 mL에 재용해

HPLC/UVD

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 247 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
orysastrobin (10.7분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)

이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 80 V
Capillary temp. : 330℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Orysastrobin	6.0	391	392

6) 분석법 해설

- Orysastrobin은 미생물 *Strobilurus tenacellus*로부터 추출된 천연항균물질 strobilurin의 유도체이다. 이 약제는 미생물의 호흡과정 중 전자전달계 저해제로서 새로운 살균기작을 나타내고 있으므로 기존 살균제에 저항성인 병원균에 탁월한 약효를 나타내는 장점이 있으며 주로 수도용 살균제로 사용되고 있다. Orysastrobin은 모화합물이 유효성분이고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 전적으로 모화합물 잔류량으로 정의된다. 대상성분들의 잔류허용기준은 0.1 mg/kg으로 상당히 낮으므로 허용기준의 1/2인 0.05 mg/kg 이하의 정량한계를 만족하는 고감도 분석법이 요구된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 2.36인 중간 극성의 중성 화합물이며 증기압은 2×10^{-6} mPa 이므로 비휘발성이다. 대상 화합물은 휘발성이 낮고 분자구조 내에 -NH기 및 imino (치환 oxime)기를 함유하고 있으므로 흡착 및 열분해 가능성으로 인하여 GLC로 분석하기는 어렵다. 따라서 HPLC법을 이용하여 분석한다. Orysastrobin은 그림 2에 나타낸 바와 같이 자외영역에서 비교적 장파장인 최대흡광파장 247 nm를 흡광계수 2.39×10^{4} $cm^{-1}M^{-1}$로 강하게 흡수하며 100% acetonitrile과 acetonitrile/water (50/50, v/v) 용매조건에서 spectrum상의 wavelength shift가 전혀 관찰되지 않아 acetonitrile/water 혼합액 중에서 해리현상이 없으므로 일반적 reversed phase HPLC를 이용하여 고감도 분석이 가능하다.

- 추출 용매로는 비극성 농약의 잔류분석법에서 저지방 검체에 대하여 표준적 용매로

널리 사용되고 있는 acetone을 사용한다. 분석 대상이 건조 검체인 곡류이므로 수용성 유기용매 추출법에서 우수한 추출 효율을 얻기 위해서는 acetone 추출 전에 미리 증류수를 가하여 10분간 방치, 습윤화 과정을 수행하는 것이 필수적이다.

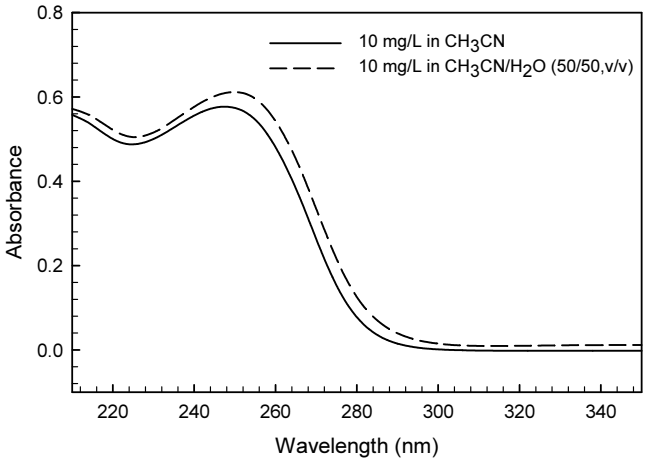


그림 2. Orysastrobin의 자외 흡광스펙트럼.

- 추출액의 조정제 (組精製)를 위한 액-액 분배는 대상성분이 중간 극성의 중성 성분임을 감안하여 수용성 유기용매 추출액을 포화식염수/증류수로 희석한 후 직접 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액으로 1회 분배 추출하는 방법을 이용하며 추출효율은 95% 이상이다.

- Dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 분배과정에 의하여 검체 중 수용성 극성 방해물질은 대부분 제거되나 유지를 비롯한 유용성 비극성 간섭물질은 제거되지 않으므로 현미 등 곡류에 수% 존재하는 유지 성분을 제거하기 위하여 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가 적용한다. Orysastrobin은 *n*-hexane으로 포화시킨 acetonitrile로 2회 분배하였을 경우 전량 분배 추출되며 현미 중 유지 제거율은 최소 50% 이상이다.

- 분배 추출액은 최종적으로 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. 세정과 orysastrobin 용출 분획으로 구성된 ethyl acetate/*n*-hexane 혼합 용매체계는 효과적으로 불순물을 제거하므로 HPLC 분석을 위한 최종용액은 거의 색소 등이 함유되지 않은 깨끗한 정제액을 얻을 수 있다.

- HPLC 분석에서 무처리 곡류 추출액 중 대상 분석성분 부근에 불순물에 의한 간섭은 관찰되지 않으며 분석법의 정량한계는 0.02 mg/kg 수준이다. 현미에 대하여 정량한

계, 정량한계의 10배 및 100배의 3수준에서 수행한 회수율 시험결과, 회수율은 86~101% 범위이며 분석오차는 5% 이하이다. 기기분석을 위한 최종용액은 그 정제정도가 우수하여 연속 주입, 분석이 가능하다.

- 잔류분 재확인을 위한 LC/MS에서 orysastrobin은 중간 극성이며 분자 내에 lone pair를 갖고 있는 nitrogen을 다수 보유하고 있어 protonation에 따른 positive 이온 생성이 용이, 이온화법으로는 ESI, positive-ion mode가 최선이다. 최적화한 이온화 조건에서 $(M+H)^+$ 이온은 충분한 intensity로 관찰되며 그 외 fragment ion들은 거의 관찰되지 않는다. ESI(+) SIM에 의한 잔류분의 재확인은 정량한계의 1/10 수준까지 가능하다.

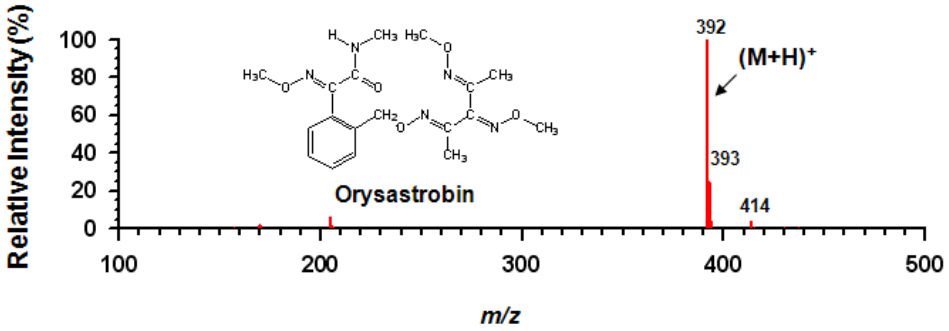
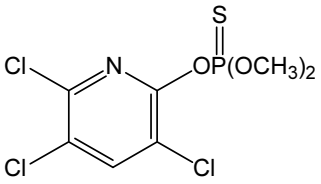


그림 3. Orysastrobin의 ESI(+) mass spectrum.

8.4.6 잔류농약 분석법 4.1.4.8

클로르피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : chlorpyrifos-methyl
화학명 (IUPAC) : *O,O*-dimethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
분자식 : $C_7H_7Cl_3NO_3PS$
평균분자량 : 322.5
질량분석 시의 M+질량 : 320.9
Log P_{ow} : 4.24
물에 대한 용해도 : 2.6 mg/L (20℃)
증기압 : 3.0 mPa (25℃)
pKa : 비해리성

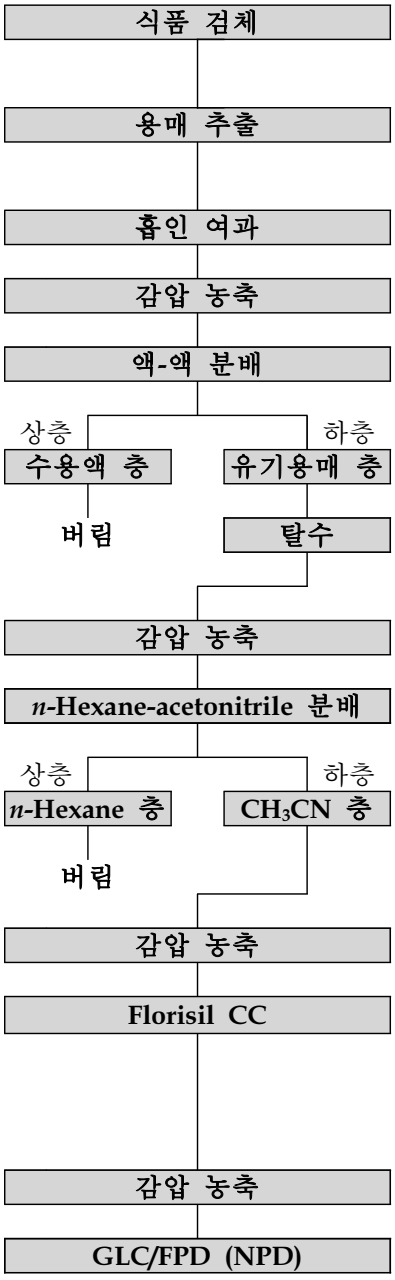
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
	곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
0.01	0.1	1.0	0.2	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 곡류 및 콩류 등 유지 검체의 경우는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 및 비극성 불순물을 추가로 제거한다. 분배액을 감압농축하고 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/FPD (NPD)로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 50g, 곡류 및 콩류의 경우 물 50mL를 가하여 2시간 습윤화
- Acetone 150mL + 100mL로 2회 추출
- 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 50mL로 농축
- 5% NaCl 수용액 100mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 3회 분배추출
- 건고 후 *n*-hexane 5mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 30cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함
- *n*-Hexane 100mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (10/90) 100mL → 받음
- 건고 후 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD)
질소·인검출기 (NPD)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP (80~100 mesh) 또는 이와 동등한 것
고정상액체 : 5% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
칼럼온도 : 200~220℃
주입부 온도 : 230~250℃
검출기 온도 : 230~250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen (chlorpyrifos-methyl이 약 4분에 유출하는 유속)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 chlorpyrifos-methyl은 전형적인 유기인계 살충제로서 물에 대한 용해도가 낮고 log P_{ow} 값이 4.2인 비극성 화합물이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매인 acetone을 사용한다. 액-액 분배는 대상성분이 비극성인 점을 감안하여 추출액을 농축하고 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가한 후 비극성 용매인 dichloromethane으로 분배 추출한다.

- 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 정제 효과가 뚜렷하다.

- 대상 화합물의 분자구조 내에 인을 함유하고 있으므로 GC 검출기 중 FPD (P)와 NPD, 그리고 chlorine 원자 3개를 함유하고 있어 ECD 모두가 사용가능하나 선택성

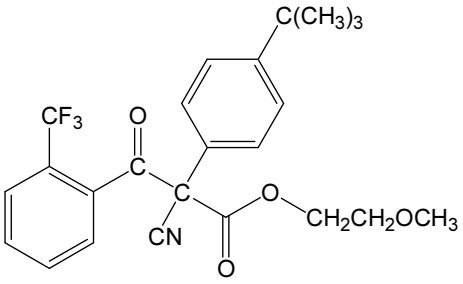
및 재현성이 보다 우수한 FPD (P)를 채용하는 것이 가장 유리하다.

- Chlorpyrifos-methyl 잔류분의 재확인을 위한 GC-MS에서 분자이온의 상대 강도가 높지 않으므로 SIM을 위한 fragment (m/z)는 높은 강도이면서 분자구조를 반영할 수 있는 156, 183으로 설정한다.

8.4.7 잔류농약 분석법 4.1.4.11

사이플루메토펜(Cyflumetofen)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : cyflumetofen

화학명 (IUPAC) : 2-methoxyethyl (*RS*)-2-(4-*tert*-butylphenyl)-2-cyano-3-oxo-3-(α, α, α-trifluoro-*o*-tolyl)propionate

분자식 : $C_{24}H_{24}F_3NO_4$

평균분자량 : 447.5

질량분석 시의 M+질량 : 447.2

Log P_{ow} : 4.3

물에 대한 용해도 : 0.0281 mg/L (pH 7, 20℃)

증기압 : $<5.9\times10^{-3}$ mPa (25℃)

pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

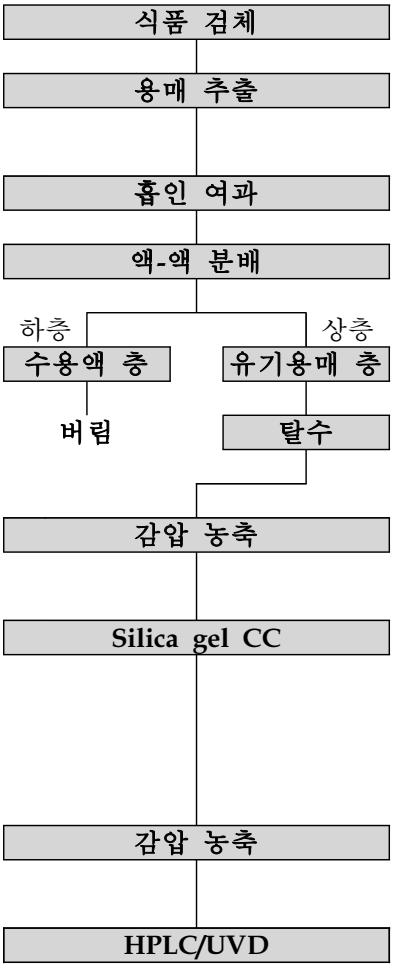
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cyflumetofen	0.092	-	0.3~1.0	1.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮

겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 과실 및 채소 검체 25g
- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Silica gel 60 (70~230mesh), 10g
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (50/50) 100mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (70/30) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)

분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 230 nm
주입량 : 40 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

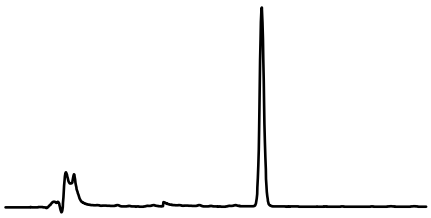


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
cyflumetofen (10.9분) 40 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : APCI, positive-ion mode
Cone voltage : 98 V
Capillary temp. : 275℃
분자량 범위 (*m/z*) : 200~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 APCI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Cyflumetofen	10.9	447	448

6) 분석법 해설

- Cyflumetofen은 과수 및 채소류 재배 시에 발생하는 응애류를 방제하기 위하여 사용되는 비침투성의 살응애제이다. 사용 형태는 SC (액상수화제)와 같은 농축제형을 일정배수로 용수에 희석, 전면 살포된다. 살응애제의 특성상 지효성이 있고 과실 및 채소류의 소비 형태가 주로 생식인 인 점을 감안할 때 수확물 중 잔류 수준의 평가가 중요시 되는 농약이다.

- Cyflumetofen은 log P_{ow} 4.3인 비극성의 비해리성 화합물이므로 유사한 특성의 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용하여 비교적 용이하게 분석할 수 있다. 즉, 검체 조제 과정은 acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 *n*-hexane 분배에 의한 조정제 (**組精製**) 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다. 검체 추출 용매는 대상성분의 비극성 정도가 크므로 acetonitrile 보다는 acetone을 사용한다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 hexane으로 분배하는 간편한 과정으로 수행하며 1회 분배로 95% 이상이 회수된다. Silica gel 흡착크로마토그래피에서는 색소 등 검체 중 간섭물질에 의한 overloading을 최소화하기 위하여 충분한 양의 흡착제 (10 g)를 사용한다.

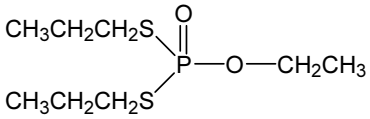
- 기기분석은 자외흡광검출기가 부착된 HPLC를 이용하는데 검출파장이 230 nm로 다소 짧으므로 선택성이 저하, 검체 중 불순물에 의한 간섭이 우려되므로 충분한 머무름 시간이 되도록 조절한다. 크로마토그래피 특성의 항상성을 위하여 최종 검체용액은 이동상인 acetonitrile/water (70/30, v/v) 혼합액에 조제하는데 대상성분의 용해도를 감안하여 충분한 양을 사용, 재용해한다. 감도가 다소 낮으므로 잔류분석법 기준인 0.05 mg/kg의 정량한계를 확보하기 위하여 검체 주입량을 40 μL로 증가시킨다.

- 재확인법은 LC/MS로 수행하는데 대상 화합물이 비극성이고 분자 내에 lone pair를 갖고 있는 질소 및 산소원자를 함유하고 있어 protonation의 가능성이 높으므로 이온화법은 APCI, positive ion 방식을 이용한다.

8.4.8 잔류농약 분석법 4.1.4.13

에토프로포스(Ethoprophos)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : ethoprophos
화학명 (IUPAC) : O-ethyl *S*,*S*-dipropyl phosphorodithioate
분자식 : $C_8H_{19}O_2PS$
평균분자량 : 242.3
질량분석 시의 M+질량 : 242.1
Log P_{ow} : 3.59
물에 대한 용해도 : 700 mg/L (20℃)
증기압 : 46.5 mPa (26℃)
pKa : 비해리성

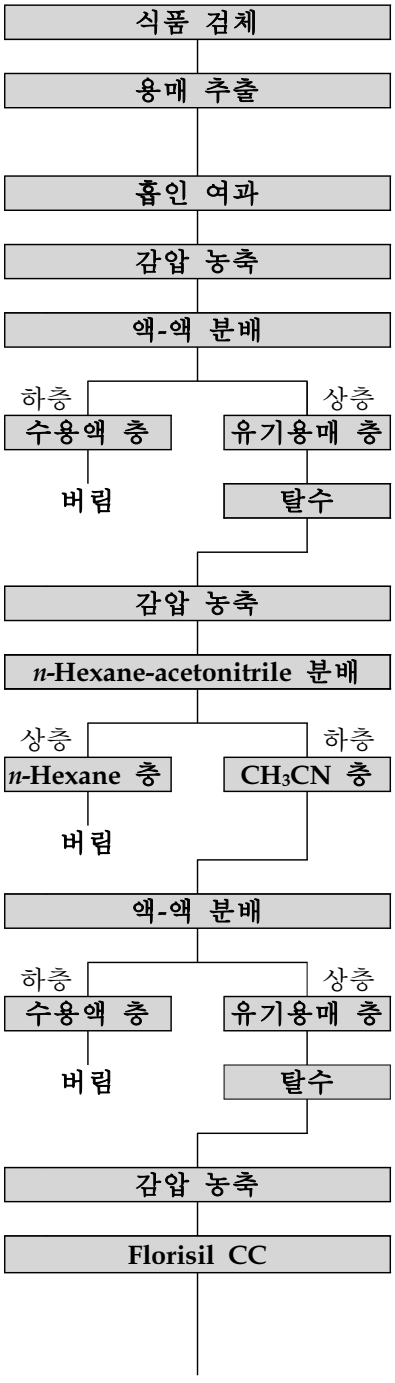
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Ethoprophos	0.0004	0.005~0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

2) 분석법 개요

검체에 acetone/물 혼합액 (70/30, v/v)을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인여과 하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 수용성 농축액에 NaCl 용액을 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 감압 농축하고 곡류 및 콩류 등 유지 검체의 경우는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 이용, 유지성분을 제거한다. 분배액을 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/FPD (NPD)로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- Acetone/물 (70/30) 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 acetone 증발
- 10% NaCl 수용액 50mL 첨가
- *n*-Hexane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 약 10mL로 농축
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 20mL × 2회 분배추출
- 5% NaCl 수용액 400mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 약 5mL로 농축
- Florisil 10g (내경 15mm)
- *n*-Hexane 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함
- Ethyl ether/*n*-hexane (15/85) 20mL → 받음

감압 농축 - 건고 후 잔류물을 acetone 2mL에 재용해

GLC/FPD (NPD)

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD)
질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : glass column (2~3 mm i.d. × 100~200 cm)
칼럼충전제 : 5% PEG 20 m, 2% DEGS + 0.5% H_3PO_4, 10% QF-1 및 4% OV-101
칼럼온도 : 140~210℃
주입부 온도 : 160~250℃
검출기 온도 : 160~250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 30~50 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 ethoprophos는 전형적인 유기인계 살선충/살충제로서 물에 대한 용해도가 낮고 log P_{ow} 값이 3.6인 비극성 화합물이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone 사용하여 대상농약을 추출한다. 건조 검체를 포함하여 습윤화와 추출을 동시에 수행하기 위하여 추출용매로는 acetone/물 혼합액 (70/30, v/v)을 사용한다. 함수 검체의 경우 검체 자체에 수분이 함유되어 있어 acetone의 함량이 상대적으로 낮아지나 추출효율에는 문제가 없다. 액-액 분배는 대상성분이 비극성인 점을 감안하여 추출액을 농축하고 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가한 후 비극성 용매인

n-hexane으로 분배 추출한다. 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 정제 효과가 뚜렷하다.

- *n*-Hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 유지나 왁스의 제거에 주로 이용되는 정제법으로 고유지 검체인 현미 및 콩류 검체에서는 그 적용이 필수적이다. 저유지 검체에서는 그 정제정도가 미미하므로 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정의 생략도 가능하다.

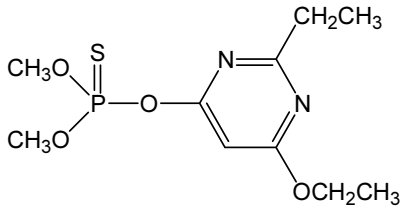
- Ethoprophos는 비교적 휘발성이 강하므로 감압 농축과정 중에 건고 후 너무 과다하게 농축을 계속하면 손실의 위험이 있다.

- 대상 화합물의 분자구조 내에 인을 함유하고 있으므로 GC 검출기 중 FPD (P)와 NPD가 모두 사용가능하나 선택성 및 재현성이 보다 우수한 FPD (P)를 채용하는 것이 유리하다.

8.4.9 잔류농약 분석법 4.1.4.16

에트림포스(Etrimfos)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : etrimfos
화학명 (IUPAC) : *O*-6-ethoxy-2-ethylpyrimidin-4-yl *O*,*O*-dimethyl phosphorothioate
분자식 : $C_{10}H_{17}N_2O_4PS$
평균분자량 : 292.3
질량분석 시의 M+질량 : 292.1
Log P_{ow} : 2.94
물에 대한 용해도 : 40 mg/L
증기압 : 8.6 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

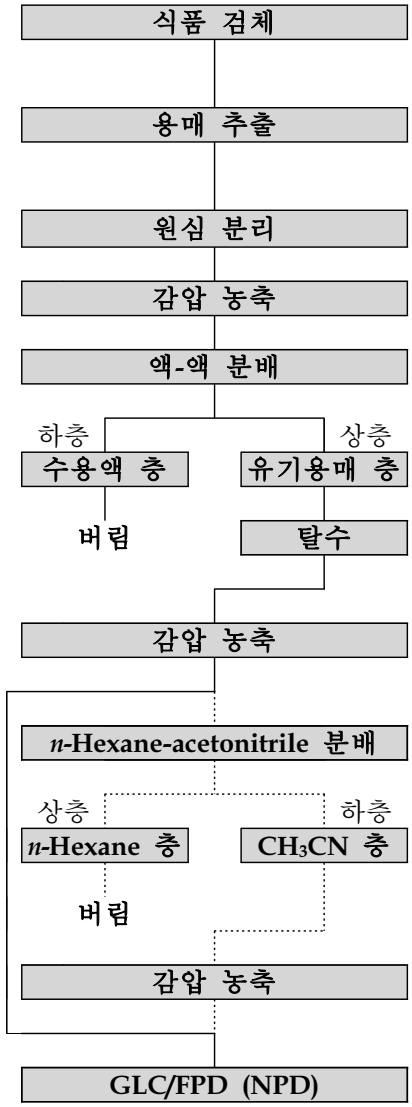
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Etrimfos	0.001	-	0.01	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한고 원심분리한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 NaCl 수용액을 가한 후 ethyl acetate로 분배 추출한다. 곡류 및 콩류 등 유지 검체의 경우는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 추가로 제거한다. 분배액을 감압농축하고 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- 곡류의 경우 10g에 물 20mL를 가하여 2시간 습윤화
- Acetone 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 2분간 고속 마쇄 추출
- 각 3000rpm, 5분간 분리한 후 상층액을 취함.
- 40℃에서 acetone 증발
- 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- Ethyl acetate 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- **곡류 등 유지 검체**
- 잔류물을 *n*-hexane 15mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 3회 분배추출
- 40℃에서 약 5mL로 농축
- 건고 후 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4-1) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 인용 간섭필터, 파장 526 nm
질소·인검출기 (NPD)

분리용 칼럼 : glass column (3 mm i.d. × 1.5~2.0 m)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP (80~100 mesh) 또는 이와 동등한 것
고정상액체 : 5% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
칼럼온도 : 180~210℃
주입부 온도 : 220~250℃
검출기 온도 : 220~250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen (etrimfos가 약 7분에서 유출하는 유속으로 조정)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg (곡류의 경우 0.05 mg/kg)

4-2) 기기분석법

다음에 표시한 조건 이외는 4-1) 기기분석법과 같다.
칼럼충전제
고정상액체 : 2% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg (곡류의 경우 0.05 mg/kg)

4-3) 기기분석법

분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 10~30 m, 1.5 μm)
칼럼온도 : 100~250℃
주입부 온도 : 200~250℃
검출기 온도 : 200~250℃
캐리어가스 및 유량 : helium (etrimfos가 약 10분에서 유출하는 유속으로 조정)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.01 mg/kg (곡류의 경우 0.02 mg/kg)

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 etrimfos는 전형적인 유기인계 살충제로서 물에 대한 용해도가 낮은 비극성 화합물이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone 사용하여 대상성분을 추출한다. 곡류 등 건조 검체의 경우 추출에 앞서 일정량의 물을 가하여 습윤화한다. 액-액 분배는 대상성분이 비극성인 점을 감안하여 추출액을 농축하고 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가한 후 중간 극성 용매인 ethyl acetate로 분배 추출한다.

- *n*-Hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 유지나 왁스의 제거에 주로 이용되는 정제법으로 고유지 검체인 현미 및 콩류 검체에서는 그 적용이 필수적이다. 저유지 검체인 과실 및 채소 등의 검체에서는 그 정제정도가 미미하므로 *n*-hexane/acetonitrile 분배 과정의 생략이 가능하다.

- 대상 화합물의 분자구조 내에 인을 함유하고 있으므로 GC 검출기 중 FPD (P)와 NPD가 모두 사용가능하나 선택성 및 재현성이 보다 우수한 FPD (P)를 채용하는 것이 유리하다.

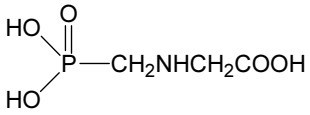
- 이 분석법은 FPD의 고선택성을 이용하여 최소한의 검체 정제과정을 거쳐 분석하도록 설계되어 있다. 따라서 많은 수의 검체를 분석할 경우 분석용 column의 분리 효율이 저하될 수 있다. 따라서 일정 수의 검체를 분석한 후에는 분리용 column의 guard column이나 column 전체를 교체한다.

- Etrimfos 잔류분의 재확인을 위한 GC-MS에서 분자이온의 상대 강도가 높지 않으므로 SIM을 위한 fragment (m/z)는 높은 강도이면서 분자구조를 반영할 수 있는 181, 292로 설정한다.

8.4.10 잔류농약 분석법 4.1.4.18

글리포세이트(Glyphosate)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : glyphosate
화학명 (IUPAC) : *N*-(phosphonomethyl)glycine
분자식 : $C_3H_8NO_5P$
평균분자량 : 169.1
질량분석 시 glyphosate (9-fluorenylmethyl)formate 유도체의 M+질량 : 391.1
Log P_{ow} : 〈-3.2 (pH 2~5)
물에 대한 용해도 : 10,500 mg/L (pH 1.9)
증기압 : 1.31×10^{-2} mPa (25℃)
pKa : pKa1 2.34, pKa2 5.73, pKa3 10.2

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

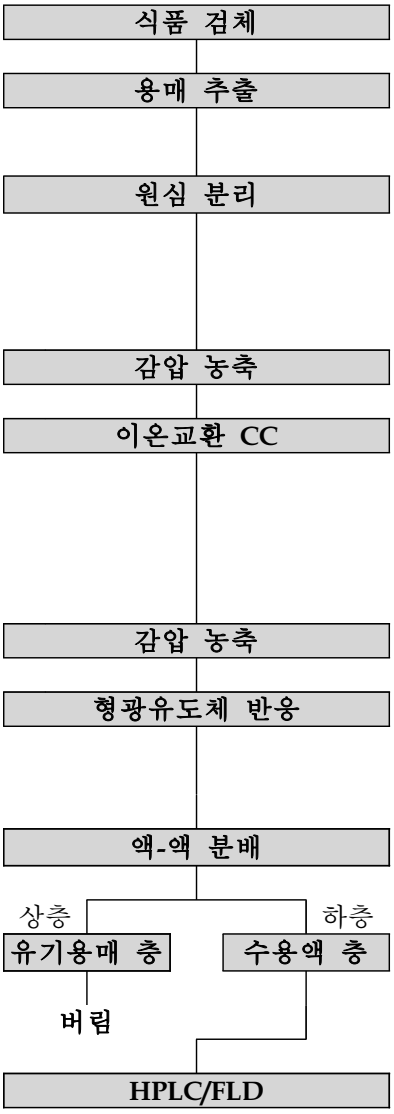
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Glyphosate*	1	-	0.2~0.5	-	-	0.2	-

*대사산물 AMPA (aminomethylphosphonic acid) 포함.

2) 분석법 개요

농산물 검체에 물과 chloroform을 가하고 고속 마쇄 추출한 후 원심분리한다. 수용성 상층액 중 일부를 취하여 감압 농축하고 강산성 cation-exchange chromatography로 정제한다. 용출액을 감압 농축하고 borate buffer하에서 (9-fluorenylmethyl) chloroformate (FMOCl)와 반응시켜 형광유도체를 생성한 후 HPLC/FLD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- 증류수 100mL + chloroform 50mL 첨가
- 분액여두에서 30분간 진탕 추출
- 3000rpm, 분리한 후 상층액을 취함
- 침전물에 증류수 50mL를 첨가, 혼합하고 재차 원심분리 한 후 앞서의 상층액과 합한 후 200mL로 조절
- 추출액 중 25mL (검체 2.5g 해당량)를 취함
- 50℃ 이하에서 건고 후 증류수 2mL에 재용해
- Strong cation exchange resin 12mL (내경 10mm, 30cm 칼럼)를 증류수에 현탁시켜 습식 충전
- 증류수 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체 추출액 2mL → 버림
- 증류수 8mL → 받음
- 50℃ 이하에서 농축 건고
- 0.05M sodium tetraborate 수용액 5mL 첨가
- Acetone에 녹인 0.1% (9-fluorenylmethyl) chloroformate 용액 5mL 첨가, 혼합하고 실온에서 20분간 반응
- Ethyl acetate 10mL로 분배 추출하여 버림
- 수용액 층을 직접 취하여 기기분석에 공시

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 형광검출기 (FLD)
분리용 칼럼 : stainless steel column (4.6 mm i.d. × 250 mm)

칼럼충전제 : Strong basic anion-exchange resin (입자크기 37~74 ㎛)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/0.1 M KH_2PO_4 (25/75, v/v)
이동상 유량 : glyphosate가 약 11~15분에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : 여기파장 254 nm, 형광파장 315 nm
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

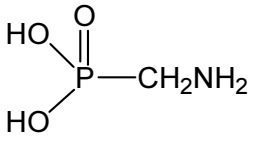
측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Glyphosate는 국내에서 많이 사용하는 비선택성 제초제로 작물체에 직접 살포하는 약제는 아니다. 그러나 glyphosate-tolerant GMO 작물에는 전면 살포가 가능하므로 수입 농산물 등에서의 잔류 가능성이 있다.

- 본 잔류분석법에서는 모화합물 만을 분석하나 glyphosate에는 추가 정량하여야 할 대사산물로 AMPA가 있으며 동일한 분석법으로 추가 정량이 가능하다. 이 경우 총 잔류량은 glyphosate를 기준으로 표시하며 대사산물인 AMPA의 경우 glyphosate와의 분자량 차이에 따른 보정계수 1.52를 곱하여 glyphosate 잔류량으로 환산, 합산한다.

보정계수 : glyphosate 분자량 / AMPA 분자량 = 169.1 / 111.0 = 1.52



AMPA (aminomethylphosphonic acid)

- Glyphosate는 물에 잘 녹는 화합물이므로 물로 검체를 추출하며 ion-exchange chromatography에 의하여 정제한다. Glyphosate에는 해리하는 작용기가 3개 존재하며 이들의 pKa 값은 모두 다르다. 따라서 pH 및 이온 강도를 조절하여 머무름 특성을 조절한다.

- Glyphosate는 자외흡광 특성이 없으므로 다음과 같은 반응에 의하여 형광유도체를 형성하여 형광검출기로 분석한다. 반응기작은 S_N 2 반응이며 borate buffer에 의한 약알칼리조건에서 반응시킨다. 생성된 형광유도체는 형광수율이 우수하여 감도가 높으나 인접한 불순물들이 다수 관찰되므로 검체 용액을 적절히 희석, 사용한다.

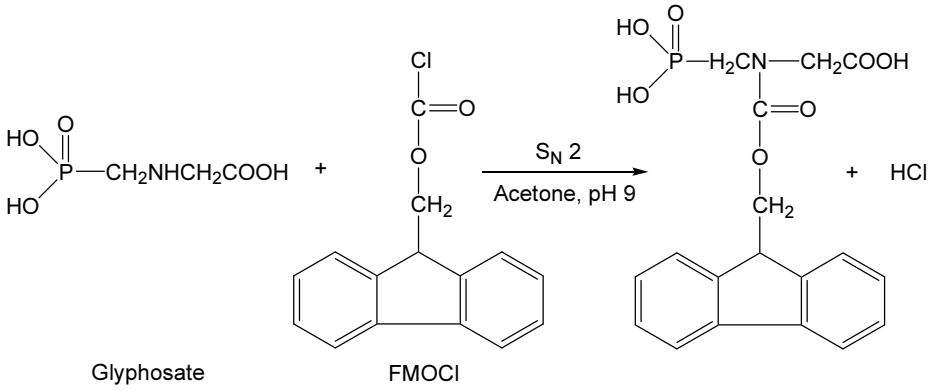
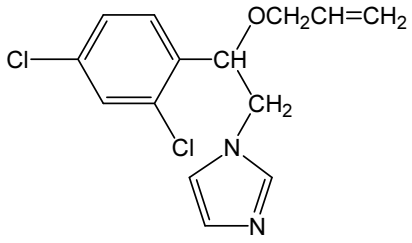


그림 1. Glyphosate의 형광유도체 형성반응

8.4.11 잔류농약 분석법 4.1.4.19

이마자릴(Imazalil)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : imazalil
화학명 (IUPAC) : (±)-1-(*β*-allyloxy-2,4-dichlorophenylethyl)imidazole
분자식 : $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$
평균분자량 : 297.2
질량분석 시의 M+질량 : 296.1
Log P_{ow} : 3.82
물에 대한 용해도 (mg/L) : 951 (pH 5), 224 (pH 7), 177 (pH 9)
증기압 : 0.158 mPa (20℃)
pKa : 6.53

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Imazalil	0.03	0.01~0.05	2.0~5.0	0.5~2.0	-	0.05	5.0

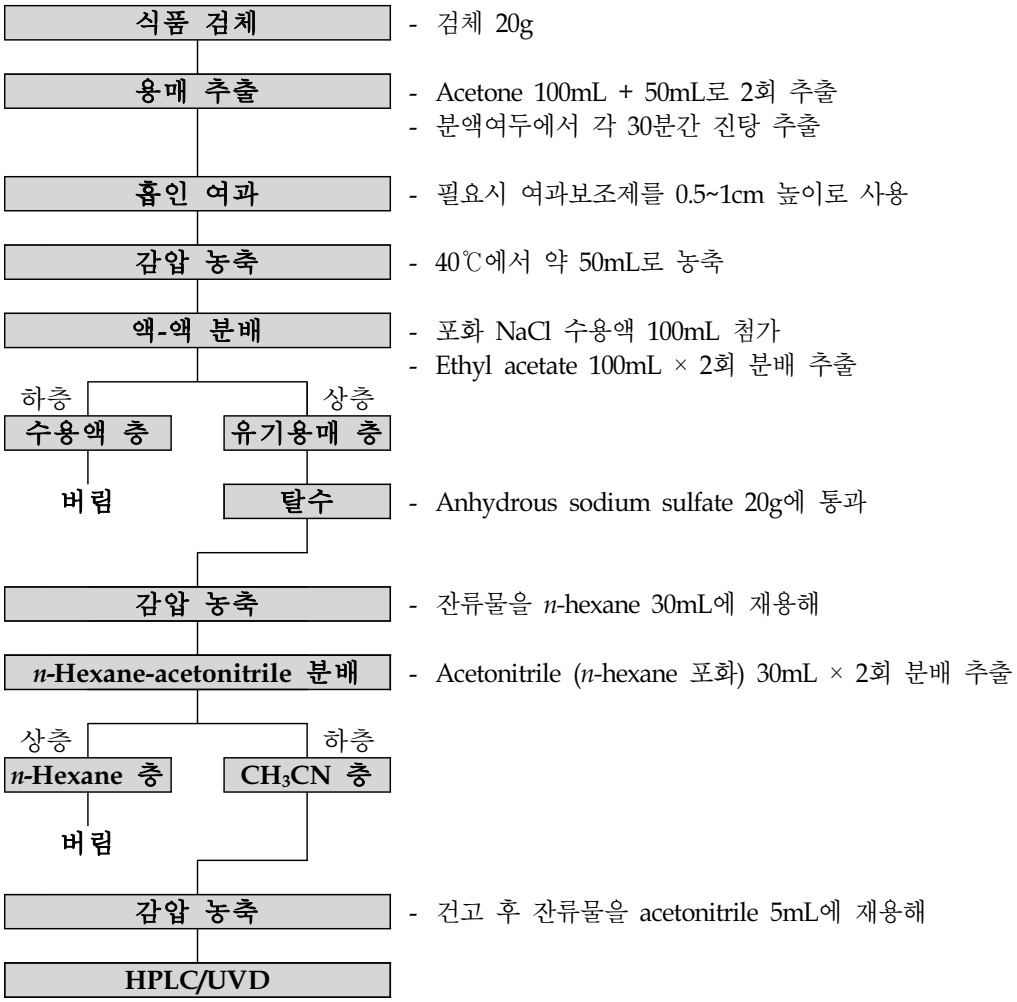
2) 분석법 개요

습윤화 또는 알칼리성으로 조절한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 곡류 등 유지 검체의 경우는 추출액을 흡인 여과하고 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가하고 ethyl acetate로 분배 추출한다. 유지 및 비극성 불순물을 *n*-hexane-

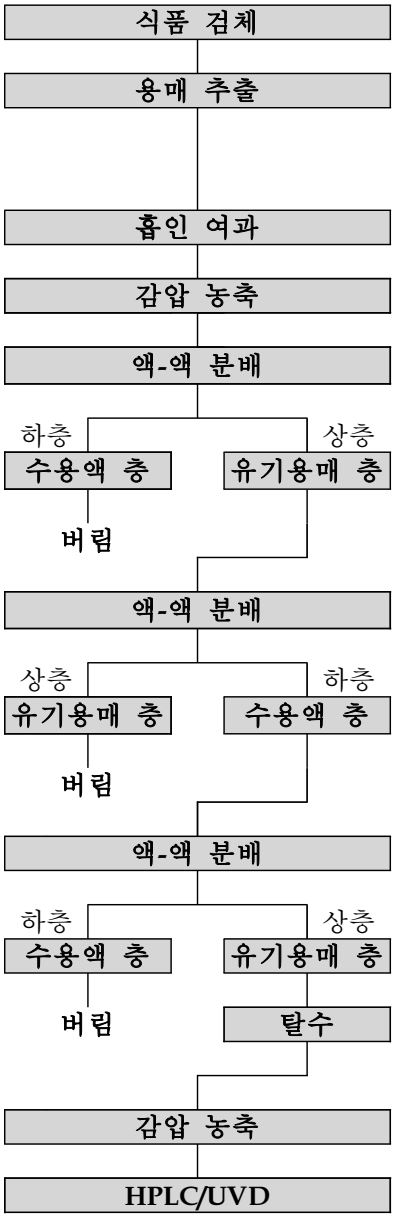
acetonitrile partition 과정에 의하여 제거한 후 HPLC/UVD로 분석한다. 과실 및 채소류의 경우 추출액을 분액여두에 옮기고 pH 조절에 의한 ion-associated partition법으로 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

① 곡류



② 채소류, 과실류 및 종실류



- 검체 20g
- 5N NaOH 수용액 5mL 첨가
- Acetone 100mL × 2회 추출
- 각 3분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 50mL로 농축
- 포화 NaCl 수용액 100mL 첨가
- 5N NaOH 수용액으로 pH 11~12로 조절
- Ethyl acetate 100mL × 2회 분배 추출
- 0.5N H_2SO_4 수용액 50mL × 2회 분배 추출.
- 5N NaOH 수용액 10mL 첨가하여 pH 11~12로 조절
- Ethyl acetate 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 잔류물을 acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/0.01 M KH_2PO_4 (70/30, v/v)
이동상 유량 : imazalil이 약 9.5분에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : UV 230 nm
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- 대상성분은 EBI (ergosterol biosynthesis inhibitor)계 살균제로 각종 채소 및 과실 재배에 널리 사용된다. 화합물은 imidazole ring의 존재로 인하여 약한 염기성을 나타내나 그 정도는 크지 않으며 log P_{ow} 값이 3.8인 중간~비극성 범위의 화합물이다.

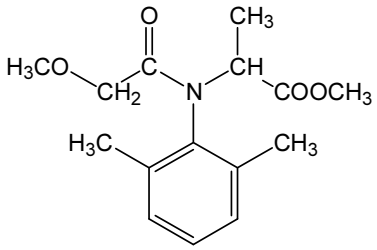
- 비극성인 특성을 이용하여 유지 검체의 경우는 직접 acetone으로 추출하며 채소의 경우는 검체 액성을 고려하여 알칼리성으로 조절, 이온억압으로 유기용매 가용성을 높여 추출한다.

- 유지 검체의 주요 불순물인 유지는 *n*-hexane-acetonitrile partition에 의하여 제거하며 채소나 과실류의 불순물은 보다 정밀한 ion-associated partition에 의하여 제거한다. 즉, 알칼리성에서는 유용성, 산성에서는 수용성인 대상 화합물의 특성을 이용한다. 먼저 추출액의 산도를 알칼리성으로 조절하고 유기용매로 대상성분을 분배 추출한 후, 유기용매 층에 존재하는 대상성분을 산성 수용액으로 재차 추출함으로써 비극성 불순물을 유기용매 층에 남겨 제거한다. 산성 수용액의 산도를 알칼리성으로 재차 조절, 유기용매로 대상성분을 분배 추출함으로써 수용성 불순물을 제거하는 원리이다.

8.4.12 잔류농약 분석법 4.1.4.21

메타락실(Metalaxyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metalaxyl
화학명 (IUPAC) : methyl *N*-(methoxyacetyl)-*N*-(2,6-xylyl)-DL-alaninate
분자식 : $C_{15}H_{21}NO_4$
평균분자량 : 279.3
질량분석 시의 M+ 질량 : 279.2
Log P_{ow} : 1.75
물에 대한 용해도 : 8,400 mg/L
증기압 : 0.75 mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

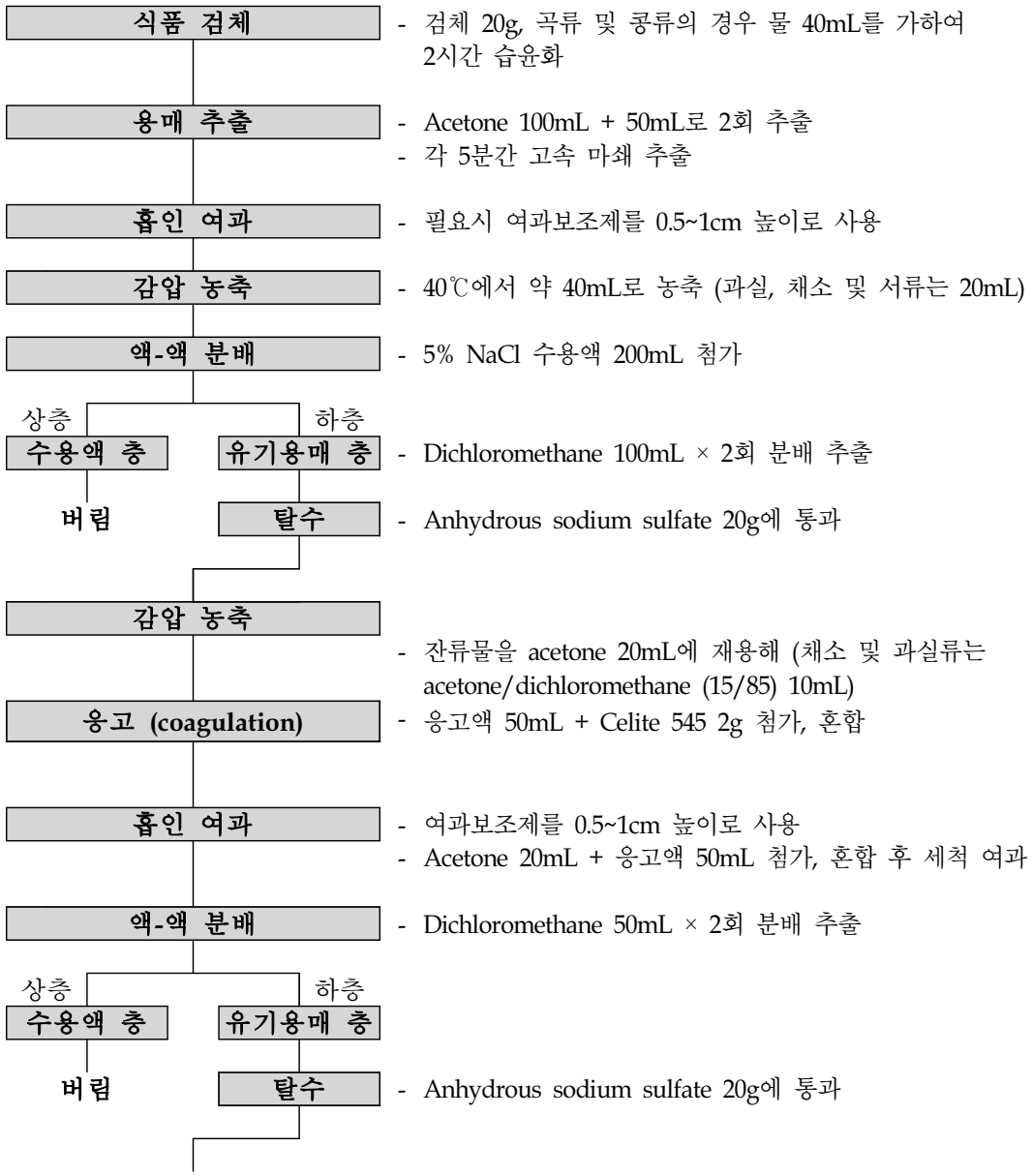
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metalaxyl	0.08	0.05	0.05~1.0	0.05~5.0	0.05	0.05~0.1	0.05

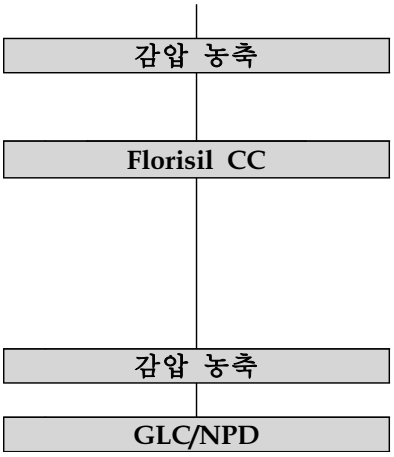
2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인여과하여 농축한 후 농축액을 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압농축하고 acetone과 coagulating 용액을 첨가하여 Celite bed상에서 응고법으로 정제한 후 재차 dichloromethane으로 분배 추출한다.

추출액을 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Acetone/dichloromethane (15/85) 10mL에 재용해
- Florisil 5g (내경 15mm)
- Acetone/dichloromethane (15/85) 50mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함 → 버림
- Acetone/dichloromethane (15/85) 40mL→ 버림
- Acetone/dichloromethane (30/70) 80mL → 받음
- Acetone 4mL에 재용해

응고액 : NH_4Cl 2g 및 phosphoric acid 4mL를 물에 녹여 400mL로 함.

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP (100~120 mesh) 또는 이와 동등한 것
고정상액체 : 5% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
칼럼온도 : 180~200℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen 또는 helium (metalaxyl이 약 3분에서 유출하는 유속으로 조절함.)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약은 phenylamide계 살균제 metalaxyl로 극성은 다소 크나 증기압과 열에 대한 안정성을 고려할 때 GLC법이 유리하다. 대상성분 분자 내에 질소를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD가 사용 가능하다. 그러나 질소 원자의 개수가 1개에 불과하기 때문에 감도가 그다지 높은 편은 아니다. 따라서 검체 추출액의 고농축이 요구되므로 정제과정이 중요하다.

- 추출 용매로는 비극성 농약의 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 acetone을 사용한다. Acetonitrile도 사용 가능하나 고유지 검체인 콩류 검체의 경우 검체가 잘 혼합되지 않고 응집되는 경향을 보인다. 추출액을 조정제하기 위한 분배법으로는 추출 농축액에 ionic strength를 증가시키기 위하여 NaCl 수용액을 첨가하고 dichloromethane으로 분배하면 우수한 회수율을 나타낸다.

- Dichloromethane 분배과정에 의하여 검체 중 수용성 극성 방해물질은 대부분 제거되나 비극성 간섭물질은 제거되지 않으므로 추가적인 정제과정이 필요하다. Metalaxyl의 물에 대한 용해도가 8,400 mg/L로 높고 산성조건에서 비교적 안정한 특성을 이용하여 응고법을 적용한다. 응고법은 소량의 acetone 추출액에 산성의 H_3PO_4-NH_4Cl 응고액을 가하고 혼합, 침전된 pigment나 유지성분을 Celite bed에 침전시키는 방법으로 이때 물에 대한 용해도가 어느 정도 있는 화합물은 bed를 그대로 통과하므로 여액 중에 존재하게 된다. 추가 정제법으로 사용되는 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 정제 효과가 상당하다.

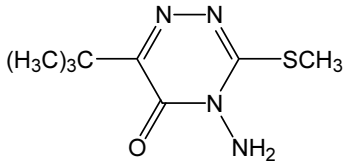
- GLC 분석용 column은 대상성분의 극성을 고려하여 중간 극성의 liquid phase가 바람직하다. NPD에서의 감도는 그다지 높지 않으므로 bead 교체 등 적절한 관리를 통하여 적정 감도를 유지하여야 한다.

- Metalaxyl 잔류분의 재확인을 위한 GC-MS에서 분자이온의 상대 강도가 높지 않으므로 SIM을 위한 fragment (m/z)는 높은 강도이면서 분자구조를 반영할 수 있는 160, 206으로 설정한다.

8.4.13 잔류농약 분석법 4.1.4.24

메트리부진(Metribuzin)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metribuzin
화학명 (IUPAC) : 4-amino-6-*tert*-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one
분자식 : $C_8H_{14}N_4OS$
평균분자량 : 214.3
질량분석 시의 M+질량 : 214.1
Log P_{ow} : 1.6 (pH 5.6 20℃)
물에 대한 용해도 : 1,050 mg/L (20℃)
증기압 : 0.058 mPa (20℃)

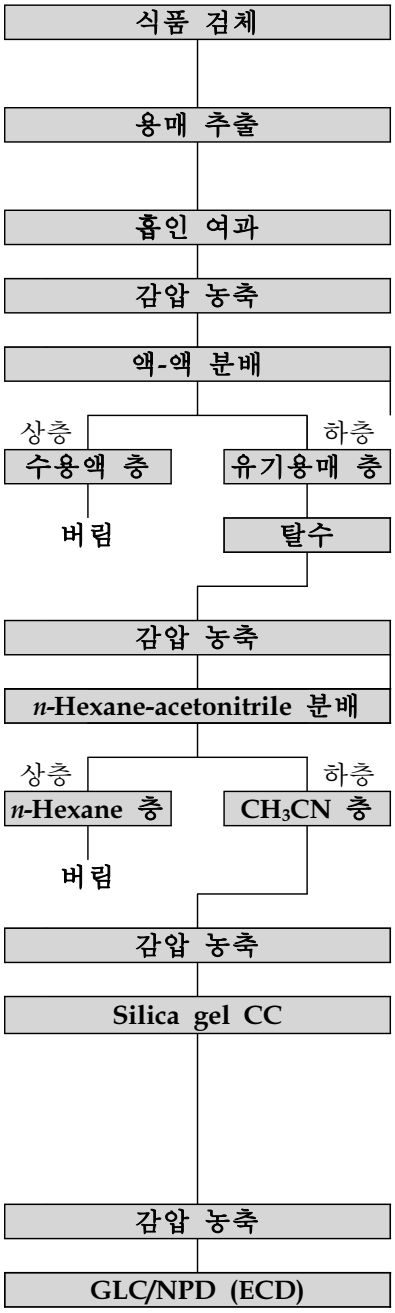
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metribuzin	0.013	0.05~0.75	-	0.5	0.05~0.1	-	0.5~0.6

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤 검체에 methanol을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 감압 농축한 추출액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수 후 감압 농축하여 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 제거한다. 추출액을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/NPD (ECD)로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g, 곡류 및 콩류의 경우 각각 물 40mL를 가하고 2시간 습윤화
- Methanol 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 30분간 진탕 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 methanol 증발
- 20% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배추출
- Dichloromethane 10mL에 재용해
- Silica gel 10g (내경 15mm)
- Dichloromethane 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함 → 버림
- Dichloromethane 100mL → 버림
- Dichloromethane 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 methanol 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-210 및 DB-WAX capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 1.5 μm)
칼럼온도 : 180~220℃
주입부 온도 : 270~280℃
검출기 온도 : 270~280℃
캐리어가스 및 유량 : helium (metribuzin이 약 6분에서 유출하는 유속으로 조정)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Metribuzin은 triazine계 제초제로 휘발성이 0.058 mPa로 다소 높은 특성을 나타내므로 GLC로 분석이 가능한 화합물이다. 화학구조 내에 4개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD를 사용하며 전자포획성도 우수하여 ECD에서도 높은 감도를 나타내므로 2가지 검출기 중 선택 사용할 수 있다. 그러나 화합물의 log P_{ow} 값이 1.6으로 극성이 높은 편이므로 비극성 분리용 column을 사용할 경우 backward tailing 현상이 심하게 나타나는 단점이 있으므로 가능한 한 극성의 분리용 column을 채택한다. 또한 검체 주입 시마다 peak의 재현성이 불량할 수 있으므로 분리용 column을 잘 conditioning 하고 표준용액을 검체용액과 교대로 주입, 보정하여야 최상의 분석 재현성을 얻을 수 있다.

- 추출 용매로는 대상 화합물의 극성이 높으므로 중성 화합물에 대한 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 methanol, acetone 및 acetonitrile 중 methanol을 사용한다. Methanol을 사용할 경우 극성 물질의 추출량은 다소 많아지나 유지나 비극성 간섭물질의 추출량이 acetone이나 acetonitrile에 비하여 적은 장점이 있다.

n-Hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 유지나 왁스의 제거에 주로 이용되는 정제법으로 고유지 검체인 현미 및 콩류 등 검체에서는 그 적용이 필수적이다. 저유지 검체인 채소, 과실 및 서류 등의 검체에서는 그 정제정도가 미미하므로 생략도 가능하다.

- 분배 추출액의 추가 정제법으로 이용하는 흡착크로마토그래피법에서 흡착제로는 Florisil 보다 흡착력이 약한 silica gel을 사용, 극성이 높은 대상 화합물의 용출이 용이하게 한다.

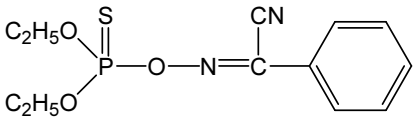
- 최종 분석용 용액은 methanol에 조제하나 acetone에 용해하여도 무방하다. 특히 ECD에서는 methanol에 조제하였을 경우 검체 주입 후 detector의 감도 회복이 늦어지므로 이를 피해야 하며 acetone 혹은 acetone/*n*-hexane 혼합액을 사용하되 대상 화합물의 용해도를 고려하여 조제한다. 이때 acetone의 함량이 높을수록 ECD chromatogram에서 용매 peak가 커진다는 점을 유의한다.

- Metribuzin은 다소 감도는 낮으나 HPLC로도 분석이 가능하다. 검출기로는 자외부흡광검출기를 사용하는데 최대흡광파장은 294 nm이다. 화합물 분리에는 4~5 μm의 구형 silica 입자에 octadecylsilyl (C_{18})기를 결합시킨 column을 사용하며 이동상으로는 acetonitrile/water 혼합액을 40/60 (v/v)~50/50 (v/v) 비율로 혼합하고 metribuzin의 머무름 시간이 10분 정도가 되도록 조절하여 사용한다.

8.4.14 잔류농약 분석법 4.1.4.26

폭심(Phoxim)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : phoxim
화학명 (IUPAC) : *O,O*-diethyl α-cyanobenzylideneamino-oxyphosphonothioate
분자식 : $C_{12}H_{15}N_2O_3PS$
평균분자량 : 298.3
질량분석 시의 M+질량 : 298.1
Log P_{ow} : 4.10
물에 대한 용해도 : 3.4 mg/L (20℃)
증기압 : 1.80×10^{-1} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

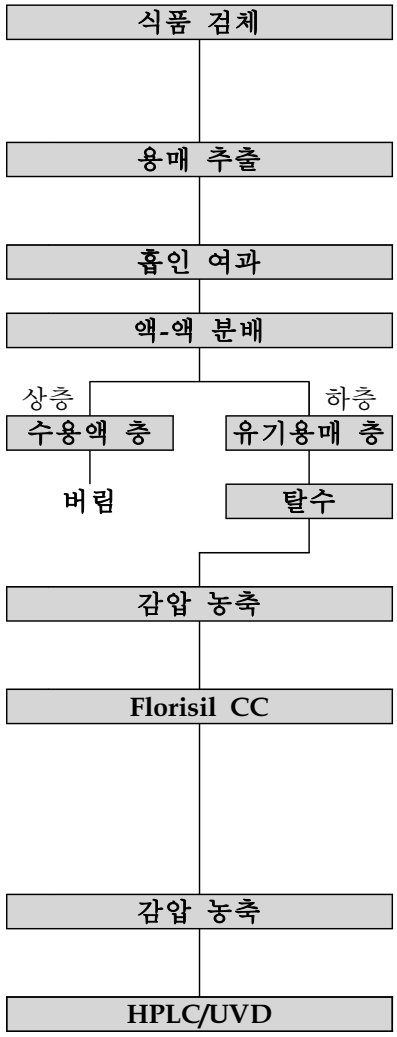
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Phoxim	0.004	0.05	-	0.05~0.2	-	0.05	0.05

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 마쇄 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 과실 및 채소 검체 25g
- 곡류 및 콩류의 경우 분쇄 검체에 증류수 40mL을 가하여 10분간 습윤화
- Acetone 100mL
- 1시간 진탕 추출 (200rpm)
- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 10g
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (40/60) 100mL → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (70/30) 100mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (60/40) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)

이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 281 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
phoxim (9.3분) 20 ng.

5) 재확인법

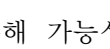
측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/물 (65/35, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 10 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 80 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Phoxim	4.4	298	299

6) 분석법 해설

- Phoxim은 곤충의 신경자극전달에 관여하는 cholinesterase를 저해, 살충작용을 나타내는 전형적 phosphorothionate 구조의 유기인계 살충제이다. 주로 접촉, 식독(食毒)제로 작용하는 비침투성의 속효성 약제로서 채소 재배, 곡물 저장 및 토양 중의 해충 방제를 위하여 전면 살포 또는 토양 처리제로 사용된다. 이 약제는 속효성으로 생체 및 환경 중에서의 잔류기간이 짧으나 ADI가 0.004 mg/kg로 만성독성이 상당하며 이에 따라 허용기준이 0.05~0.2 mg/kg으로 엄격히 설정되어 있다. 따라서 잔류농약 분석법 기준에 따라 분석법의 정량한계는 0.02 mg/kg 이하를 확보하여야 한다.

- 일반적으로 유기인계 농약들은 휘발성이 있고 분자 내에 인 또는 황을 함유하고 있으므로 FPD나 NPD 검출기를 이용, GLC에 의하여 분석하나 phoxim의 경우는 화합물이 비극성임에도 불구하고 분자 내에 열분해 가능성이 높은 oxime기()를 함유하고 있어 GLC의 적용이 어렵다. 따라서 분석법은 장파장의 자외흡광 특성 (최대흡광파장 281 nm)에 착안하여 자외흡광검출기가 부착된 HPLC에 의하여 수행한다.

- 검체 조제과정은 log P_{ow} 4.1인 비극성의 비해리성 화합물이므로 유사한 특성의 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 검체 추출은 비극성 농약의 분석법에서 일반적으로 사용하는 acetone을 추출용매로 사용한다. 곡류 등 건조 검체의 경우, 소정의 추출 효율을 얻기 위해서 acetone 추출 전에 미리 증류수를 가하여 10분간 방치, 습윤화 과정을 수행하는 것이 필수적이다. 추출용매로는 acetone 및 acetonitrile 두 용매 모두 적용이 가능하지만, 고유지 검체의 경우 acetone에 비하여 극성이 높은 용매인 acetonitrile로 추출하면 검체가 잘 혼합되지 않고 응집되는 경향을 나타내는 단점이 있다. 분배는 acetone 추출액을 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석하고 직접 dichloromethane으로 분배하는 간편한 과정으로 수행한다. 분배용매로 hexane을 사용할 경우 분배효율이 90% 정도로 다소 낮다. Florisil 흡착크로마토그래피에서는 색소 등 검체 중 간섭물질에 의한 overloading을 최소화하기 위하여 충분한 양의 흡착제 (10 g)를 사용한다. Phoxim은 비극성 화합물들이므로 dichloromethane/*n*-hexane 용출용매에서 용이하게 용출되는 반면 색소들은 거의 용출되지 않는다.

- 콩류와 같은 유지 함량의 높은 검체는 Florisil 흡착크로마토그래피법에 앞서 hexane-acetonitrile 분배법을 적용, 탈지과정을 필수적으로 수행하여야 한다. 즉, 분배 추출액을 감압 농축한 후 건고물을 30 mL의 *n*-hexane (acetonitrile로 미리 포화시킴)에 재용해, 분액여두에 옮기고 30 mL씩의 acetonitrile (*n*-hexane으로 미리 포화시킴)로 2회 분배 추출한

다. 대두의 경우 2회 분배로 대상성분을 90% 이상 회수하며 유지 제거효율은 70% 이상이다.

- HPLC 분석을 위한 최종 검체용액은 색소가 거의 함유되어 있지 않으며 정량파장이 281 nm로 장파장이므로 그림 2에 나타낸 바와 같이 간섭이 거의 없는 깨끗한 분석 크로마토그램을 얻을 수 있다. 정량한계는 0.02 mg/kg으로 최소 잔류허용기준의 1/2 이하를 충분히 정량할 수 있다.

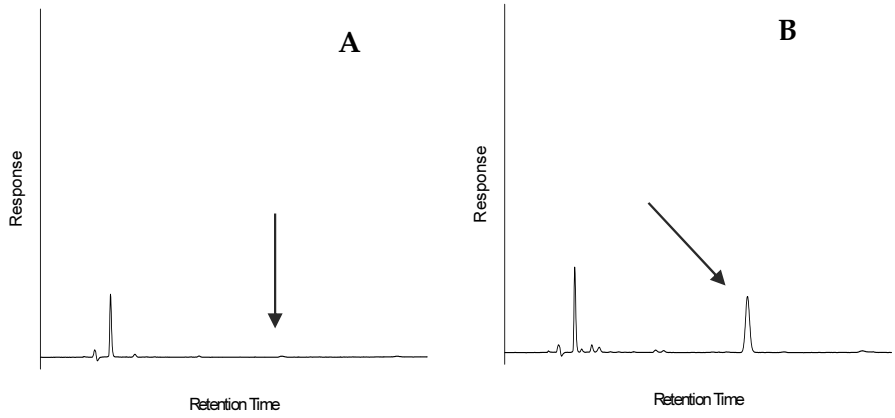


그림 2. 고추 중 phoxim 분석을 위한 HPLC chromatogram
A, 무처리 검체; B, 0.2 mg/kg 처리 검체

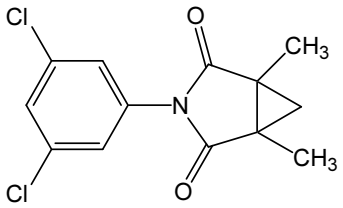
- 현미, 사과, 배추, 고추 및 대두 등 5종의 대표 농산물에 대하여 2수준 3반복으로 수행한 회수율 시험결과는 회수율이 81~112% 범위이며 분석오차는 농산물 종류 및 처리수준에 관계없이 10% 미만으로 잔류농약 분석법 기준을 충분히 만족한다.

- 재확인법은 LC/MS로 수행하는데 대상 화합물 분자 내에 oxime기를 함유하고 있어 protonation의 가능성이 높으므로 이온화법은 ESI, positive ion 방식을 이용한다.

8.4.15 잔류농약 분석법 4.1.4.27

프로시미돈(Procymidone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : procymidone
화학명 (IUPAC) : *N*-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide
분자식 : $C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$
평균분자량 : 284.1
질량분석 시의 M+질량 : 283.0
Log P_{ow} : 3.14
물에 대한 용해도 : 4.5 mg/L
증기압 : 10.5 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

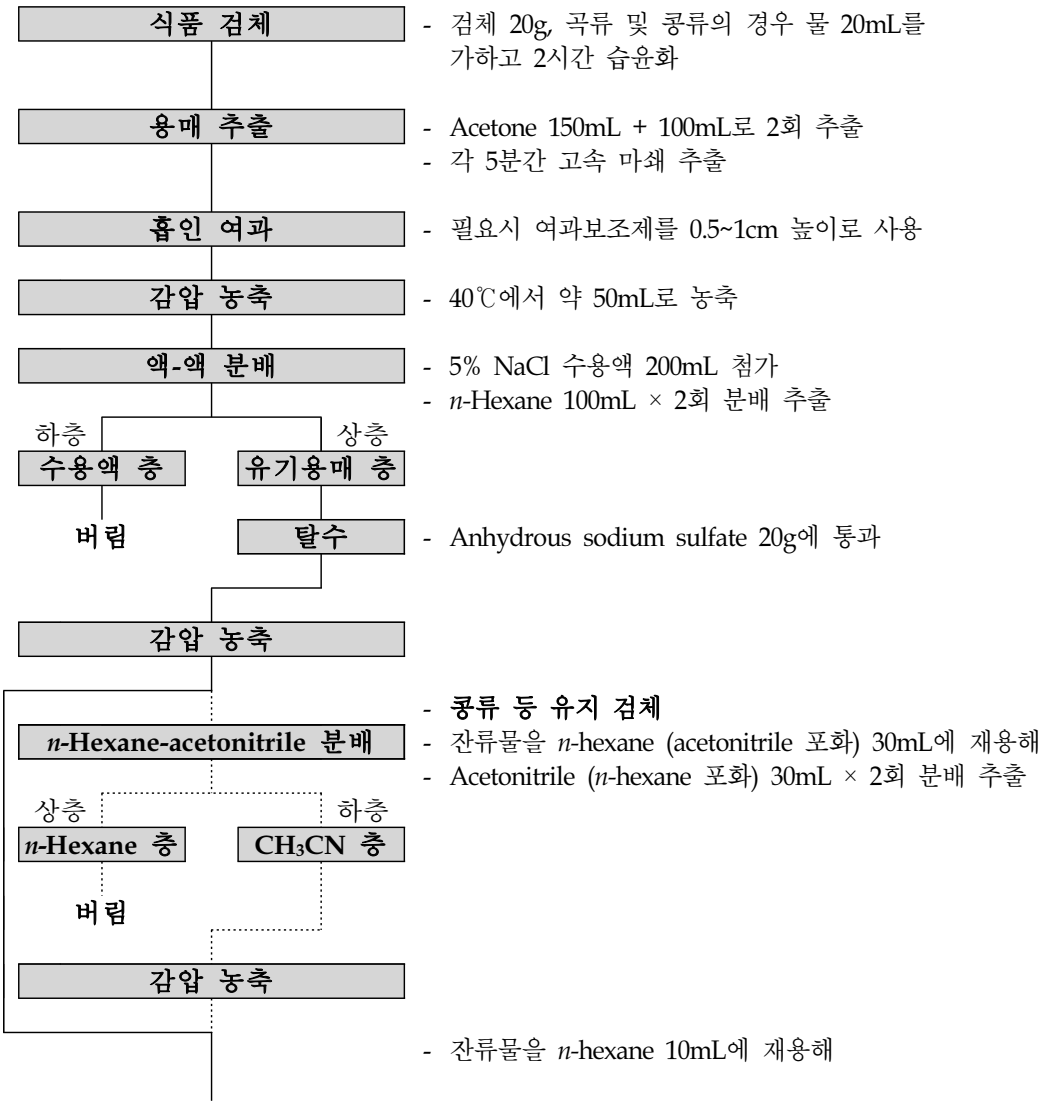
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Procymidone	0.1	1.0	5.0~10.0	0.2~15.0	-	2.0	0.1

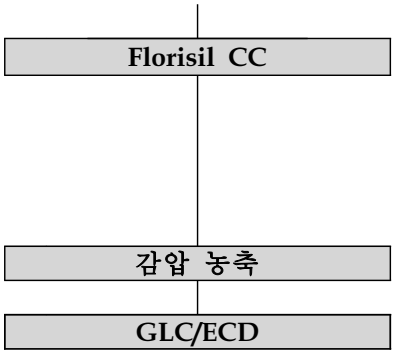
2) 분석법 개요

습윤화한 검체에 acetone을 가하여 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 흡인여과한 후 감압농축하여 대부분의 acetone을 날려 보내고 수용액 층에 NaCl 수용액을 가한 후

n-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 감압 농축하고 현미 및 콩 등 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 간섭성분을 추가 제거한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 최종 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Florisil 10g (내경 15mm)
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함 → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 100mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (15/85) 100mL → 받음

- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : glass column (3~4 mm i.d. × 100~200 cm)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP (100~120 mesh) 또는 이와 동등한 것
고정상액체 : 5% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
칼럼온도 : 180~200℃
주입부 온도 : 220~280℃
검출기 온도 : 250~300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen (procymidone이 약 4분에서 유출하는 유속)
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 대상성분인 procymidone은 dicarboximide계 살균제로서 채소 및 과수 재배 시에 널리 사용된다. Procymidone은 해리하지 않는 중성의 화합물로서 증기압이 상당하고 분자 내에 2개의 염소 원자를 함유하고 있으므로 GLC/ECD법으로 분석하는 것이 유리하다.

- Procymidone은 log P_{ow} 값이 3.1인 비극성 화합물이므로 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone을 사용한다. Acetone 대신 acetonitrile을 추출용매로 사용하는 것이 가능하며 추출물의 양도 적은 편이나 끓는점이 높아 농축과정에서 보다 긴 시간이 소요된다. 액-액 분배는 추출액을 농축한 후 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl 수용액을 첨가한 후 비극성 용매인 *n*-hexane으로 분배한다. 분석과정은 2회 분배로 되어 있으나 90% 이상의 대상성분이 첫 번째 분배에서 회수된다.

- 유지 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. *n*-Hexane/acetonitrile 분배법은 현미, 콩 등 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 정제정도가 미미하고 불순물의 양도 상대적으로 적으므로 생략이 가능하다.

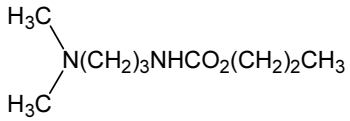
- 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 검체 정제 효과가 뚜렷하다. 세척 및 용출용매 조제 시 함유되는 ethyl ether는 peroxide가 함유되지 않은 정제분을 사용하여야 하며 2% ethanol이 보존제로 함유되어 있어야 한다. Ethyl ether/*n*-hexane 혼합액 대신 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v, 세척용) 및 dichloromethane/acetonitrile/*n*-hexane (50/0.35/49.65, v/v/v, 용출용) 혼합액으로 대체 사용하는 것이 가능하다. 그러나 두 용출체계 모두 검체 적용 전에 대상성분의 용출 양상을 점검하여야만 대상성분의 확실한 회수와 더불어 뚜렷한 불순물 정제 효과를 거둘 수 있다.

- Procymidone은 packed 및 capillary column에 구분 없이 GLC 상에서 대칭형의 우수한 크로마토그래피 특성을 나타내며 ECD에 대한 감도도 높다. 따라서 분석과정을 정확히 수행할 경우 비교적 용이하게 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다.

8.4.16 잔류농약 분석법 4.1.4.29

프로파모카브(Propamocarb)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : propamocarb
화학명 (IUPAC) : propyl 3-(dimethylamino)propylcarbamate
분자식 : $C_9H_{20}N_2O_2$
평균분자량 : 188.3
질량분석 시의 M+질량 : 188.2
Log P_{ow} : 0.84
물에 대한 용해도 : 〉900,000 mg/L
증기압 : 730 mPa (25℃)
pKa : 9.5, 염기성

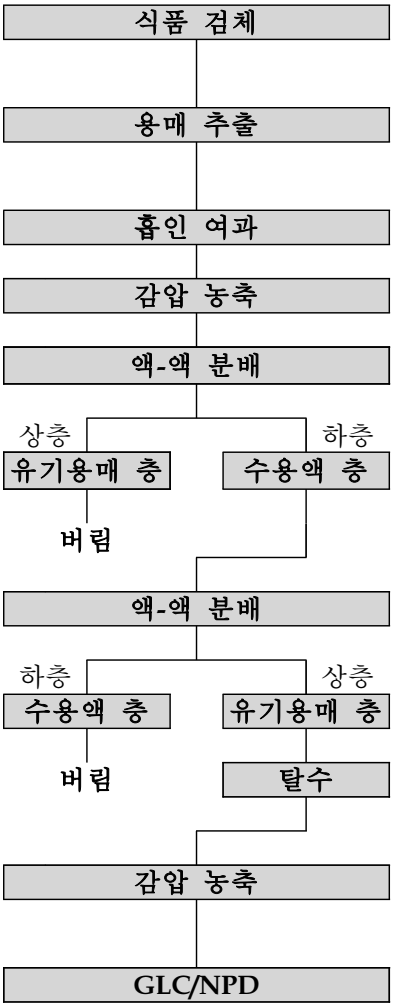
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Propamocarb	0.4	0.1	0.1~2.0	0.1~10.0	-		0.3

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone/water 혼합액을 가하고 고속 마쇄, 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압농축한 후 추출액을 분액여두에 옮겨 ethyl ether로 분배 추출하여 버린다. 수용액 층에 sodium carbonate를 가하여 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 ethyl ether로 분배 추출한다. Ether 추출액을 탈수한 후 감압 농축하고 ethyl acetate에 재용해하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g, 곡류의 경우 1N HCl 수용액 30mL를 가하고 2시간 습윤화
- Acetone/물 (70/30) 80mL + 50mL로 2회 추출
- 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 40mL로 농축
- NaCl 5g 첨가
- Ethyl ether 50mL × 2회 분배 추출하여 버림.
- Na_2CO_3 5g (곡류는 8g) 첨가
- Ethyl ether 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 약 1mL로 농축 후 질소 기류하에서 농축 건고
- 건고 후 잔류물을 ethyl acetate 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-1701 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 ㎛)
칼럼온도 : 60℃에서 검체를 주입하고 1분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를

상승시켜 160℃에서 2분간 유지한다. 다시 4℃/min의 비율로 180℃에 도달시키고 계속하여 온도를 상승시킨 후 20℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 260℃에서 5분간 유지한다.

주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : helium (propamocarb가 약 14분 30초에서 유출하는 유속)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Propamocarb는 carbamate계 살균제로서 보통 염산염 (hydrochloride salt)의 형태로 제조, 사용된다. 잔류분석 시에는 검체 중 잔류량을 Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR)의 잔류성분 정의에 따라 free base 형태인 propamocarb를 기준으로 분석, 표시한다.

- Propamocarb 염산염은 log P_{ow}가 -1.21 (pH 7)로 알려진 수용성 화합물이며 free base인 propamocarb는 짝산의 pKa가 9.5로 염기성이며 log P_{ow}가 0.84로 알려진 극성 화합물이다. Propamocarb는 극성의 염기성 화합물임에도 불구하고 분자량이 188로 작고 휘발성이 강한 화합물이므로 GLC로 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 2개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 NPD를 사용한다. 화합물의 극성이 높으므로 비극성 분리용 column을 사용할 경우 backward tailing 현상이 심하게 나타나는 단점이 있으므로 극성의 분리용 column을 채택한다. 또한 검체 주입 시 마다 peak의 재현성이 불량할 수 있으므로 분리용 column을 충분히 conditioning 하고 표준용액을 검체 용액과 교대로 주입, 보정하여야 최상의 분석 재현성을 얻을 수 있다.

- 추출 용매로는 대상 화합물의 극성이 높으므로 acetone/물 혼합액을 사용한다. 추출용매의 극성을 비교할 때 methanol을 사용할 수도 있으나 추출액의 감압 농축과정에서 돌비 (bumping) 현상이 발생할 가능성이 높다.

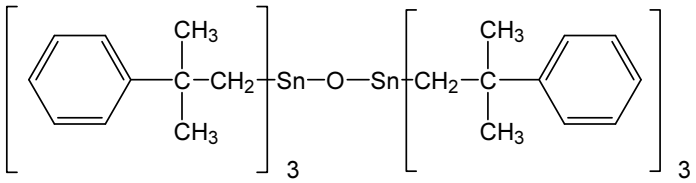
- 액-액 분배는 대상성분의 해리 특성을 이용한 ion-associated 분배법을 이용한다. 즉, 화합물 짝산의 pKa가 9.5이므로 산성~중성에서는 protonation되어 수용성의 4차 암모늄이온이 되고 유기용매에 녹지 않는다. 반면 pH 11 이상의 alkali성에서는 95% 이상이 비이온성의 3차 amine 형태가 되므로 유기용매에 녹게 된다. 따라서 산성~중성조건에서 유기용매로 분배 추출하여 버림으로써 비극성~극성의 간섭물질을 매우 효과적으로 제거할 수 있다. Propamocarb는 수용액 층의 pH를 alkali성으로 재차 조절하고 유기용매로 분배 추출함으로써 회수된다. 이러한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이므로 NPD 자체의 선택성과 병행 이용할 경우 별도의 추가 정제과정 없이 GLC 분석이 가능하다.

- 액-액 분배 시에 사용하는 유기용매는 ethyl ether 대신 dichloromethane으로 대체하는 것이 가능하다. 수용액에 sodium carbonate를 첨가한 후에는 alkali 조건에서 propamocarb의 가수분해를 최소화하기 위하여 분배 추출과정을 신속히 수행하여야 한다.

8.4.17 잔류농약 분석법 4.1.4.31

펜부타틴옥사이드(Fenbutatin oxide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fenbutatin oxide
화학명 (IUPAC) : bis[tris(2-methyl-2-phenylpropyl)tin] oxide
분자식 : $C_{60}H_{78}OSn_2$
평균분자량 : 1,052.7
질량분석 시의 M+질량 : 1,054.4
Log P_{ow} : 5.2
물에 대한 용해도 : 0.0152 mg/L
증기압 : 3.9×10^{-8} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

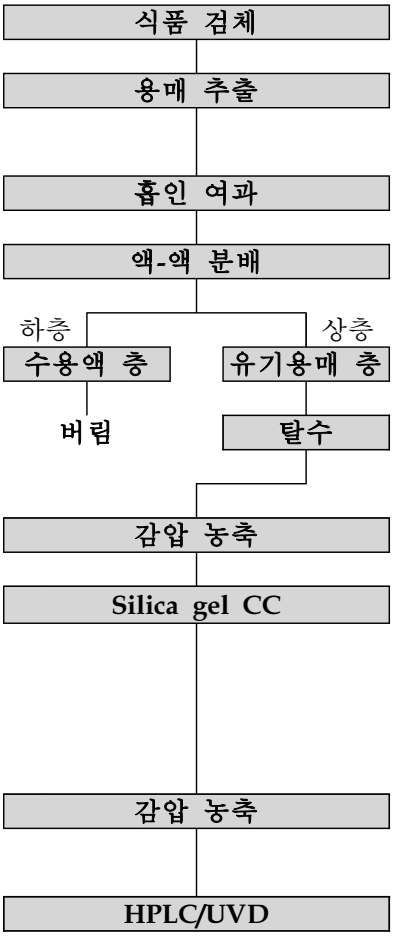
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI	잔류허용기준 (mg/kg)					
	(mg/kg 체중)	곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fenbutatin oxide	0.03	-	2.0~7.0	1.0~2.0	0.5	0.5~2.0	-

2) 분석법 개요

습윤화한 검체에 acetone/acetic acid 혼합액을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v)으로 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하고 silica gel column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g
- Acetone/acetic acid (100/1) 80mL
- 30분간 진탕 추출
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 400mL 첨가
- Dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 잔류물을 dichloromethane 10mL에 재용해
- Silica gel 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- Dichloromethane 추출액 10mL → 버림
- Dichloromethane 50mL → 버림
- Dichloromethane/acetic acid (100/1) 60mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 acetonitrile/methanol/1mM HCl 수용액 (50/35/15, 5mM NaCl 함유) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (3.9 mm i.d. × 150 mm, 4 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/methanol/1 mM HC, 5 mM NaCl 함유 (50/35/15, v/v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 214 nm

분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

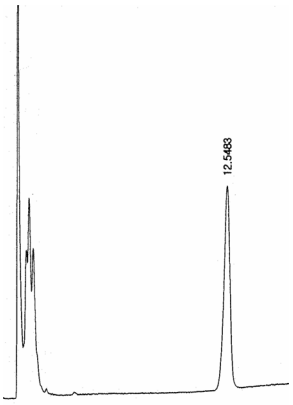


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
fenbutatin oxide (12.5분) 50 ng.

5) 재확인법 : HPLC

측정기기 : HPLC (머무름 특성이 상이한 column 또는 이동상 이용)

6) 분석법 해설

- Fenbutatin oxide는 대표적 유기주석계 살비제로서 오랜 기간 과수용으로 등록 사용되어 왔다. Fenbutatin oxide의 물리화학적 특성은 log P_{ow} 값이 5.2로 비극성 화합물이나 주석이 함유된 organometallic 화합물로서 다른 유기 농약과는 상이한 용해도 특성을 나타낸다. Fenbutatin oxide는 증기압이 매우 낮아 GLC로 직접 분석하는 것은 불가능하며 분자량이 1053으로 매우 크므로 Grignard 시약이나 alkylithium 시약을 사용, alkylated derivatives를 형성한다 하더라도 GLC로 분석하기 어렵다. 원자흡광이나 발광법을 이용하여 분자 내의 주석을 분석하는 방법이 알려져 있으나 이는 총 주석으로 표시되므로 모화합물의 잔류분을 정확히 정성할 수 없는 커다란 단점이 있다.

- 본 분석법은 유도체 형성과정 없이 직접 HPLC로 분석하는 방법이다. Fenbutatin oxide를 HPLC로 분석할 때 사용할 수 있는 검출기로는 일반적 HPLC 검출기 중 자외부흡광 검출기가 유일하다. Fenbutatin oxide에서는 자외선 영역에서 특정 발색단에 의한 최대흡광파장 peak 관찰되지 않으며 큰 분자량으로 인하여 흡광계수는 200~215

nm 사이에서도 10^3~10^4 $cm^{-1}M^{-1}$ 범위이다. 따라서 잔류분석법의 감도 요건을 충족시키기 위해서는 검체 추출액의 높은 농축이 필수적이므로 간섭물질의 상대적 비율도 함께 높아지게 된다. 또한 단파장의 측정파장을 적용함에 따라 장파장을 사용할 때보다 불순물 혼입에 의한 간섭 가능성도 상대적으로 높으므로 간섭물질의 효율적 제거 및 분리가 무엇보다도 중요하다.

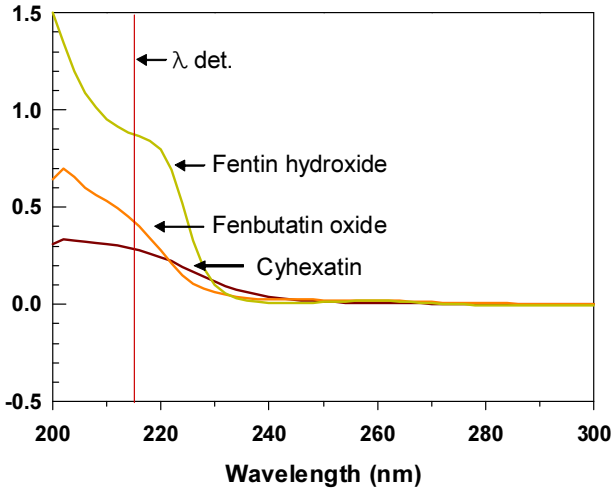


그림 2. Fenbutatin oxide의 UV 흡광 spectrum.

- Fenbutatin oxide에 대한 HPLC 분석조건에서 이동상으로는 NaCl이 함유된 acetonitrile/methanol/HCl 혼합액을 사용한다. 이동상 중 NaCl과 HCl이 함유되지 않을 경우 cyhexatin과 마찬가지로 fenbutatin oxide는 용출되지 않으며 이동상 중 NaCl과 HCl의 농도가 변화함에 따라 머무름 시간이 민감하게 변화하므로 정확한 농도 조절이 필요하다.

- 추출 용매로는 cyhexatin의 경우와는 다르게 1% acetic acid가 함유된 acetone을 사용하는데 이는 fenbutatin oxide가 acetone에 대한 용해도가 상당히 높고 acetic acid 첨가 시에 그 추출 효율이 향상되는 것으로 알려져 있기 때문이다. 또한 진한 HBr/acetone 혼합액 보다 약산이므로 추출과정 중 대상성분의 분해 가능성이 상대적으로 적다.

- 분배용매로는 cyhexatin과 마찬가지로 대상성분이 비극성인 점을 이용하여 수용성 유

기용매 추출액을 포화식염수/물로 희석한 후 직접 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액으로 분배하며 1회 분배 추출로 전량이 회수된다.

- 분배 추출액의 추가적 정제법으로는 흡착크로마토그래피법을 공시한다. 예비실험의 결과 SPE-silica (충전제량 1 g)는 검체 추출물의 과다로 overloading 현상이 관찰되었고 분석법의 감도 상 검체량을 감소시키기도 어렵다. 따라서 SPE 대신 5 g의 silica gel을 흡착제로 충전한 column을 이용한다. Fenbutatin oxide는 dichloromethane에서는 용출되지 않으며 1% acetic acid가 함유된 dichloromethane에서 비로소 용출된다. 따라서 dichloromethane을 세척용 용매로 흘려버림으로써 효율적으로 불순물을 제거한다. 그러나 dichloromethane 세정조건에서 현미 및 콩 검체로부터 추출된 유지성분은 일부 밖에 제거되지 않으므로 본 분석법을 유지 식품검체에 적용하기는 어렵다.

- 최종검체 용액은 그 정제 정도가 우수하나 HPLC 분석 시에 fenbutatin oxide 보다 늦게 용출되는 간섭물질이 비교적 많으므로 각 식품 검체별로 늦게 용출되는 성분들의 머무름 시간을 조사, 다음 검체 분석 시까지 세척시간을 적절히 조절할 필요가 있다.

- Fenbutatin oxide는 분자량이 크고 분자 내에 주석을 함유하고 있어 휘발성이 극히 낮으므로 LC-MS에서 분자이온을 검출하기 어렵다. ESI 및 APCI의 이온화 mode 모두에서 분자이온이 검출되지 않는다. 따라서 재확인법은 머무름 특성이 상이한 column을 사용하거나 이동상 중 NaCl과 HCl의 농도가 변화함에 따라 머무름 시간이 민감하게 변화하는 특성을 이용한다. 즉, 변경된 조건으로 검체를 재주입하여 표준물질과의 머무름 시간의 일치 여부를 판정, 잔류분을 재확인한다.

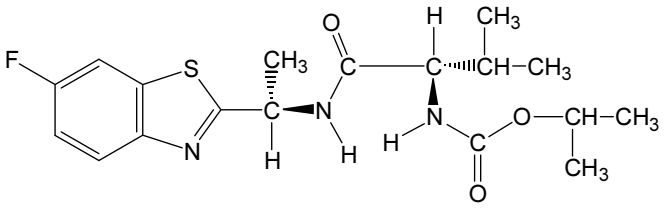
표 1. 농산물 중 회수율 및 검출한계

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)			정량한계 (mg/kg)
		감자	사과	밀감	
Fenbutatin oxide	0.4	77.3±2.9	74.5±2.5	73.1±2.2	0.04
	2.0	73.0±2.2	76.8±2.3	73.3±0.6	

8.4.18 잔류농약분석법 4.1.4.32

벤티아발리카브아이소프로필(Benthiavalicarb-isopropyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : benthiavalicarb-isopropyl
화학명 (IUPAC) : isopropyl [(*S*)-1-{[(*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl) ethyl]carbamoyl}-2-methylpropyl]carbamate
분자식 : $C_{18}H_{24}FN_3O_3S$
평균분자량 : 381.5
질량분석 시의 M+질량 : 381.2
Log P_{ow} : 2.3~2.9 (pH 5~9, 20~25℃)
물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 10.96 (pH 5), 12.76 (pH 9)
증기압 : 〈3.0×10^{-1} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

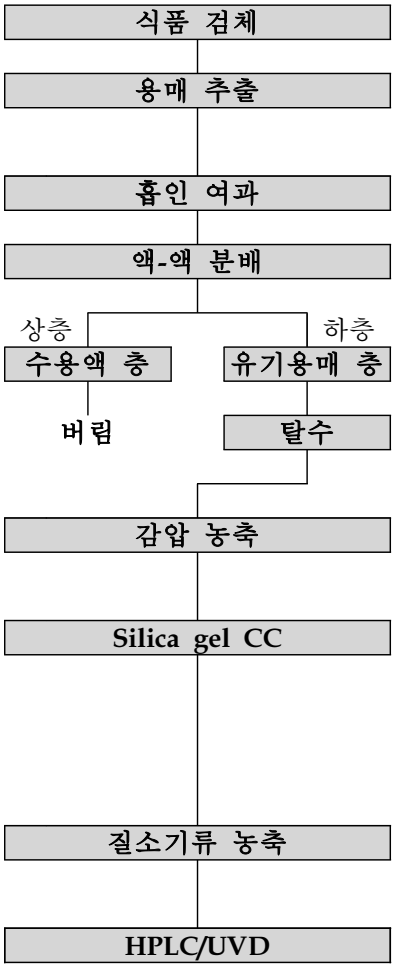
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Benthiavalicarb-isopropyl	0.1	-	0.5	0.07~2.0	-	-	0.05

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 과실 및 채소 검체 25g
- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 10mL에 재용해
- SPE-silica 1g 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 30mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 20mL → 받음
- 40℃ 질소기류 하에서 농축 건고
- Acetonitrile/water (50/50) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (45/55, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min

검출기 파장 : UV 220 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.04 mg/kg

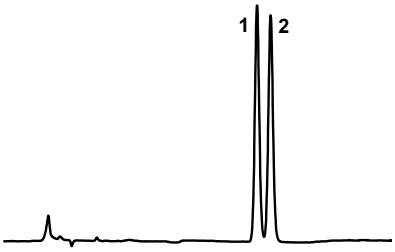


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
1, benthiavalicarb-isopropyl R형 (11.9분) 40 ng;
2, benthiavalicarb-isopropyl S형 (12.6분) 40 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 85 V
Capillary temp. : 330℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Benthiavalicarb-isopropyl	4.6	381	382

6) 분석법 해설

- Benthiavalicarb-isopropyl은 미생물의 세포막 형성에 필수적인 phospholipid 생합성을 저해함으로써 살균작용을 나타내는 iprovalicarb와 유사한 분자구조의 valinamide carbamate계 살균제이다. 채소류, 서류 및 포도의 노균병 및 역병에 대하여 보호와 직접 치료효과를 나타내는 침투성 살균제로서, 저항성을 최소화하기 위하여 단제보다는 광범위 살균제와의 혼합제 형태로 주로 전면 살포용으로 사용된다.

- 대상성분은 분자 내에 2개의 chiral center를 가지고 있어 분석성분은 2쌍의 enantiomer로 총 4종이며 enantiomer 쌍간은 서로 diastereoisomer 관계이다. Enantiomers는 입체선택적인 chiral column을 사용하지 않는 일반적 기기조건에서는 서로 분리되지 않으므로 분석성분은 diastereoisomer 관계인 2개의 peak로 나타나게 된다. 대상성분은 log P_{ow}가 2.3~2.9인 중간~비극성 성분이며 비해리성을 나타내나, 분자 내에 carbamoyl기를 함유하고 있어 열분해 가능성이 높으므로 기기분석법으로는 GLC 보다 HPLC가 더 적합하다.

- 검체 조제과정은 중간~비극성의 비해리성 화합물이므로 유사한 특성의 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (**組精製**) 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제 과정으로 구성된다. 분배과정은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 간편한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 대상 검체가 채소, 과실 및 서류로 수분함량 70% 이상인 비유지 검체이므로 추출 시의 습윤화 과정 및 유지 제거를 위한 hexane-acetonitrile 분배과정은 필요하지 않다.

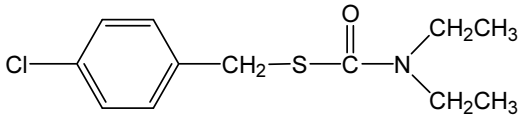
- 기기분석은 자외흡광검출기가 부착된 HPLC를 이용하는데 검출파장이 220 nm로 짧으므로 선택성이 저하, 검체 중 불순물에 의한 간섭이 우려되므로 충분한 머무름 시간이 되도록 조절한다. 두 diasteroisomer간 분리 정도는 분석용 column의 분리능 확인에 이용하여 분리의 재현성을 확보한다.

- 재확인법은 LC/MS로 수행하는데 대상 화합물이 중간 극성이고 분자 내에 benzothiazol ring과 carbamoyl기를 함유하고 있어 protonation의 가능성이 높으므로 이온화법은 ESI, positive ion 방식이 최선이다. LC/MS에서는 머무름 시간이 짧아 두 diasteroisomer가 함께 용출된다.

8.4.19 잔류농약 분석법 4.1.4.33

티오벤카브(Thiobencarb)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : thiobencarb
화학명 (IUPAC) : *S*-4-chlorobenzyl diethylthiocarbamate; *S*-4-chlorobenzyl diethyl (thiocarbamate)
분자식 : $C_{12}H_{16}ClNOS$
평균분자량 : 257.8
질량분석 시의 M+질량 : 257.1
Log P_{ow} : 4.23 (pH 7.4, 20℃)
물에 대한 용해도 : 16.7 mg/L (20℃)
증기압 : 2.39 mPa (23℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

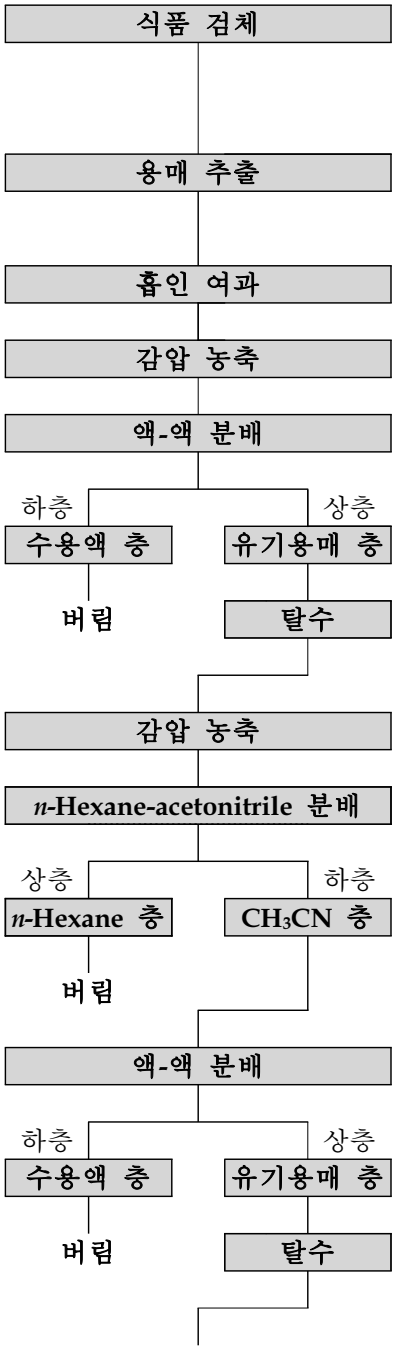
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Thiobencarb	0.01	0.05~0.2	-	0.1~0.2	0.2	0.2	0.05

* cRfd (US EPA, 1997).

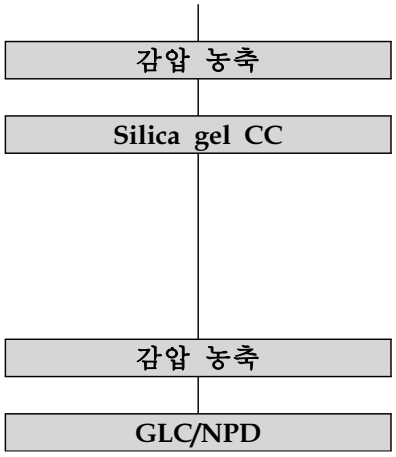
2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물 검체에 acetone/물 (70/30) 혼합액을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 NaCl 수용액을 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 분배액을 감압 농축하고 *n*-hexane/acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 추가로 제거한다. 분배액을 Florisil column chromatography에 의하여 최종 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 곡류 및 콩류 분쇄검체 10g
  (증류수 40mL를 가하여 2시간 동안 방치하여 습윤화)
- 균질화한 채소류 검체 20g
- Acetone/증류수 (70/30) 혼합액 100mL + 50mL로 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제 (Celite) 사용
- 40℃에서 acetone 증발
- 10% NaCl 수용액 50mL 첨가
- *n*-Hexane 50mL × 2로 분배 추출
- 합친 hexane 층을 증류수 50mL로 분배 세척
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 5mL로 농축
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 20mL × 2회 분배 추출
- 5% NaCl 수용액 40mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL + 50mL로 분배 추출
- 합친 hexane 층을 증류수 100mL로 분배 세척
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과



- 40℃에서 5mL로 농축
- Silica gel 10g (내경 15mm, 30cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL로 습식 충전 → 버림
- 검체 농축액 5mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 100mL → 받음
- Ethyl ether/*n*-hexane (30/70) 100mL → 받음
- 40℃ 농축 건고
- *n*-Hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : glass column (3~4 mm i.d. × 1~2 m)
칼럼충전제 : 5% DC-200, 3% FFAP 또는 3% PEG 20M
칼럼온도 : 180~220℃
주입부 온도 : 200℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 40~60 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Thiobencarb는 식물체내 지질생합성을 저해하여 살초작용을 나타내는 thiocarbamate계의 선택성 제초제이다. 주로 수도에서 잡초 발생전 또는 발생 초기에 전면 살포제로서 사용되며 보리 및 무 등 기타 작물에도 일부 사용된다. Thiobencarb는 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Thiobencarb는 log P_{ow}가 4.23인 비극성 화합물이고 증기압이 2.39 mPa (23℃)로 어느 정도 있으며 분자 내 *N,N*-diethylcarbamoyl기는 monoalkylcarbamoyl기와 달리 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 질소 원자를 1개 함유하고 있으므로 NPD를 사용한다. 분자 내에 황 원자가 존재하므로 FPD (sulfur mode 사용)도 사용 가능하나 감도가 상대적으로 낮고 검량선이 square root에 비례하는 등 분석결과 산출이 번거롭다. 염소 원자는 1개밖에 없으므로 ECD에서의 감도가 매우 낮다.

- 적용 작물에 따라 검체는 대부분 어느 정도 함유하고 있는 곡류이므로 유지 성분의 공(共)추출을 줄이기 위하여 30%의 물이 함유된 acetone으로 추출하는데 추출효율을 확보하기 위하여 2회 추출한다. 액-액 분배는 대상 성분이 비극성이므로 *n*-hexane으로도 충분히 분배 추출된다. 검체 중 함께 추출되는 유지 및 비극성 불순물을 제거하기 위하여 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가로 적용하는데 acetonitrile (*n*-hexane 포화) 2회 분배로 전량 회수된다.

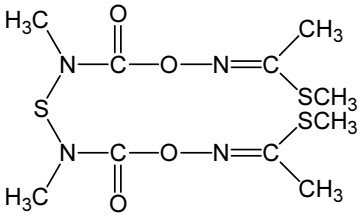
- 최종적으로 분배 추출액은 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. 용출용매는 세척/용출 분획으로 구분하여 용출강도가 상이한 용매로 각각 유출시키는데 불순물 제거 효과가 뚜렷하므로 기기분석에 문제가 없는 충분히 정제된 최종용액을 얻을 수 있다.

- 제시된 GLC column은 극성의 liquid phase로 피복된 packed column이나 충분한 분리와 감도를 나타낸다. 보다 향상된 분리능이 요구될 경우에는 50% 정도의 phenylsilicone이 함유된 극성의 capillary column을 최적화하여 사용하는 것이 가능하다.

8.4.20 잔류농약 분석법 4.1.4.34

티오디카브(Thiodicarb)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : thiodicarb
화학명 (IUPAC) : 3,7,9,13-tetramethyl-5,11-dioxa-2,8,14-trithia-4,7,9,12-tetra-azapentadeca-3,12-diene-6,10-dione
분자식 : $C_{10}H_{18}N_4O_4S_3$
평균분자량 : 354.5
질량분석 시의 M+질량 : thiodicarb 354.1, methomyl oxime 105.0
Log P_{ow} : 1.62 (25℃)
물에 대한 용해도 : 0.022 mg/L (25℃)
증기압 : 2.7×10^{-3} mPa (25℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

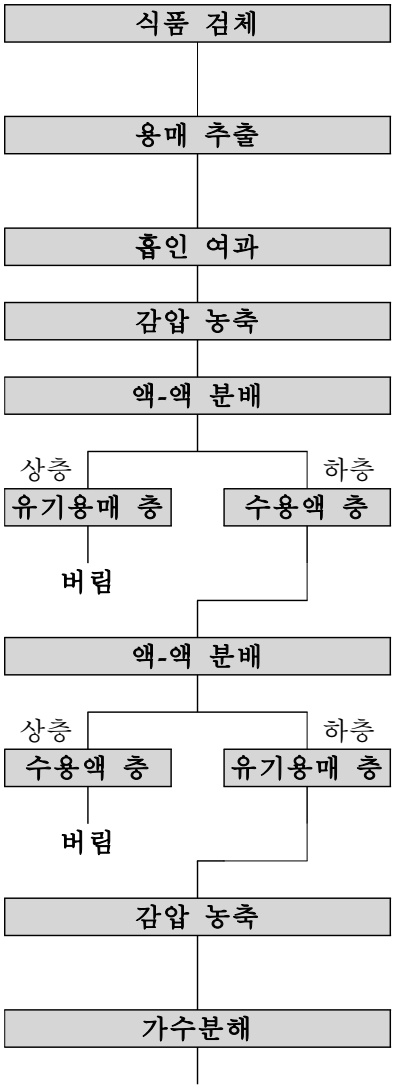
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Thiodicarb	0.03	0.05	0.05~3.0	2.0~5.0	0.2	0.4	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 모화합물 및 대사산물을 동시에 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 산성화한 후 *n*-hexane으로 분배하여 씻어버린 후 재차 dichloromethane으로 분배 추

출한다. Dichloromethane 추출액을 감압농축하고 잔류물에 NaOH 수용액을 가한 후 가수분해, thiodicarb와 methomyl을 methomyl oxime으로 변환시킨다. 가수분해 액을 산성화하고 NaCl을 가한 후 ethyl acetate로 분배 추출한다. 추출액을 감압농축하고 acetone에 재용해하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g, 곡류 및 콩류의 경우 증류수 40mL를 가하여
- 2시간 동안 방치, 습윤화

- Acetone 100mL + 50mL로 2회 추출
- 5분간 고속 마쇄 추출

- 여과보조제 사용

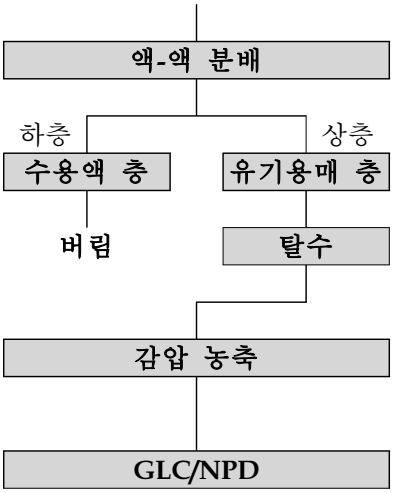
- 40℃이하에서 acetone 증발시켜 약 40mL로 농축

- 증류수 50mL + 1N H_2SO_4 5mL + NaCl 20g 첨가
- *n*-Hexane 50mL × 2회 분배 추출하여 버림

- Dichloromethane 100mL × 3회 분배 추출

- Acetone에 녹인 2% diethylene glycol 0.1mL 첨가
- 40℃이하에서 감압 농축 건고

- 4N NaOH 20mL 첨가 후 혼합
- 85℃에서 30분간 가열한 후 방냉



- 1N H_2SO_4 수용액 100mL 첨가
- Ethyl acetate 100mL + 50mL × 2로 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetone에 녹인 2% diethylene glycol 0.1mL 첨가
- 40℃이하에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검 출 기 : 불꽃염광검출기 (FPD)
질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : glass column (3 mm i.d. × 100 cm)
칼럼충전제 : 10% 유리지방산 에스테르
칼럼온도 : 160~190℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen 및 helium을 적절하게 조절한다.
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 thiodicarb는 살충제 methomyl 2분자가 *N,N* -thio bond로 결합되어 있는 prosthetic pesticide (일명 propesticide)의 일종이다. 이러한 propesticide는 기존 농약의 취급 및 살포작업 시 강한 급성 독성 등 단점을 개선하기 위한 유도체 화합물로서 약제 살포 후에는 기존 농약성분이 방출되도록 분자 설계되어 있다. 즉, thiodicarb는

살포 후 작물 및 환경 중에서 신속하게 가수분해되어 methomyl을 방출하는데 methomyl은 재차 독성학적 중요성이 인정되는 oxime체로 대사된다. 따라서 thiodicarb 잔류분은 모화합물과 함께 실제 살충성분인 methomyl 그리고 methomyl oxime을 합하여 총 잔류량으로 methomyl 기준으로 표시하도록 규정되어 있다. 분석법은 thiodicarb과 methomyl을 분석과정 중에 가수분해시켜 methomyl oxime으로 전환, 총 methomyl oxime의 형태로 분석하고 이를 methomyl 기준으로 환산, 표시하도록 설계되어 있다.

- Thiodicarb 및 methomyl은 각각 log P_{ow}가 1.62 및 0.09로 극성이 높고 고온에서 열분해되므로 직접 GLC로 분석 하는 것이 어렵다. Methomyl oxime은 극성이 높음에도 불구하고 분자량이 작아 휘발성이 있으므로 중간 극성~극성 column을 사용할 경우 GLC 분석이 충분히 가능하다. 분자구조 내 sulfur와 nitrogen기를 함께 포함하고 있으므로 GLC/FPD(S)와 GLC/NPD를 모두 이용할 수 있으나 NPD에서의 감도가 FPD(S)에서의 감도보다 2배가량 높으므로 감도 측면에서는 NPD가 유리하다.

- 농산물 검체로부터 thiodicarb, methomyl 및 oxime체의 분석 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Thiodicarb, methomyl 및 oxime체의 극성이 높으나 acetone에 대한 용해도가 잔류분석 수준에서는 충분하며 이미 많은 연구자들에 의하여 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다. Acetone 추출액은 감압 농축하여 acetone을 제거하는데 과량의 acetone이 존재할 경우 대상 성분들은 dichloromethane으로 분배되지 않기 때문이다.

- 추출액으로부터 thiodicarb, methomyl 및 oxime체를 분배 추출하거나 또는 검체 중 불순물을 세척하기 위한 분배법으로는 산성조건하에서 oxime체의 해리를 억압하면서 비극성 용매로 분배하는 방법을 사용한다. 이온억압조건하에서 thiodicarb, methomyl 및 oxime체는 *n*-hexane으로 분배되지 않으므로 비극성 간섭물질들을 효과적으로 세척, 제거한다. 대상 성분들은 dichloromethane 2회 분배로 우수한 회수 효율을 나타낸다.

- 유기용매 분배액을 증발 건고할 경우에는 휘발성이 큰 methomyl oxime이 손실되므로 diethylene glycol을 keeper solution으로서 사용하며 온도도 40℃이하 (30℃가 적절함.)에서 수행한다.

- Dichloromethane 추출액은 감압 농축한 후 NaOH를 가하여 가수분해, 다음 반응식에 나타낸 바와 같이 thiodicarb와 methomyl을 methomyl oxime으로 전환하며 이 조건에서 methomyl oxime은 안정하다.

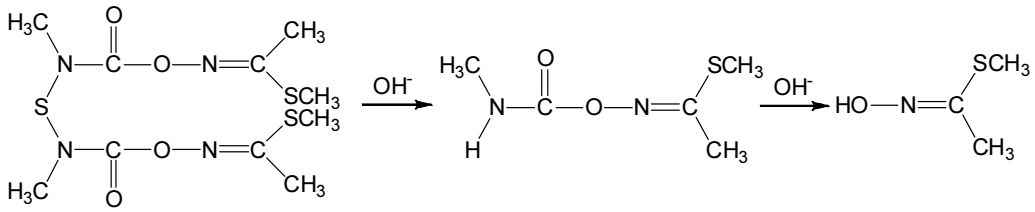


그림 1. Thiodicarb의 가수분해 반응

- 가수분해 반응물은 재차 산성화하여 생성된 methomyl oxime을 이온화 억압조건에서 ethyl acetate 층으로 분배한다. 이러한 일련의 분배에 의한 정제과정은 간섭물질 제거 효과가 매우 우수하여 흡착크로마토그래피와 같은 추가의 정제과정 없이 GLC 분석이 충분히 가능하다.

- GLC 분석 시 분리용 column으로 packed column을 제시하였으나 분석성분이 methomyl oxime (methylthioacethydroximate)으로 동일하므로 이므로 4.1.3.15 분석법의 GLC 분석 조건을 준용하여도 무방하며 이 경우 isothermal 조건에서 분석하는 것이 분석의 재현성 측면에서 보다 유리하다.

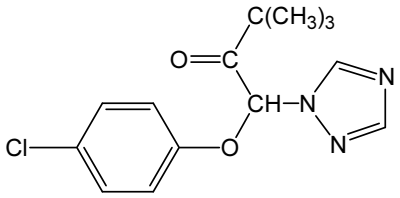
- 검출된 잔류분은 분자량 차이에 따른 보정계수 methomyl 분자량 (166.2) / methomyl oxime 분자량 (105.2) = 1.58을 곱하여 methomyl의 총 잔류량기준으로 잔류량을 표시한다.

- 검체 중 검출된 methomyl oxime의 잔류분을 GC-MS SIM으로 확인할 경우 4.1.3.15 분석법에서 제시한 바와 같이 fragment ion은 *m/z* 105 (M^+) 및 88로 설정한다. GC-MS의 EI 70 eV 이온화조건에서도 methomyl oxime은 분자이온이 충분한 intensity로 관찰되므로 재확인이 확실하다.

8.4.21 잔류농약 분석법 4.1.4.35

트리아디메폰(Triadimefon)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : triadimefon

화학명 (IUPAC) : 1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1*H*-1,2,4-trizol-1-yl) butan-2-one

분자식 : $C_{14}H_{16}ClN_3O_2$

평균분자량 : 293.8

질량분석 시의 M+질량 : 293.1

Log P_{ow} : 3.11

물에 대한 용해도 : 64 mg/L

증기압 : 0.02 mPa (20℃)

pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

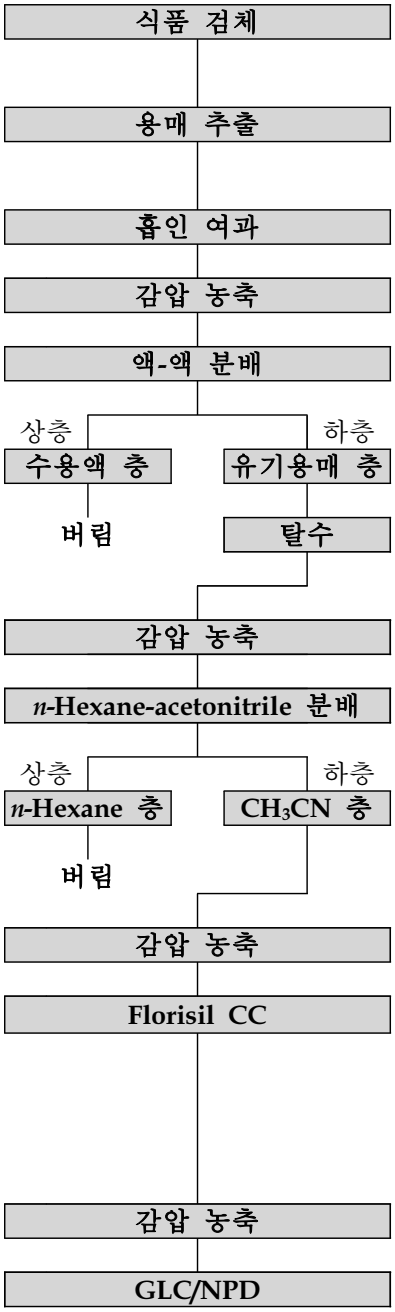
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Triadimefon	0.03	0.1~0.5	0.2~3.0	0.1~0.5	0.1	-	-

2) 분석법 개요

균질화한 검체를 acetone으로 추출하고 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축한 후 분액 여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 탈수, 감압 농축하고 곡류 및 콩류 검체는 *n*-hexane-acetonitrile 분배법, 채소 및 과실 검체는 응고법으로 간섭물질을 제거한다. 최종적으로 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

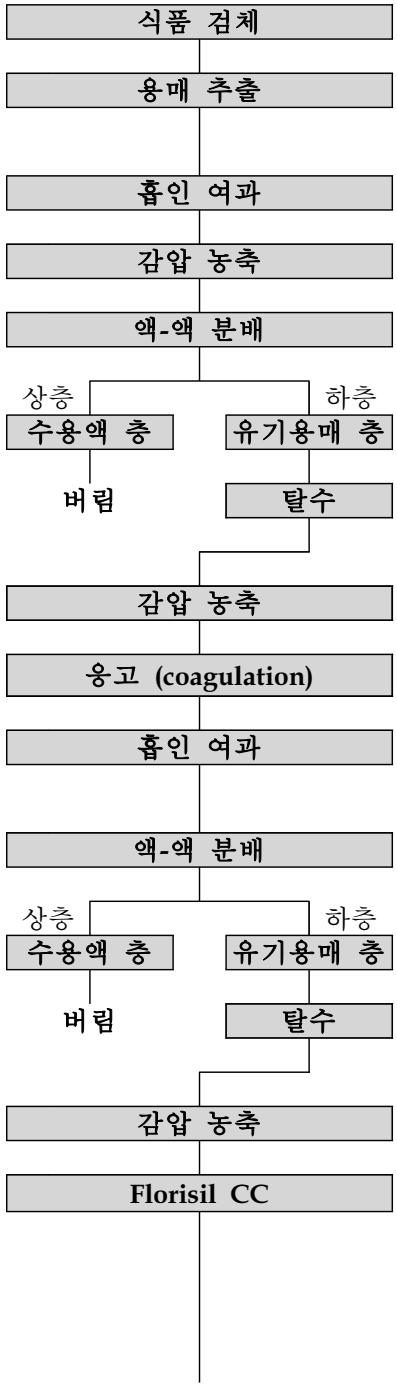
3) 검체 추출 및 정제 과정

① 곡류 및 콩류



- 곡류 및 콩류검체 20g에 물 40mL를 가하여 2시간 습윤화
- Acetone 150mL + 100mL로 2회 추출
- 각 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 50mL로 농축
- 5% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 *n*-hexane 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 30mL × 2회 분배 추출
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm)
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 100mL→ 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (15/85) 150mL→ 받음
- Acetone 5mL에 재용해

② 채소 및 과실류



- 검체 20g
- Acetone 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 20mL로 농축
- 5% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해
- 응고액 50mL + Celite 545 2g 첨가, 혼합
- 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- Acetone 5mL + 응고액 50mL 첨가, 혼합 후 세척 여과
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm)
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 100mL로 습식 충전, 유출 후 검체용액을 가함 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 100mL→ 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (15/85) 150mL→ 받음

- Acetone 5mL에 재용해

* 응고액 : NH_4Cl 2g 및 phosphoric acid 4mL를 물에 녹여 400mL로 함.

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : glass column (2~3 mm i.d. × 50~100 cm)
칼럼충전제
고정상담체 : Chromosorb W HP (100~120 mesh) 또는 이와 동등한 것
고정상액체 : 5% phenylsiloxane이 함유된 기체크로마토그래프용 silicon oil
칼럼온도 : 180~220℃
주입부 온도 : 240~300℃
검출기 온도 : 240~300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen 또는 helium (triadimefon이 약 2~3분에서 유출하는 유속으로 조정)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 triadimefon은 EBI계 살균제로서 대상 농약성분의 aryl-aryl기 간 bridge내 1개 탄소는 키랄성이므로 enantiomer가 존재하나 광학활성을 제외한 물리적 특성이 동일하므로 일상적 크로마토그래피에서는 분리되지 않고 1개의 peak로 나타난다.

- Triadimefon은 log P_{ow}가 3.1인 중성화합물이며 휘발성이 어느 정도 있는 것으로 알려

져 있으므로 기기분석법으로는 GLC가 적당하다. 분자 구조 내 triazole ring에 3개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 검출기는 NPD를 채용한다.

- 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이며 그 추출효율이 우수하다. Acetone 대신 acetonitrile을 대체 사용할 수 있으며 간섭물질의 추출량도 다소 적으나 끓는점이 높아 농축과정에서 보다 많은 시간이 요구된다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서는 전형적인 수용액-비극성 용매 간 액-액 분배법을 이용하며 이때 다량의 NaCl 수용액을 첨가하는 것은 수용액/유기용매 층간의 선명한 분리와 대상성분의 유기용매 층으로의 분배효율을 높이기 위한 것이다. 대상성분은 이러한 분배조건에서 매우 우수한 효율로 회수된다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하다.

- 응고법은 산성의 acetone 수용액에서 색소 및 유지 성분을 침전시키고 이를 Celite bed 상에서 여과, 제거하는 방법으로 채소 및 과실 검체 추출액 중 색소의 제거효과가 뚜렷하다. 응고법을 사용하기 위해서는 대상 화합물이 수십 mg/L 이상의 물에 대한 용해도를 나타내고 산성조건에서 비교적 안정한 특성을 나타내야 하는데 triadimefon은 물에 대한 용해도가 64 mg/L이며 산성조건에서 비교적 안정하므로 이러한 응고법의 적용이 가능하다.

- 흡착크로마토그래피법은 비이온성 중성 화합물에 대하여 잔류농약 분석법에서 최종적인 간섭물질 제거법으로 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 Florisil이 보편적인데 이 분석법에서도 검체 정제 효과가 뚜렷하다. 용출 분획에서 carotenoids 등 황색 색소가 다소 용출되나 GLC/NPD 상에서 큰 문제는 되지 않는다.

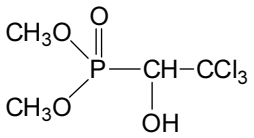
- Triadimefon은 GLC 분석 대상농약 중 휘발성이 다소 낮은 편이며 극성이 어느 정도 있으므로 packed column을 사용할 경우 tailing 현상이 발생하거나 재현성이 다소 불량할 가능성이 있다. 따라서 충분히 conditioning된 비교적 짧은 길이의 column을 사용, 머무름 시간을 빠르게 조절하는 것이 유리하다. 분석법의 검체 정제과정이 충분하므로 대부분 검체에서 간섭물질은 관찰되지 않는다. 한편 보다 우수한 분리능을 위

해서는 capillary column을 사용하기를 추천한다. 즉, 내경 0.53 mm, 길이 15~30 m 정도의 5% phenylsiloxane/95% methylsiloxane (DB-5, SPB-5 등)이 liquid phase로 되어 있는 column을 적절한 조건으로 사용하면 triadimefon은 매우 sharp한 대칭형 peak로 나타난다. 또한 packed inlet을 이용, 검체 전량을 column에 주입하는 방법도 가능하므로 비교적 용이하게 우수한 재현성을 얻을 수 있다. 아울러 이러한 capillary column이 부착된 GLC/NPD의 조합을 사용할 경우 분리능과 선택성이 우수하므로 채소 및 과실 검체에 대해서는 응고법에 의한 검체 정제과정을 생략할 수 있다.

8.4.22 잔류농약 분석법 4.1.4.36

트리클로르폰(Trichlorfon)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : trichlorfon
화학명 (IUPAC) : dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate
분자식 : $C_4H_8Cl_3O_4P$
평균분자량 : 257.4
질량분석 시 M+질량 : trichlorfon 255.9, trifluoroacetyl-trichlorfon 351.9
Log P_{ow} : 0.43 (20℃)
물에 대한 용해도 : 120,000 mg/L (20℃)
증기압 : 0.5 mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

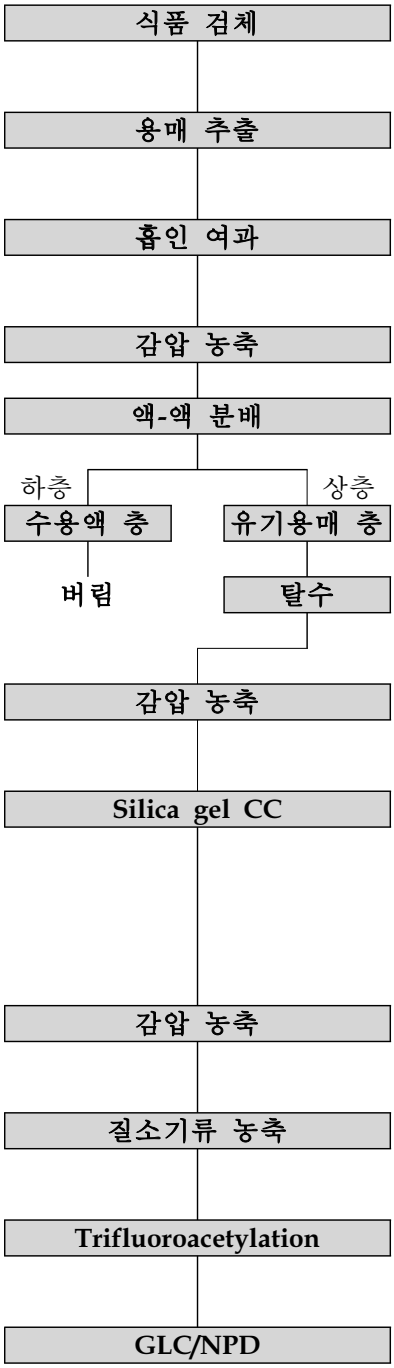
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)*					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Trichlorfon	0.002	-	0.05~2.0	0.5~2.0	-	0.1~0.5	-

* Dichlorvos 기준.

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축하고 농축 수용액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가한 후 ethyl acetate로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 추가 정제한 후 trifluoroacetylation하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 검체 20g, 곡류 및 콩류검체는 증류수 20mL을 가하여 10분간 습윤화
- Acetone 100mL
- 1시간 동안 진탕 추출 (200rpm)
- 여분의 acetone 30mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침
- 40℃이하에서 acetone 증발
- 포화 NaCl 수용액 10mL + 증류수 90mL 첨가
- Ethyl acetate 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해
- Silica gel 60 (70~230mesh), 5g (내경 15mm)
- *n*-Hexane 25mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 100mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (50/50) 100mL → 받음
- 40℃이하에서 증발 건고
- Acetone 10mL에 재용해
- Acetone 검체용액 중 1mL (시료 2g 해당량)를 취함
- 40℃이하에서 증발 건고
- Acetone에 녹인 1% pyridine 용액 950μL에 재용해
- MBTFA 50μL 첨가 후 70℃에서 2시간 동안 방치

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 50℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 250℃까지 15℃/min의 비율로 온도를 상승시키고 3분간 유지한다.
주입부 온도 : 240℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10 mL/min
메이크업 가스 및 유량 : nitrogen, 20 mL/min
연료가스 및 유량 : hydrogen 및 air 유량을 검출기 최적조건으로 조정
주입량 : 2 μL, split (1:10)
분석법의 정량한계 : 0.03 mg/kg

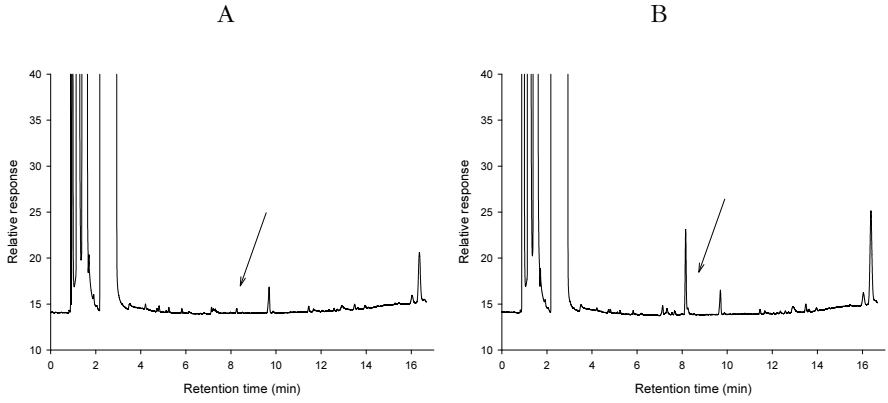


그림 1. 사과 검체 중 trichlorfon 분석 크로마토그램
A, 무처리 시료; B, 0.25 mg/kg 처리 시료

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)

칼럼온도 : 50℃에서 검체를 주입하고 3분간 유지한 후 15℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 240℃에서 2분간 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1 mL/min
주입량 : 1 µL, splitless
이온화 : 전자충격 (electronic impact, EI), 70 eV
분자량 범위 (*m/z*) : 80~300

표 1. 기체크로마토그래프·질량분석기 분석을 위한 이온

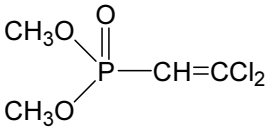
분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Trichlorfon	10.3	352(유도체)	109, 208

6) 분석법 해설

- Trichlorfon은 해충의 신경자극전달 과정 중 cholinesterase를 저해함으로써 살충작용을 나타내는 전형적인 유기인계 살충제이다. 다양한 유기인계 살충제 구조 중 phosphate 계통으로 일반적으로 많이 사용되는 phosphorothionate 계통과는 방제 및 물리화학적 특성이 상당히 다르다. 즉, log P_{ow}가 0.43의 극성 화합물이며 물에 대한 용해도도 120 g/L로 높음에도 불구하고 짧은 잔류성으로 인하여 침투성이 없는 속효성 접촉독/식독제이다. 잔류분 정의는 작물 및 환경 중에서 빠르게 분해되고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 유효성분인 모화합물에 한정된다.

- Trichlorfon은 극성 화합물임에도 불구하고 분자 내에 특별한 발색단이나 형광단을 보유하고 있지 않으므로 적절한 검출기가 없어 HPLC로 분석하는 것이 곤란하다. 따라서 일반적으로 GLC를 이용하여 분석하며 분자 내에 인 원자를 함유하고 있는 점을 이용하여 NPD나 FPD를 검출기로 사용한다.

- GLC를 이용하여 분석하는데 있어 가장 큰 문제점은 trichlorfon이 열분해에 취약하여 일부 또는 대부분이 다른 유기인계 농약성분인 dichlorvos로 전환된다는 것이다. 이러한 전환 비율을 일정하게 유지하여 분석하는 방법도 보고된 바 있으나 기기조건 및 검체에 따라 재현성에 상당한 편차가 발생한다. 따라서 제시한 분석법에서는 열분해가 되는 분자 부분을 유도체화, dichlorvos로의 전환을 방지함으로써 분석의 일관성을 확보한다.

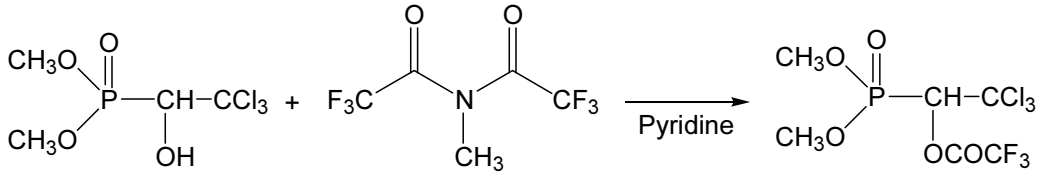


Dichlorvos

- 식품 검체로부터 trichlorfon을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 극성을 나타내는 비해리 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되므로 추출효율에 대한 문제는 없다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행하는데 trichlorfon은 극성이 너무 커 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 직접 비극성 유기용매로 분배하는 방법으로는 분배효율이 불량하다. 따라서 추출액 중 acetone을 증발시켜 제거하고 농축 수용액의 이온강도를 높인 후 유기용매로 분배한다. Dichloromethane으로는 분배 효율이 약 70%로 낮고 보다 극성이 큰 ethyl acetate로 분배하여야 전량 회수된다.

- 분배 추출액의 최종 정제는 잔류농약분석법에서 가장 보편적으로 사용하는 흡착크로마토그래피법을 이용한다. Trichlorfon의 극성이 큰 점을 감안하여 흡착제로는 흡착력이 다소 약한 silica gel을 사용한다. 용출체계는 용출 강도를 달리하여 세척 및 용출 분획으로 구분함으로써 간섭물질을 최대한 제거한다.

- 유도체 형성반응은 분자 내 -NH기나 -OH기에 보편적으로 적용되는 perhaloacylation 반응이다. 반응시약인 *N*-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA)는 primary 및 secondary amine에는 신속히 반응하나 alcohol 류에는 반응속도가 완만하므로 반응시간을 늘려 충분히 완결시킨다.



Trichlorfon　　Trifluoroacetyl-trichlorfon

그림 2. Trichlorfon의 trifluoroacetylated derivative 형성 반응

- 생성된 trifluoroacetylated trichlorfon은 log P_{ow}가 약 1.7로 예상되며 모화합물보다 극성이 낮으므로 GLC 상에서의 크로마토그래피 특성이 우수한 편이다. 열분해를 최소화하

기 위하여 5% phenylsilicone이 함유된 methylsilicone 계통 (DB-5 등)의 비극성~중간 극성인 liquid phase를 적용, 머무름 시간을 단축시킨다. 검출기로는 NPD를 제시하였으나 선택성과 안정성이 보다 우수한 FPD를 사용하여도 무방하다. 감도는 NPD에 비하여 FPD가 다소 낮다.

- 제시한 분석법의 정량한계는 0.03 mg/kg이고 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 78~115%와 10% 미만으로 농산물 검체의 잔류허용기준에 대하여 적부판정을 정확히 수행할 수 있다.

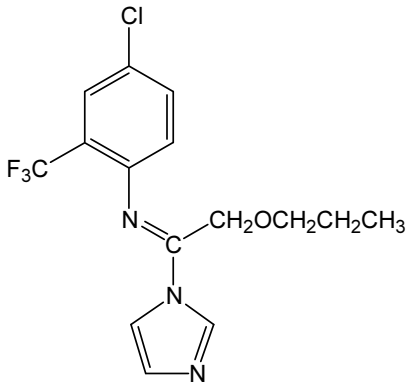
표 2. 농산물 검체 중 회수율

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	고추	배추	대두
Trichlorfon	0.025	104.7±6.7	105.4±8.3	112.8±1.8	91.7±1.8	100.2±5.6
	0.25	95.5±6.1	107.8±7.5	95.0±3.5	114.6±4.2	103.6±5.4
	2.5	83.1±3.0	113.2±4.1	77.6±2.2	90.9±4.4	80.7±1.6

8.4.23 잔류농약 분석법 4.1.4.37

트리프루미졸(Triflumizole)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : triflumizole
화학명(IUPAC) : (*E*)-4-chloro-α,α,α-trifluoro-*N*-(1-imidazol-1-yl-2-propoxyethylidene)-*o*-toluidine
분자식 : $C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$
평균분자량 : 345.7
질량분석 시의 M+질량 : 345.1
Log P_{ow} : 5.06 (pH 6.5), 5.10 (pH 6.9), 5.12 (pH 7.9)
물에 대한 용해도 : 12,500 mg/L
증기압 : 0.186 mPa (25℃)
pKa : 3.7, 약염기성

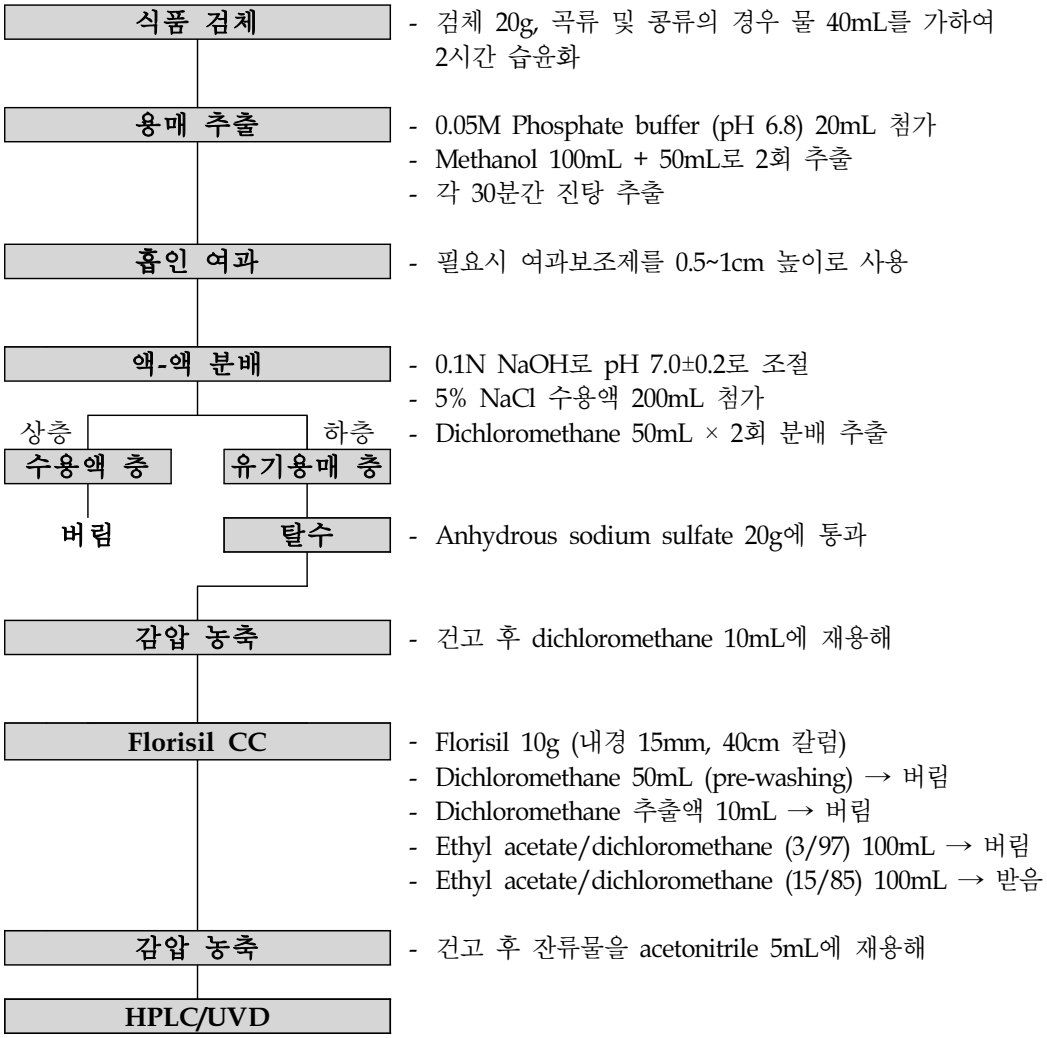
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Triflumizole	0.0185	0.5	1.0~2.0	0.05~7.0	0.05	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 균질 검체에 50 mM sodium phosphate buffer 수용액 (pH 6.8)을 첨가한 후 methanol을 가하여 진탕 추출하고 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 산도를 중성으로 조절하고 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.0 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/0.01 M carbonate buffer/물, 4% H_3PO_4 함유 (pH 9.0)
(70/10/20, v/v/v)
이동상 유량 : triflumizole이 약 10분에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : UV 236 nm
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 triflumizole은 과실 및 채소류에 광범위하게 사용되는 대표적 EBI계 살균제로서 분자 내의 imidazole ring 질소원자가 약하게 해리하는 특성을 나타내는 약염기성 화합물이다.

- 대상 화합물은 log P_{ow}가 5.1인 비극성 화합물이며 증기압도 어느 정도 있으므로 GLC/NPD로 분석 가능할 것으로 기대되나 약염기성 특성으로 인하여 GLC 상에서는 tailing 현상이 빈번히 발생하고 재현성도 열등하다. 따라서 분석기기로는 HPLC가 적절하다. Triflumizole은 자외선 영역 236 nm에서 흡광계수 2.6×10^4 $cm^{-1}M^{-1}$의 강한 흡수를 나타내므로 검출기로는 자외부흡광검출기를 이용한다.

- 추출 용매로는 triflumizole의 이온화를 pH 조절에 의하여 억압한 후 중성 화합물에 대한 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 methanol, acetone 및 acetonitrile 중 methanol을 사용한다. Methanol을 사용할 경우 극성 물질의 추출량은 다소 많아지나 유지나 비극성 간섭물질의 추출량이 acetone이나 acetonitrile에 비하여 적은 장점이 있다. Triflumizole은 짝산의 pKa가 3.7로 알려진 약염기성 화합물이므로 검체 중 pH를 5.7 이상으로 조절하면 99% 이상이 비해리성 중성화합물 상태가 된다. 과실 및 채소 검체 중에는 액성이 약산성인 경우가 많으므로 buffer 용액을 첨가하여

일정한 pH 범위로 조절하는 것이 유리하다.

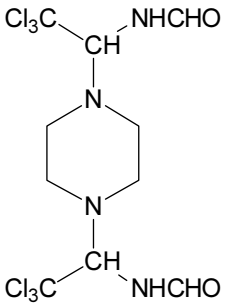
- 액-액 분배법에서도 수용액 층의 pH를 7.0으로 조절하여 triflumizole의 이온화를 억압함으로써 dichloromethane 층으로의 분배를 확실하게 한다. Triflumizole은 약염기성 화합물임에도 불구하고 Florisil column에서 비교적 용출이 용이하여 acetone/*n*-hexane 혼합액 조합으로 세정 및 용출에 의한 정제과정을 성공적으로 수행할 수 있다.

- Triflumizole은 염기성이 약하므로 HPLC에서 이동상으로 acetonitrile/water 혼합액을 사용하여도 sharp한 peak로 나타난다. 그러나 column 온도를 40℃로 사용하거나 검체 용액 주입 시에는 간혹 일부가 이온화되어 peak 모양이 불량해지는 현상이 관찰된다. 따라서 확실한 이온억압을 위하여 acetonitrile/완충용액을 사용하는 것이 필요하다. 완충용액은 carbonate buffer (pH 9.0) 대신 20 mM 정도의 phosphate buffer를 사용하여도 무방하며 pH는 7.0 이상으로 조절하면 확실한 이온억압 효과를 거둘 수 있다.

8.4.24 잔류농약 분석법 4.1.4.38

트리포린(Triforine)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : triforine
화학명 (IUPAC) : *N,N* ‘-[piperazine-1,4-diylbis[(trichloromethyl)methylene]] diformamide
분자식 : $C_{10}H_{14}Cl_6N_4O_2$
평균분자량 : 435.0
질량분석 시의 M+질량 : 431.9
Log P_{ow} : 2.2 (20℃)
물에 대한 용해도 : 12.5 mg/L (20℃)
증기압 : 80 mPa (25℃)
pKa : 10.6 (짝산)

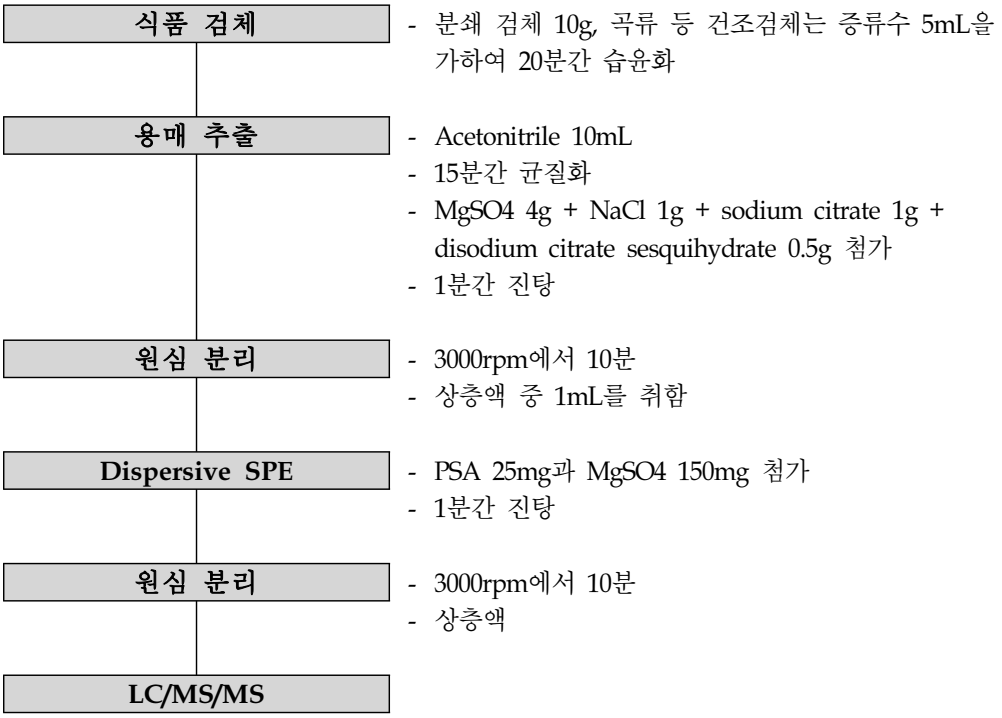
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Triforine	0.02	0.01~0.1	0.5~5.0	0.3~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물 검체에 acetonitile을 가하여 고속 마쇄 추출한 후 $MgSO_4$, NaCl 및 citrate buffer를 첨가한 후 원심분리한다. 상층액 중 일부를 취하여 약음이온교환 수지와 $MgSO_4$를 첨가한 후 재차 원심분리하고 상층액을 취하여 LC/MS/MS로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : LC-MS-MS (triple quadrupole형)
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 2.6 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 혼합액 (0.1% formic acid 함유)을 30/70 (v/v)에서 2분간 정치한 후 90/10 (v/v)로 2분간 직선적으로 농도 구배한 후 1분간 유지.
이동상 유량 : 0.3 mL/min
검체 주입량 : 10 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
검출이온 (*m/z*) : precursor ion 435, product ion 390
분석법의 정량한계 : 0.005 mg/kg

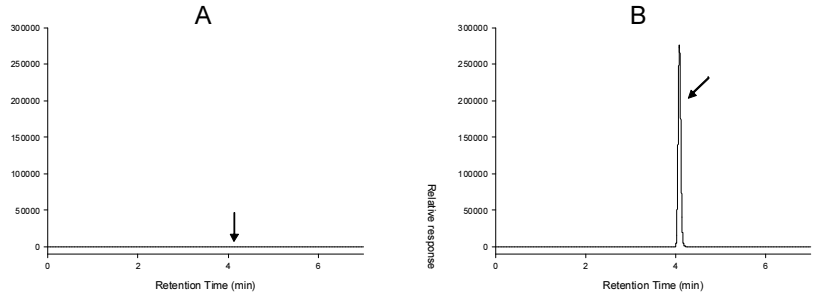


그림 1. 현미 검체 중 triforine 분석 크로마토그램

A, 무처리 시료; B, 0.1 mg/kg 처리 시료

6) 분석법 해설

- Triforine은 식물병원균 체내 세포막 형성과정 중 ergosterol 생합성과정을 저해, 살균작용을 나타내는 piperazine계 살균제이다. 침투성의 보호 및 치료용 약제로서 다양한 작물에 대해서 전면살포용으로 사용된다. Triforine은 모화합물이 유효성분이고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 모화합물 잔류량만으로 정의된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 2.2인 중간 극성의 화합물이나 짝산의 pKa가 10.6인 강염기성 화합물이다. 따라서 흡착 및 열분해 가능성으로 인하여 크로마토그래피 특성이 불량하므로 직접 GLC로 분석하기는 어렵다. HPLC법을 이용하여 분리는 가능하나 뚜렷한 발색단이나 형광단을 함유하고 있지 않으므로 일반적 검출기로는 감도가 낮아 잔류분석이 불가능하다. 따라서 제시한 분석법에서는 질량분석기를 검출기로 사용한 LC-MS-MS법을 이용한다.

- 추출 용매로는 중간~비극성 농약의 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 acetonitrile을 사용한다. 건조 검체인 곡류의 경우 수용성 유기용매 추출법에서 우수한 추출 효율을 얻기 위해서는 용매 추출 전에 미리 증류수를 가하여 일정 시간동안 방치, 습윤화 과정을 수행하는 것이 필수적이다. 본 분석법에서는 최종적으로 추출액의 부피를 조절하는 과정이 없으므로 정확한 양의 추출용매를 가하여야 한다. 또한 검체 중 또는 추가로 첨가하는 증류수에 의하여 추출액의 부피가 변하므로 다량의 중성 염을 첨가, acetonitrile과 수용액 층과의 분리를 확실히 하여야 한다. 아울러 검체량에 비하여 추출용매의 양이 상대적으로 작으므로 검체 추출물에 의한 산도변화를 최소화하기 위하여 citrate buffer를 사용하여 pH 5~5.5 범위를 유지한다.

- 원심분리에 의하여 acetonitrile 층과 고형분/수용액의 혼합물 층을 분리한 후 상층의 acetonitrile 층 중 일부를 취하여 SPE용 PSA (primary-secondary amine) 약음이온교환수지와 magnesium sulfate를 첨가, 산성 간섭물질과 잔존 수분을 제거한다. PSA는 aminopropyl 수지와 그 작용이 유사하나 secondary amine 작용기의 추가로 이온교환능이 더 높은 장점이 있다. LC-MS-MS에 의한 분석은 그 선택성이 뛰어나므로 비교적 간단한 정제과정만으로도 기기분석이 가능하다.

- LC-MS-MS 분석은 selected-decomposition (reaction) monitoring (SDM 또는 SRM) 방법을 사용한다. 즉, 최적 이온화조건에서 첫 번째 quadrupole에서 precursor ion을 선정하고 두 번째 ion-focusing을 거쳐 세 번째 quadrupole에서 product ion을 선정하며 각 선발된 ion과 동시에 일치하는 ion만을 검체 중에서 검출함으로써 선택성을 극대화한다. Triforine의 경우 염기성 화합물이므로 소량의 formic acid를 protonation enhancer로서 첨가한 이동상 조건에서 electrospray ionization법에 의하여 분자이온이 용이하게 관찰된다. Triforine은 분자 내에 염소원자 6개를 함유하고 있으므로 isotope abundance에 따라 $(M+H)^+$:$(M+2+H)^+$:$(M+4+H)^+$가 약 52:100:80의 비율을 나타내며 이 중 강도가 가장 강한 $(M+2+H)^+$ ion (m/z 435)을 precursor ion으로 선정한다. Product ion은 -NHCHO기가 이탈된 fragment ion이 base peak로서 관찰되는데 여전히 염소원자 6개를 함유하고 있으므로 $(A)^+$:$(A+2)^+$:$(A+4)^+$가 52:100:80의 비율을 나타내며 이 중 강도가 가장 강한 $(A+2)^+$ (m/z 390)를 product ion으로 선정한다. 또한 -$CH(CCl_3)NHCHO$가 추가로 이탈된 fragment ion도 상당한 강도로 관찰되는데 염소원자 3개를 함유하고 있으므로 $(A+2)^+$ (m/z 215)를 별도로 선정할 수 있다. LC-MS-MS 분석 시에는 검체 중 추출성분에 의하여 대상 성분의 이온화 억압 또는 증강이 관찰되므로 matrix-matched calibration 법에 준하여 정량하여야 한다.

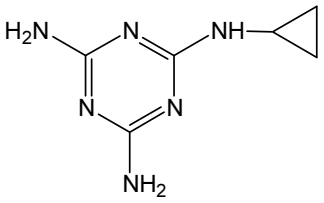
표 1. 농산물 검체 중 회수율

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	감귤	고추	배추
Triforine	0.005	76.8±7.3	76.7±7.5	70.4±2.0	85.1±0.4	86.0±0.8
	0.1	92.3±2.3	98.3±1.6	78.3±0.7	93.3±0.6	72.7±2.1
	2.0	116.9±0.9	103.8±1.5	103.8±0.9	113.6±9.4	88.3±1.5

8.4.25 잔류농약 분석법 4.1.4.40

싸이로마진(Cyromazine)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : cyromazine
화학명 (IUPAC) : *N*-cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine
분자식 : $C_6H_{10}N_6$
평균분자량 : 166.2
질량분석 시의 M+질량 : 166.1
Log P_{ow} : -0.061 (pH 7.0)
물에 대한 용해도 : 13000 mg/L (pH 7.1, 25℃)
증기압 : 4.48×10^{-4} mPa (25℃)
pKa : 5.22, 약염기

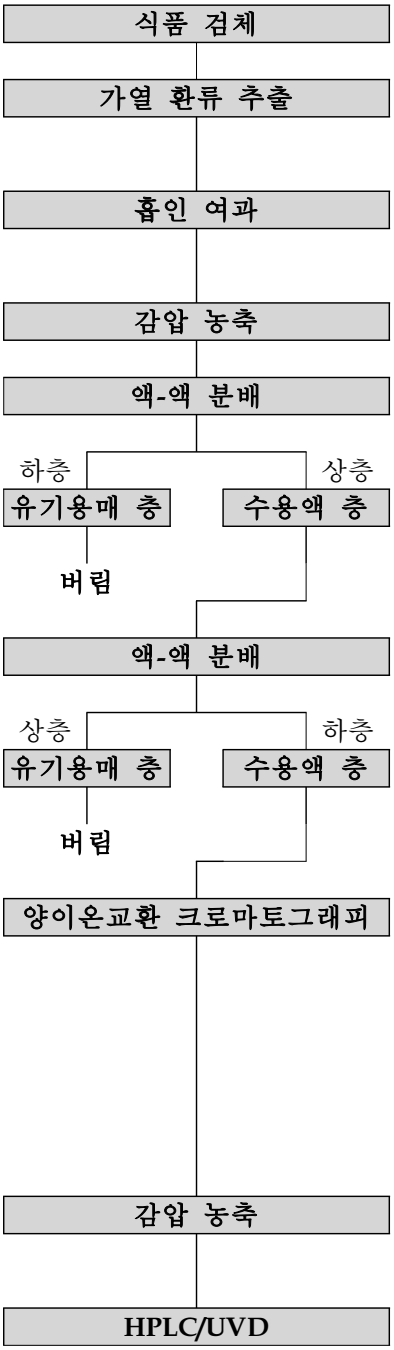
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cyromazine	0.06	-	-	0.3~0.5	-	-	-

2) 분석법 개요

농산물 검체에 methanol/증류수 (90/10) 혼합액을 가하고 가열 환류, 추출한다. 추출액을 감압 농축하여 methanol을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 산성화한 후 dichloromethane으로 분배하여 씻어버린다. 수용액 층을 양이온교환 크로마토그래피에 의하여 최종 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



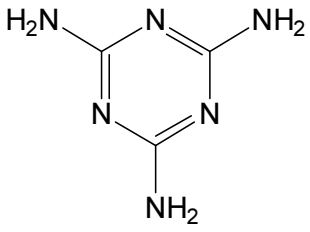
- 검체 20g
- Methanol/증류수 (90/10) 200mL 첨가
- 70℃에서 2시간 동안 가열, 환류
- glass-fiber filter 사용
- 여과액 50mL 분취 (시료 5g 해당량)
- 40℃에서 methanol 증발
- 0.1N HCl 수용액 100mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출하여 버림
- *n*-Hexane 50mL로 분배 추출하여 버림
- Dowex 50W-X4 (200~400mesh) 2mL (내경 0.7cm)
- 증류수 10mL로 pre-conditioning → 버림
- 검체액 100mL → 버림
- Acetonitrile/water (90/10) 50mL → 버림
- Methanol/water (90/10) 50mL → 버림
- Methanol 10mL → 버림
- NH_4OH /methanol (5/95) 20mL → 받음
- 40℃에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 methanol 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : Zorbax-NH_2 (4.6 mm i.d. × 250 mm) 및 LiChrosorb-NH_2
(4 mm i.d. × 250 mm)
이동상 : acetonitrile/물 (90/10, v/v)
검출기 파장 : UV 214 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Cyromazine은 곤충의 탈피작용을 저해하는 IGR (insect growth regulator) 계통의 살충제로서 주로 채소 및 서류 등에 사용되고 있다. Cyromazine은 식물체내에서 신속히 대사되어 melamine을 주요 대사산물로 생성한다. 본 분석법에서는 모화합물만을 분석대상으로 하고 있으나, 동일한 시료 조제과정으로 HPLC 분석 과정을 다소 변경할 경우 양 화합물 모두를 동시에 분석할 수 있다.



Melamine

- Cyromazine은 log P_{ow}가 －0.061로 극성이 높으며 짝산의 pKa가 5.22인 약염기성 화합물이다. 따라서 GLC로는 직접 분석이 불가능하므로 자외흡광 특성이 그다지 우수하지 않음에도 불구하고 HPLC로 분석한다.

- 추출은 methanol/증류수의 9:1 혼합액을 추출용매로 사용하여 가열 환류 추출하며, 추출액 중 일부를 취하여 액-액 분배에 적용한다. 대상 성분이 약염기성이면서 극성이 높은 특성을 이용하여 수용액을 산성화하여 이온화시키고 dichloromethane으로 분배 세척하는 방법을 사용함으로써 유기성 간섭물질을 효과적으로 제거한다.

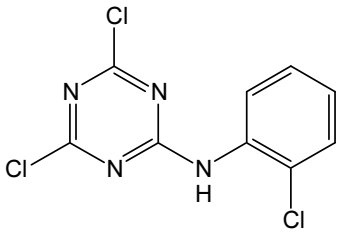
- 수용성 분배액의 최종정제는 양이온교환 크로마토그래피를 이용한다. 즉, 산성인 분배액 중 양이온 해리상태로 존재하는 화합물을 양이온교환수지에 일단 포집하고, 유기용매로 차례로 세척하여 간섭물질을 제거한 후 ammonium 양이온이 함유된 약알칼리성 용액으로 대상 성분을 용출시킨다.

- Cyromazine은 극성이 너무 높아 일상적 C_{18} column에서는 충분히 retention되지 않으므로 HPLC 분리 양식은 HILIC (hydrophilic interaction chromatography) mode를 사용한다. 즉, polar한 liquid phase로 충전된 column (NH_2 column)을 채용하고 nonpolar한 mobile phase를 사용함으로써 분석 대상성분이 polar liquid phase에 의하여 retain되도록 조절한다. Cyromazine의 흡광파장은 214 nm로 짧은 자외영역이므로 시료 추출물에 의한 간섭을 최소화하기 위하여 가급적 머무름 시간을 10분 이상으로 길게 설정한다. 또한 HPLC 및 검출기의 변동성이 심하므로 기기 작동의 안정성에 유의하면서 분석을 수행한다.

8.4.26 잔류농약 분석법 4.1.4.41

아닐라진(Anilazine)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : anilazine
화학명 (IUPAC) : 4,6-dichloro-*N*-(2-chlorophenyl)-1,3,5-triazin-2-amine
분자식 : $C_9H_5Cl_3N_4$
평균분자량 : 275.5
질량분석 시의 M+질량 : anilazine 274.0, dimethoxyanilazine 266.1
Log P_{ow} : 3.02 (pH 7, 20℃)
물에 대한 용해도 : 8 mg/L (20℃)
증기압 : 8.2×10^{-4} mPa (25℃)
pKa : -

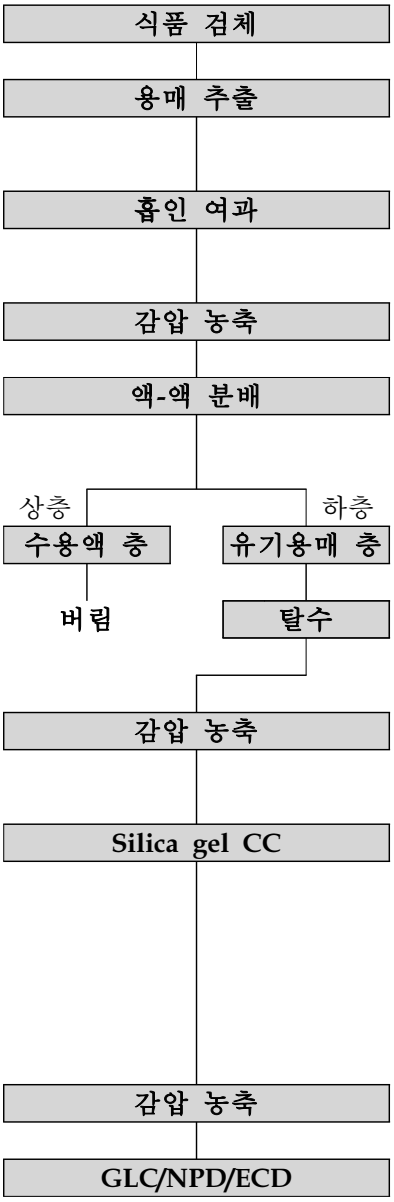
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Anilazine	0.1	0.1~0.2	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

농산물 검체에 methanolic NaOH 용액을 가하여 anilazine을 dimethoxyanilazine으로 변환, 추출한다. 추출물을 여과하고 methanol을 제거한 후 NaCl 수용액으로 희석한 후 acetone/dichloromethane (20/80) 혼합액으로 분배 추출한다. 추출액을 감압 농축하고 silica gel 흡착 크로마토그래피에 의하여 최종 정제한 후 GLC로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 50g
- 0.5N methanolic NaOH 용액 200mL
- 1시간 방치 후 3분간 고속 마쇄 추출
- Glass-fiber filter 사용
- Methanol 100mL로 잔사를 세척하여 합침
- 55℃에서 methanol 증발
- 15% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Acetone/dichloromethane (20/80) 150mL + 100mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 감압 농축 건고
- Toluene 10mL에 재용해
- Silica gel 60 (70~230mesh) 15g (내경 15mm)
- Toluene 50mL로 습식 충전 → 버림
- 검체액 10mL → 버림
- Cyclohexane 40mL → 버림
  Ethyl acetate/cyclohexane (15/85) 50mL → 버림
  Ethyl acetate/cyclohexane (30/70) 100mL → 받음
- 40℃에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 ethyl acetate 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : glass column (2~3 mm i.d. × 1~2 m)
capillary column (0.2, 0.32 및 0.53 mm i.d. × 30 m)
칼럼충전제 : glass column (100% methyl siloxane, 50% phenyl 50% methyl siloxane, 50% cyanopropylphenyl 50% methyl siloxane, 2% DEGS (stabilized))
capillary column (고정상액을 화학결합 또는 cross-link 코팅)
칼럼온도 : 100℃에서 2분간 유지하고 20℃/min의 비율로 230℃까지 상승시킨 후 20분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen을 적절하게 조절한다.
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Anilazine은 triazine 계통의 비침투성 보호용 살균제로서 탄저병을 위시하여 과실, 채소 및 곡류에 발생하는 각종 병해를 방제하는데 사용된다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Anilazine은 triazine 제초제와 유사한 화합물이므로 GLC로 분석이 가능할 것으로 판단되나 triazine ring에 결합된 염소 원자의 취약성, amino기의 해리성 등으로 인하여 기기분석 중 흡착 및 열분해 현상이 일어나므로 재현성이 불량하다. 따라서 본 분석법에서는 이러한 염소 원자를 methoxy기로 대체, dimethoxyanilazine의 형태로 분석한다.

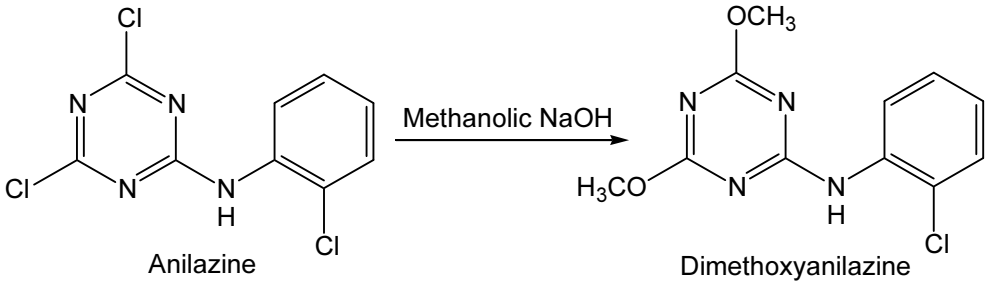


그림 1. Anilazine의 탈염소화에 의한 dimethoxyanilizine 형성 반응

- 염소원자를 methoxy기로 대체하는 것은 그림 1의 반응식에 나타낸 바와 같이 methanolic NaOH 용액 중에서 용이하게 일어난다. Anilazine의 log P_{ow} 값은 3.02이고 dimethoxyanilazine도 유사한 비극성을 나타낼 것으로 예상된다.

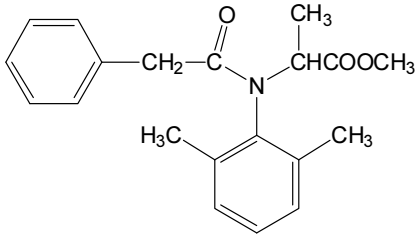
- 액-액 분배는 알칼리성 조건에서 amino기의 해리성을 억압하여 비극성 용매로 분배, 추출한다. 분배 전에 methanol을 증발 제거하고, NaCl 용액을 첨가함으로써 분배 효율을 향상시킨다. 분배액은 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하는데 세척 및 용출용 용매를 별도로 설정하여 간섭물질을 효과적으로 제거한다.

- 기기분석법은 GLC를 이용하는데 앞서 언급한 바와 같이 재현성이 불량할 수 있으므로 분리용 column은 가급적 흡착 및 열분해성이 적은 capillary column을 사용하는 것이 좋다. 또한 내경 0.53 mm의 column을 등온조건으로 유지하면서 직접주입법을 사용하면 분석의 재현성 확보에 보다 유리하다.

8.4.27 잔류농약 분석법 4.1.4.42

베나락실(Benalaxyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : benalaxyl
화학명 (IUPAC) : methyl *N*-phenylacetyl-*N*-2,6-xylyl-DL-alaninate
분자식 : $C_{20}H_{23}NO_3$
평균분자량 : 325.4
질량분석 시의 M+질량 : 325.2
Log P_{ow} : 3.54 (20℃)
물에 대한 용해도 : 28.6 mg/L (20℃)
증기압 : 0.66 mPa (25℃)
pKa : -

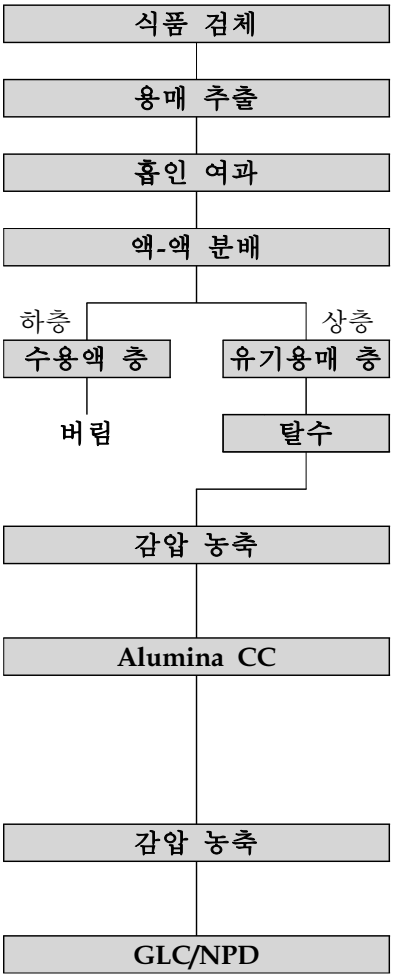
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Benalaxyl	0.07	-	-	0.05~1.0	-	-	-

2) 분석법 개요

농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 분액 여두에 옮긴 후 NaCl 수용액을 첨가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 분배액을 감압 농축하고 alumina column chromatography에 의하여 최종 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 30g
- Acetone 100mL로 15분간 마쇄 (3000rpm) 추출
- Acetone 50mL × 2로 잔사를 세척하여 합침
- 증류수 80mL + 포화 NaCl 수용액 20mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 감압 농축 건고
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 2mL에 재용해
- Alumina 90 (70~230mesh) 20g (내경 17mm)
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 100mL로 습식 충전 → 버림
- 검체액 2mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 100mL → 받음
- 40℃에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : glass column (2~5 mm i.d. × 1~2 m)
capillary column (0.2, 0.32 및 0.53 mm i.d. × 15 m, 1.5 μm)
칼럼충전제 : glass column (100% methyl siloxane, 50% phenyl 50% methyl siloxane 및 20% phenyl methyl siloxane (OV-7) 또는 이와 동등한 것

capillary column (고정상액을 화학결합 또는 cross-link 코팅)
칼럼온도 : 230~260℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen 및 helium을 적절하게 조절한다.
연료가스 : hydrogen (30 mL/min) 및 air (300 mL/min)
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Benalaxyl은 주로 채소류의 병해 방제에 사용하는 phenylamide계의 침투성 살균제이다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Benalaxyl은 log P_{ow}가 3.54인 비극성 화합물이고 증기압이 0.66 mPa (25℃)로 어느 정도 있으며 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. Alaninate moiety에 있는 carbon은 chiral성이므로 enantiomer가 존재하나 일상적 GLC column에서는 분리되지 않고 하나의 peak로 나타난다. 검출기로는 분자 내에 질소 원자를 1개 함유하고 있으므로 NPD를 사용하는데 감도가 다소 낮으므로 시료 용액의 농축과정이 필요하고 이에 따른 간섭물질의 적절한 제거가 분석법의 관건이다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 비극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 이를 식염수로 희석한 후 *n*-hexane으로 분배하는데 benalaxyl은 극성이 낮으므로 *n*-hexane으로도 충분히 분배 추출되고 극성이 높은 불순물이 제거된다.

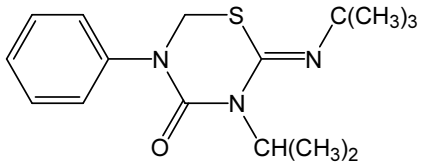
- 최종적으로 분배 추출액은 alumina 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. Benalaxyl은 비교적 용출이 빠르므로 세척과정 없이 1개의 용출용매로 회수하는데 GLC column에서의 머무름 시간이 길게 나타나므로 간섭물질의 혼입이 상대적으로 적다.

- 제시된 GLC column은 비극성~중간 극성의 liquid phase인데 benalaxyl은 liquid phase에 상관없이 대칭형의 sharp한 Gaussian peak를 나타낸다. 다만 시료 추출액 중 간섭물질 혼입에 유의하여 최적의 분리조건을 선정, 사용한다.

8.4.28 잔류농약 분석법 4.1.4.45

부프로페진(Buprofezin)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : buprofenzin
화학명 (IUPAC) : (*Z*)-2-*tert*-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-1,3,5-thiadiazinan-4-one
분자식 : $C_{16}H_{23}N_3OS$
평균분자량 : 305.4
질량분석 시의 M+질량 : 305.2
Log P_{ow} : 4.93 (pH 7)
물에 대한 용해도 : 0.387 mg/L (20℃), 0.46 mg/L (pH 7, 25℃)
증기압 : 4.2×10^{-2} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

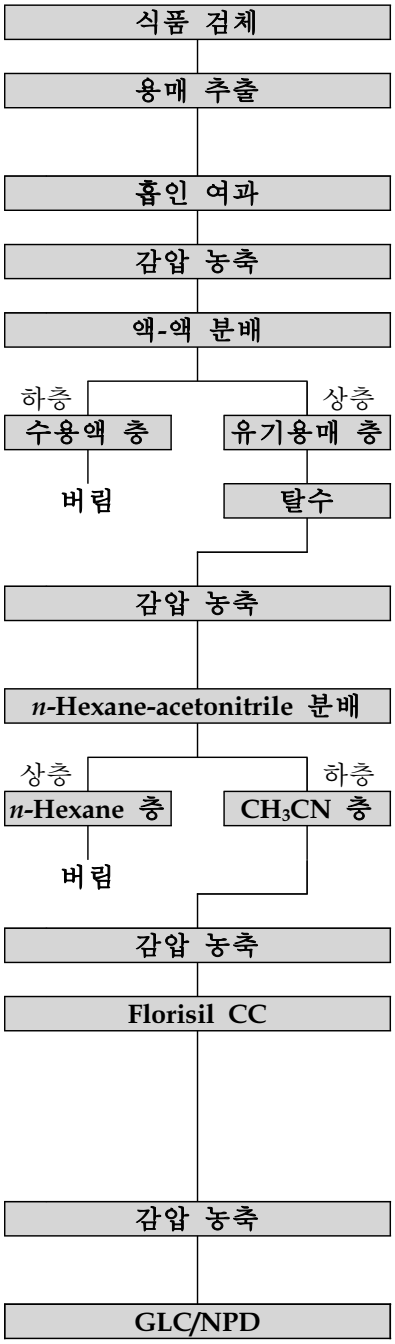
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Buprofenzin	0.01	0.5	0.5~3.0	0.05~5.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 농축하고 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 비극성 성분을 제거한 후 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 20g
- Acetone 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetone 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 40℃에서 약 50mL로 농축.
- 5% NaCl 수용액 100mL 첨가
- *n*-Hexane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 30mL에 재용해
- Acetonitrile 30mL × 2회 분배 추출
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해
- SPE-Florisil 1g 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 20g 해당량) → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 20mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (30/70) 30mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 15 m, 1 μm)
칼럼온도 : 210℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen 및 helium을 적절하게 조절한다.
주입량 : 2 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Buprofezin은 해충의 chitin 생합성 저해나 탈피호르몬 교란에 의하여 살해효과를 나타내는 살충/살응애제이다. 살충/살응애 효과가 광범위하므로 벼를 위시한 곡류, 각종 과실, 채소류 및 서류에 널리 사용되고 있다.

- 대상성분은 log P_{ow} 4.9인 비극성의 비해리성 화합물이며 어느 정도의 휘발성이 있고 분자 내에 3개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 NPD 검출기가 부착된 GLC법으로 분석한다.

- 검체 조제과정은 log P_{ow} 4.9인 비극성의 비해리성 화합물이므로 유사한 특성의 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 검체 추출은 비극성 농약의 분석법에서 일반적으로 사용하는 acetone을 추출용매로 사용한다. 곡류 등 건조 검체의 경우, 소정의 추출 효율을 얻기 위해서 acetone 추출 전에 미리 30 mL의 증류수를 가하여 10분간 방치, 습윤화 과정을 수행하는 것이 필수적이다. 추출용매로는 acetone 및 acetonitrile 두 용매 모두 적용이 가능하지만, 고유지 검체의 경우 acetone에 비하여 극성이 높은 용매인 acetonitrile로 추출하면 검체가 잘 혼합되지 않고 응집되는 경향을 나타내는 단점이 있다. 분배는 acetone 추출액을 약 50 mL로 농축하여 대부분의 acetone을 날려 보낸 후 다량의 NaCl 수용액으로 희석하고 hexane으로 분배 추출하는 과정으로 수행하는데 분배효율은 95% 이상이다.

- 곡류 중에 함유된 유지 등 비극성 불순물을 제거하기 위하여 hexane-acetonitrile 분배법을 추가로 적용하며 이에 따라 Florisil 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제는 SPE 카트리지를 이용하여 간편하게 수행할 수 있다.

- Buprofezin은 비극성의 중성 화합물이나 분자 내에 imino기와 thiadiazinan ring을 포함하고 있고 휘발성이 비교적 낮아 머무름 시간이 짧지 않으므로 GLC column 내에서 흡착 또는 열분해의 가능성이 있다. 따라서 머무름 시간을 가급적 짧게 설정, 분석의 재현성을 확보한다. Buprofezin의 머무름 시간이 상대적으로 길고 NPD는 충분한 선택성을 가지고 있어 일부 색소가 포함된 최종 검체용액을 주입하여도 간섭의 문제점은 없다. 분석법의 정량한계는 0.05 mg/kg 수준이므로 허용기준이 낮은 농산물에 대하여는 최종 농축비율을 3 mL/20 g 검체로 조절한다.

- 잔류분의 재확인을 위하여 다음과 같은 LC/MS 조건을 사용한다. GLC 최종검체 용액 중 acetone을 질소 기류 하에서 날려 보내고 동량의 acetonitrile/water (75/25, v/v)에 재용해하여 주입한다. LC/MS에 의한 재확인 한계는 0.002 mg/kg 검체 수준이다.

측정기기 : LC-MS, single quadrupole-type
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (75/25, v/v), 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 45 V
Capillary temp. : 500℃
SIM ion (*m/z*) : 306
머무름 시간 : 9.4분

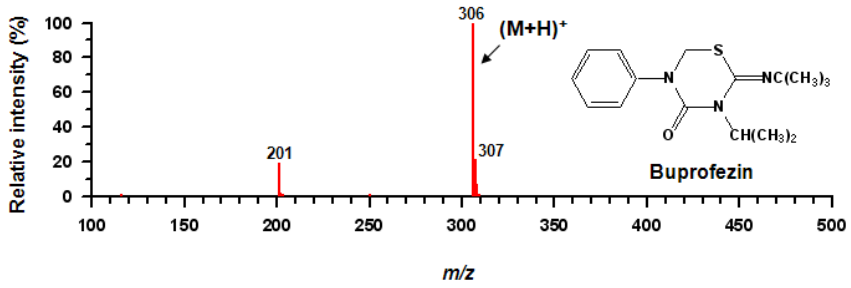
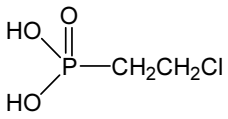


그림 1. Buprofezin의 ESI(+) spectrum.

8.4.29 잔류농약 분석법 4.1.4.46

에세폰(Ethephon)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : ethephon
화학명 (IUPAC) : 2-chloroethylphosphonic acid
분자식 : $C_2H_6ClO_3P$
평균분자량 : 144.5
질량분석 시 ethephon-dimethyl ester의 M+질량 : 172.0
Log P_{ow} : 〈-2.20
물에 대한 용해도 : 1,000,000 mg/L
증기압 : 〈0.01 mPa (20℃)
pKa : pKa1 2.5, pKa2 7.2

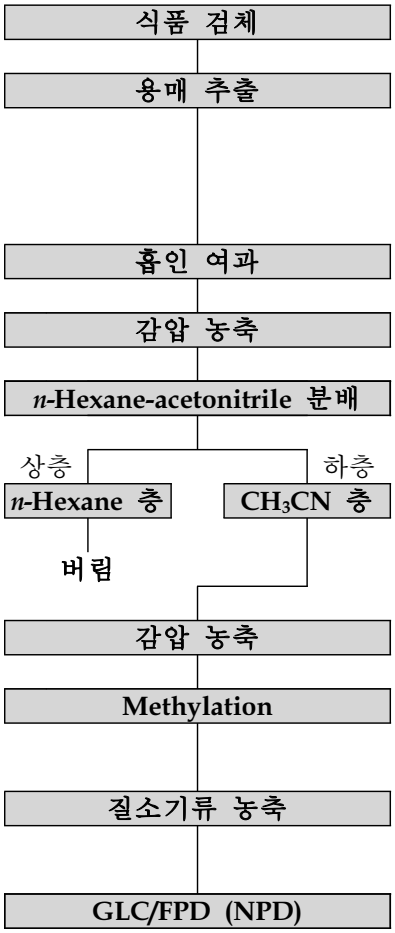
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Ethephon	0.05	2.0	0.5~5.0	0.1~3.0	-	0.5~2.0	-

2) 분석법 개요

검체를 산성화하고 다량의 anhydrous sodium sulfate를 가하여 검체 중 수분을 탈수한 후 ethyl acetate를 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과한 후 감압 농축하고 *n*-hexane-acetonitrile partition에 의하여 유지 등 비극성 불순물을 제거한다. 분배 추출물을 diazomethane으로 methylation하여 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- 1M Citric acid 수용액 1mL + 진한 HCl 0.5mL + anhydrous sodium sulfate 50g 첨가
- Ethyl acetate 100mL × 2회 추출
- 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 증발 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 30mL에 재용해
- Acetonitrile 30mL × 2회 분배 추출
- 건고 후 잔류물을 acetone 2mL에 재용해
- Trimethylsilyldiazomethane 1mL 첨가
- 실온에서 30분간 방치
- 질소기류 하 40℃에서 농축 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD)
질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 15 m, 1.0 μm)
칼럼온도 : 150℃, 등온조건 (필요에 따라 적절히 온도를 조절)
주입부 온도 : 250℃

검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen 또는 helium (ethephon-methyl ester가 약 5분에서 유출하는 유속으로 조정)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Ethephon은 과실 등의 숙성을 촉진하는 식물호르몬인 ethylene gas의 전구체 (前驅體, precursor) 화합물로서 과실 및 채소류의 식물생장조절제로 널리 사용된다. 약제는 살포 후 신속히 ethylene gas를 방출하고 대사되나 수확기에 근접하거나 수확 후 살포되는 경우가 많아 잔류량의 평가가 필요한 농약이다.

- 대상 화합물은 유기인계 화합물로서 극성이 매우 높은 산성의 수용성 화합물이다. 작은 분자량으로 인하여 어느 정도의 휘발성이 예상되나 GLC로 분석하기에는 너무 극성 및 이온성이 크다. 또한 흡광계수가 상당한 발색단이나 형광단이 분자 내에 존재하지 않으므로 HPLC로 분석하기에 적절한 검출기가 없다. 따라서 극성 및 해리성을 감소시키는 유도체를 형성, GLC로 분석하는 것이 보편적이며 검출기로는 분자 내에 인을 함유하고 있어 FPD나 NPD가 적절하다.

- 추출은 대상 화합물을 분해시키지 않고 이온화를 최대한 억압하기 위한 산성조건에서 수행하는데 검체에 건조제인 anhydrous sodium sulfate를 다량 첨가하여 탈수하고 물과 섞이지 않는 유기용매 중 가장 극성이 높은 ethyl acetate를 사용하여 직접 추출한다. 이 방법은 일단 추출한 후 분배하는 일상적 잔류분석과는 상이한 방법이다. 그 이유는 추출액 중 다량의 물이 존재하면 농축과정이 어렵고 또한 ethephon이 너무 극성이 높아 추출 후 효율적인 분배과정을 적용하기도 어렵기 때문이다. 추출액을 농축한 후 유도체 형성반응에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 간섭물질을 먼저 제거한다.

- 조 (組)정제된 추출액에 대하여 diazomethane 전구체인 trimethylsilyldiazomethane 시

약을 반응시켜 대상성분을 methylation 한다. 유도체 형성 반응은 그림 1에 나타낸 바와 같다.

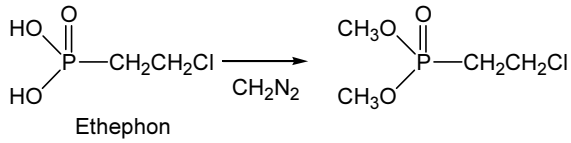


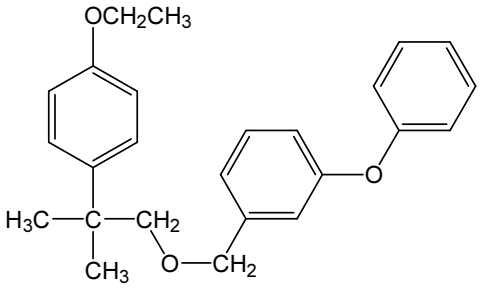
그림 1. Ethephondml methyl ester 형성 반응

- Ethephon의 해리 작용기를 methylation 하였다 하더라도 methyl 유도체는 여전히 극성이 높다. 따라서 GLC에서는 비극성 column을 사용하여 신속히 용출시키거나 극성이 높은 liquid phase를 사용하여야 tailing 현상이 최소화되고 화합물의 머무름 시간이 길어져 불순물과의 우수한 분리를 얻을 수 있다. 본 분석법에서는 형성된 유도체의 분해를 최소화하기 위하여 전자의 비극성 column을 사용한다. 사용 가능한 검출기인 NPD와 FPD 중에서는 선택성 및 안정성을 고려할 때 FPD를 우선적으로 추천한다.

8.4.30 잔류농약 분석법 4.1.4.47

에토펜프록스(Etofenprox)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : etofenprox
화학명 (IUPAC) : 2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether
분자식 : $C_{25}H_{28}O_3$
평균분자량 : 376.5
질량분석 시의 M+질량 : etofenprox 376.2, 1-dodomethyl-3-phenoxybenzene 310.0
Log P_{ow} : 6.9 (20℃)
물에 대한 용해도 : 0.023 mg/L (25℃)
증기압 : 8.13×10^{-4} mPa (25℃)
pKa : 비해리성 (pH 3~10)

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

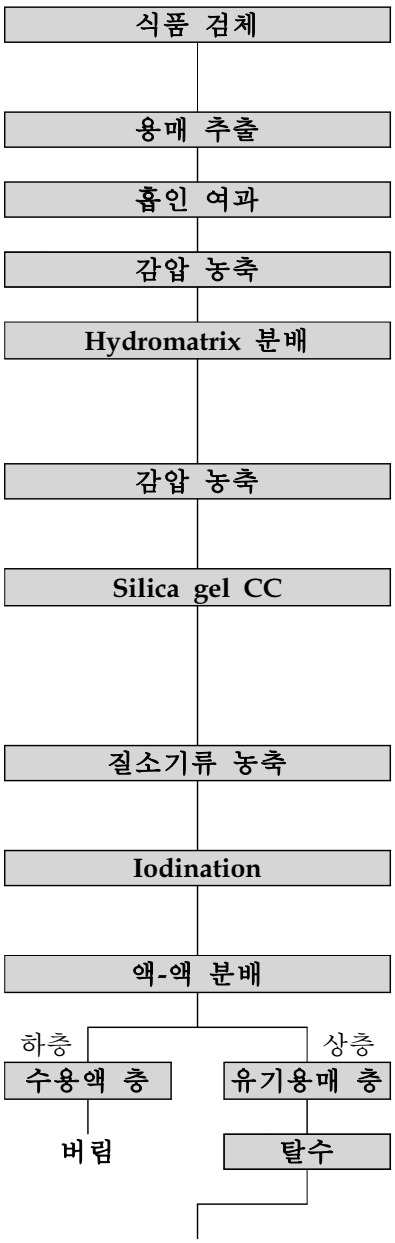
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Etofenprox	0.03	0.05~1.0	0.5~3.0	0.1~10.0	0.2	-	0.01~0.2

2) 분석법 개요

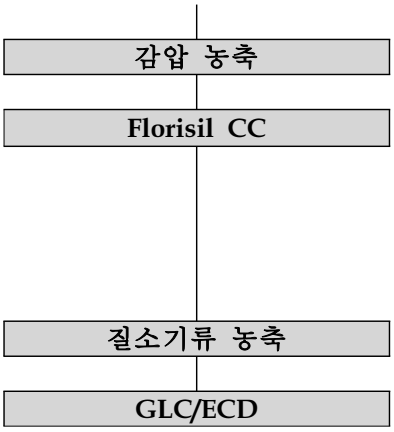
함수 또는 습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하여 추출한다. 추출액을 농축하고 수용액을 다공성 규조토에 피복시켜 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 silica gel

흡착크로마토그래피로 1차 정제하고 iodotrimethylsilane으로 iodination 시킨다. 반응액을 Florisil 흡착크로마토그래피로 최종 정제한 후 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 20g
- 곡류의 경우 40mL의 증류수를 가한 후 30분간 습윤화
- Acetone 100mL로 5분간 고속 마쇄 추출
- Acetone 50mL로 잔사를 세척하여 합침
- Acetone을 증발시킨 후 증류수를 가하여 15mL로 조절
- Hydromatrix column (15mL 용량)
- 농축 수용액 15mL를 가한 후 10분간 방치
- *n*-hexane 40mL로 용출 → 받음
- 40℃에서 감압 농축 건고
- *n*-Hexane 3mL에 재용해
- SPE-silica 1g 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 검체액 3mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (5/95) 8mL → 받음
- 40℃에서 농축, 건고
- 잔류물을 chloroform 1mL에 재용해
- Iodotrimethylsilane 0.1mL 첨가 후 90분간 실온 방치
- 0.03% Sodium thiosulfate 수용액 30mL 첨가
- *n*-Hexane 50mL + 30mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과



- 40℃이하에서 3mL로 감압 농축
- SPE-Florisil 1g 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 검체액 3mL → 버림
- *n*-Hexane 6mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (2/98) 8mL → 받음
- 40℃에서 농축, 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : OV-17 glass column 또는 위와 동등한 capillary column
(2.6 mm i.d. × 1 m)
칼럼온도 : 240℃
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen을 적절하게 조절한다.
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Etofenprox는 곡류, 과실, 채소 및 서류 등에 다양하게 사용되는 합성제충국계열의 비침투성 살충제이다. 분자량이 다소 큼에도 불구하고 매우 비극성이며 증기압이 어느 정도 있고 열에 대한 안정성이 있어 GLC 분석이 가능하다. 그러나 다른 합성제충국제와는 달리 분자 내에 halogen이나 nitrile기를 함유하고 있지 않은 단순 hydrocarbon 류의 화합물이므로 GLC 검출기 중 감도가 높은 선택성 검출기가 없다. 따라서 본 분석법은 감도를 높이기 위하여 분자구조를 변경, iodinated derivative를 형성함으로써 ECD로 검출하는 분석법이다. Etofenprox는 살포 후 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Etofenprox는 log P_{ow}가 6.9인 매우 비극성의 화합물이므로 시료조제과정은 일상적 비극성 농약의 잔류분석과정을 준용한다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하는데 acetone은 대상 성분과 극성이 유사한 유기염소계 및 유기인계에 대하여 이미 그 추출의 효율성이 입증되어 있다.

- 추출액의 분배는 hydromatrix 분배법을 사용하며 이에 따라 추출액을 농축, acetone이 제거된 농축 수용액을 얻는다. 분배 과정은 수용성 추출액을 흡착력이 없는 다공성 규조토인 hydromatrix (Chromosorb™, Extrelut™, ChemElut™ 등)로 충전된 column에 가하여 입자 표면에 피복시킨 후, 비극성 용매를 흘려 넣어 입자 피막 간에 분배시키는 방법이다. 분배 원리는 분액여두에서 수행하는 액-액 분배와 동일하나 진탕의 번거로움이 없고 다수의 검체를 일시에 분배작업하기에 편리하나 사전에 추출액을 농축해야 하는 불편함도 있다.

- 분배 추출액은 유도체화에 앞서 1차로 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 정제하는데 이는 유도체 시약이 검체 중에서 추출되는 간섭물질과 반응할 가능성을 최소화하기 위함이다.

- 유도체화 반응은 iodotrimethylsilane 시약을 사용하여 다음과 같은 반응으로 진행되는데 분자 내에 ether 결합이 친핵성 치환반응으로 개열되면서 1개의 iodine 원자가 삽입된다. ECD에는 1개의 iodine으로도 chlorine 원자 2개 정도의 충분한 감도가 얻어진다. 반응 후 미반응 시약은 sodium thiosulfate에 의하여 제거한 후 유도체를 *n*-hexane 분배에 의하여 회수한다.

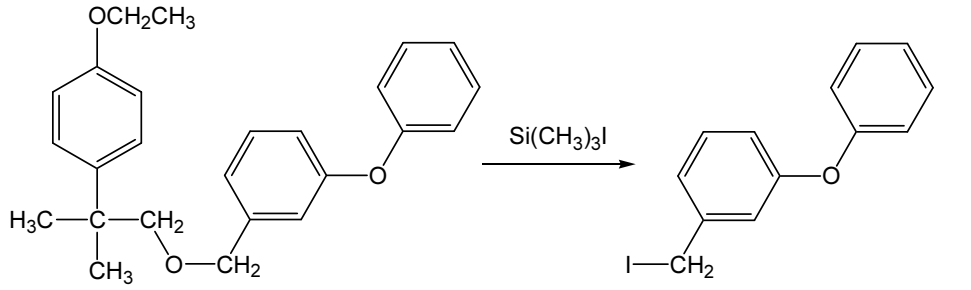


그림 1. Etofenprox의 iodinated derivative 형성 반응

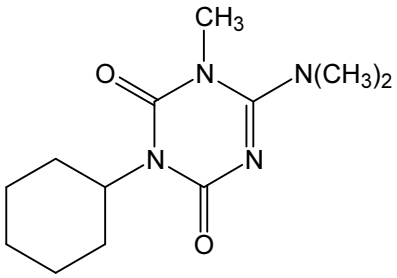
- 반응액은 최종적으로 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제하는데 생성된 유도체도 여전히 비극성 특성을 나타내므로 용출 강도가 약한 ethyl ether/*n*-hexane에서도 충분히 용출되어 정제된 최종용액을 얻을 수 있다.

- GLC 분리용 column으로 packed column이 제시되었으나 분리능이 열등할 경우에는 phenylsiloxane이 없거나 0~5% 정도 함유된 methylsilicone계통으로 15~30m 길이의 bonded phase capillary column을 사용하며 열분해 등 GLC 분석상의 문제는 없다.

8.4.31 잔류농약 분석법 4.1.4.49

헥사지논(Hexazinone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : hexazinone
화학명 (IUPAC) : 3-cyclohexyl-6-dimethylamino-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4-(1*H*,3*H*)-dione
분자식 : $C_{12}H_{20}N_4O_2$
평균분자량 : 252.3
질량분석시의 M+질량 : hexazinone 252.2, metabolite A-TFA 364.1
metabolite B-TFA 334.1
Log P_{ow} : 1.2 (pH 7)
물에 대한 용해도 : 29800 mg/L (pH 7, 25℃)
증기압 : 0.03 mPa (25℃), 8.5 mPa (86℃)

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

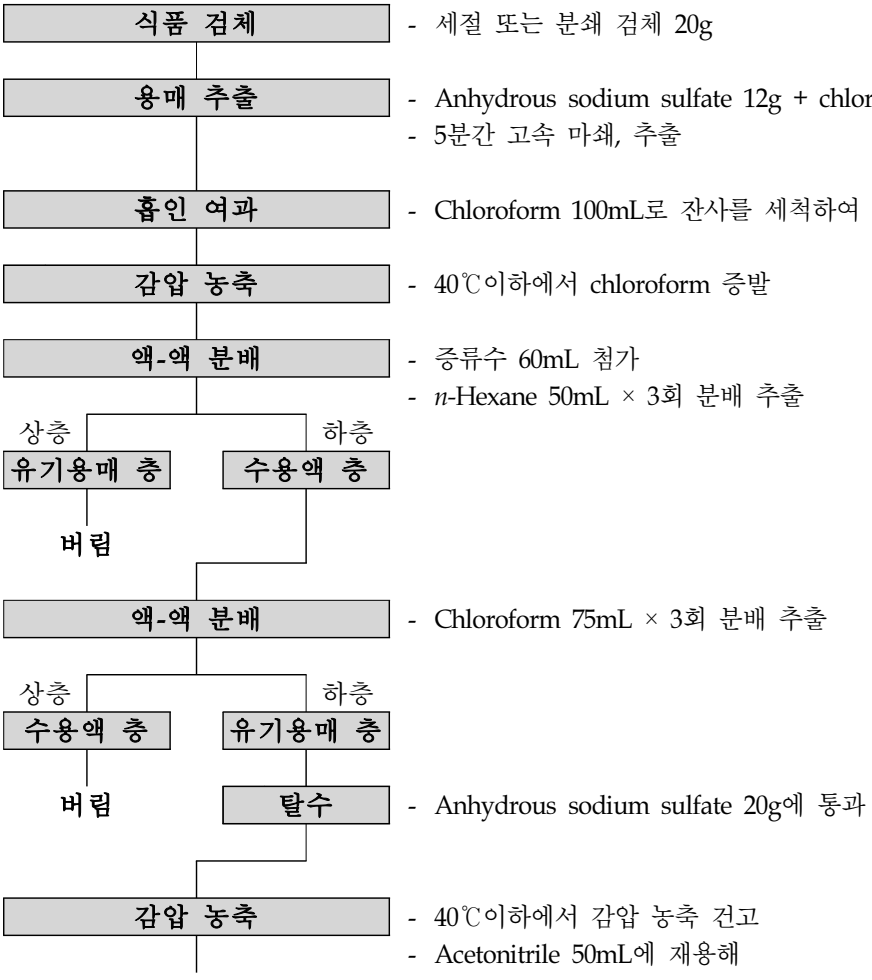
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Hexazinone	0.05	-	0.5	-	-	-	-

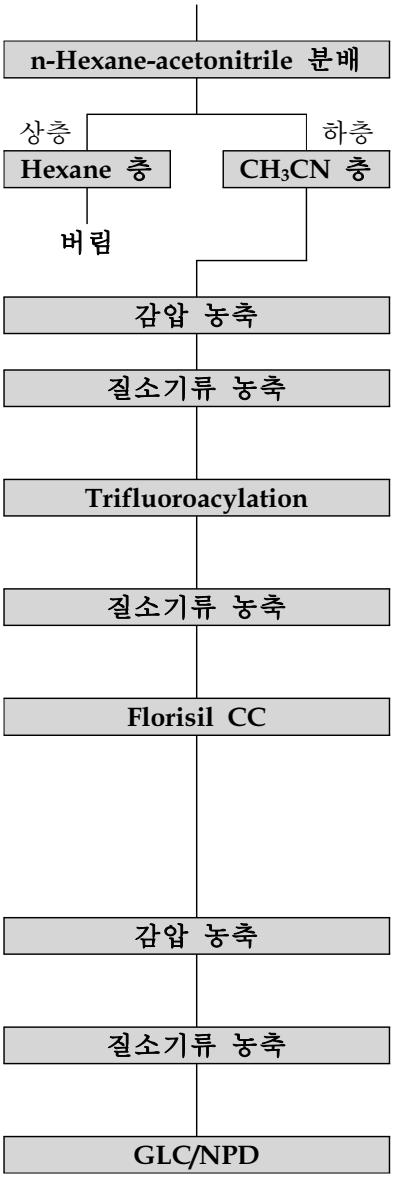
* cRfd (US EPA, 1994).

2) 분석법 개요

함수 농산물 검체에 anhydrous sodium sulfate 및 chloroform을 가하여 고속 마쇄하여 모화합물과 대사산물을 동시에 추출한다. 추출액을 농축하고 수용액에 증류수를 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출하여 버린다. 수용액 층을 재차 chloroform으로 분배 추출하여 모화합물 및 대사산물을 회수한다. Chloroform 분배 추출액을 농축하고 *n*-hexane-acetonitrile 분배법에 의하여 비극성 불순물을 제거한 후 trifluoroacylation 시킨다. 반응액을 농축한 후 Florisil 흡착크로마토그래피로 최종 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- *n*-Hexane 50mL × 3회 분배 추출
- 50℃이하에서 약 5mL로 농축 후 15mL tube에 옮김
- 40℃이하에서 농축, 건고
- Chloroform 1mL에 재용해
- Trifluoroacetic anhydride 1mL 첨가
- 60℃에서 30분간 방치
- 40℃이하에서 농축, 건고
- Ethyl acetate 1mL에 재용해
- SPE-Florisil 1g 카트리지
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체액 1mL → 버림
- *n*-Hexane 100mL → 버림
- Acetonitrile/증류수 (99/1) 150mL → 받음
- 40℃이하에서 감압 농축
- Chloroform에 재용해하여 15mL tube에 옮김
- 40℃에서 감압농축, 건고
- 잔류물을 ethyl acetate 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : OV-17 glass column 또는 위와 동등한 capillary column
(2.6 mm i.d. × 0.5 m)

칼럼온도 : 205℃
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen을 적절하게 조절한다.
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Hexazinone은 triazinone계 비선택성 제초제로서 일부 작물 및 침엽수림 등 비농경지에서 잡초발생 후 처리되는 약제이다. Hexazinone은 살포 후 작물 및 환경 중에서 다양하게 분해, 대사되는데 그 중에서 cyclohexyl기 4번 탄소위치의 hydroxylation 및 *N,N*-dimethyl기에서의 demethylation이 주요 초기대사 경로로 각각 metabolite A와 B의 주요 대사산물을 생성한다. 제시한 분석법에서는 모화합물을 포함하여 주요 대사산물 2종을 함께 분석한다.

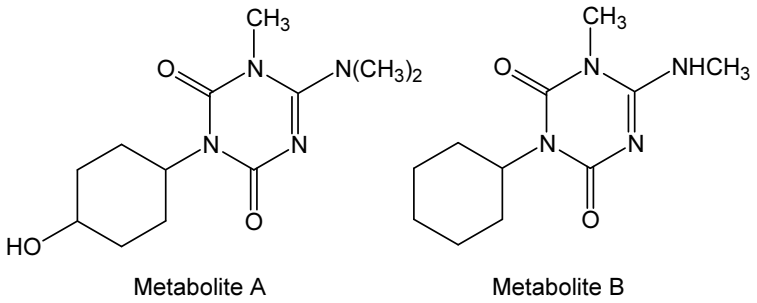


그림 1. Hexazinone 주요 대사산물의 화학구조

- Hexazinone은 log P_{ow}가 1.2인 극성의 화합물이나 증기압이 0.03 mPa (25℃)로 휘발성이 어느 정도 있으므로 직접 GLC로 분석하는 것이 가능하다. 그러나 대사산물 2종은 극성 작용기의 도입에 따라 모화합물보다 더 극성이 커지고 hydroxyl기나 -NH기의 존재에 따라 peak tailing 등 크로마토그래피 특성이 불량하여 GLC로 직접 분석하는 것이 어렵다. 따라서 이러한 작용기를 acylation하여 비극성의 작용기로 전환, GLC로 분석한다. 검출기로는 모화합물 및 대사산물 모두 분자 내에 질소 원자 4개를 함유하고 있으므로 NPD를 사용한다.

- 검체의 추출은 anhydrous sodium sulfate를 첨가하여 검체 중 수분을 탈수하고 비수용성의 chloroform으로 추출한다. 함수 시료의 경우 acetone과 같은 수용성 유기용매로 추출하거나 검체의 탈수 후 비극성 용매로 추출하는 방법은 거의 동등한 추출 효율을 나타낸다. 추출액은 농축 한 후 액-액 분배에 공시하는데 비극성의 *n*-hexane으로 분배하여 버림으로써 비극성 불순물의 대부분을 효과적으로 제거한다. 이 때 hexazonone 및 대사산물들은 극성이 높으므로 수용액 층에 존재하며 보다 극성이 강한 chloroform으로 분배 추출하여 회수할 수 있다. 분배 추출액은 다시 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지 등 비극성 불순물을 추가로 제거하는데 앞서의 *n*-hexane 세척에 의하여 대부분의 비극성 불순물이 제거되었으므로 검체 중 불순물 과다에 따라 선택적으로 적용할 수 있다.

- 대사산물의 유도체화 과정은 trifluoroacyl derivatives를 형성하는 반응이다. 즉, cyclohexyl ring의 hydroxyl 및 monomethyl amino기는 trifluoroacetic anhydride와 용이하게 반응하여 trifluoroacylation 되면서 극성이 낮아지고 휘발성이 높아지게 된다. 형성된 유도체에는 3개의 불소 원자가 삽입되므로 검출기로 ECD를 사용할 수도 있으나 모화합물과의 동시 분석이 어렵고, 검체 중 불순물 일부도 반응시약과 반응하게 되므로 간섭이 심하다. 따라서 검출기로는 NPD를 사용하는 것이 최선이다.

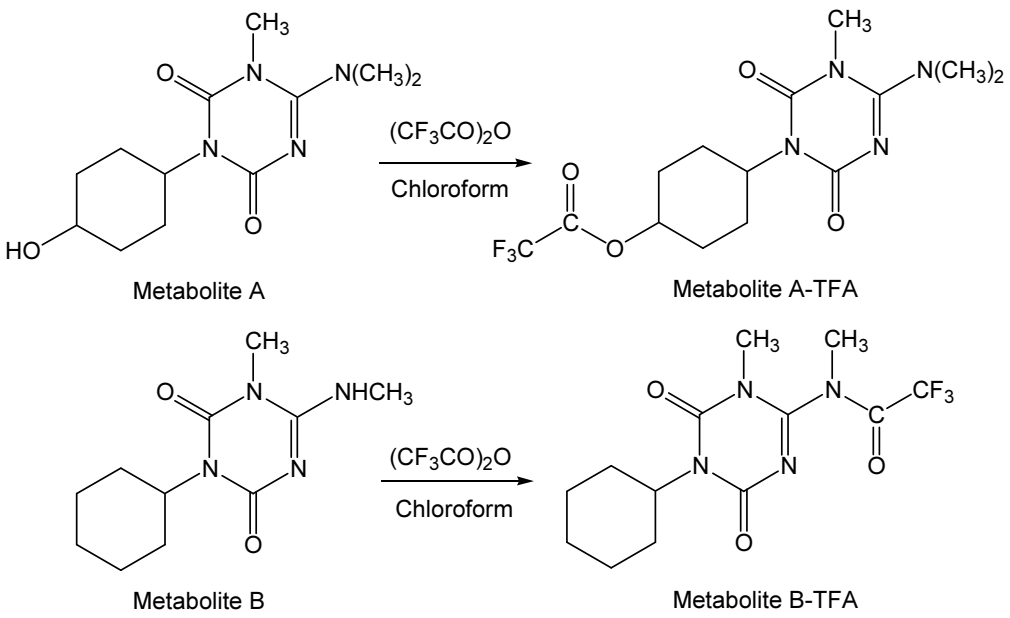


그림 2. Hexazinone 주요 대사산물의 trifluoroacyl derivative 형성 반응

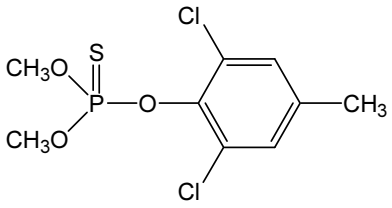
- 반응액은 최종적으로 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제하는데 모화합물 및 생성된 유도체는 극성이 높은 편이므로 용출 강도가 큰 용매에서 비로소 용출된다. 따라서 불순물 제거를 위한 세척 분획을 설정하여 최종용액의 정제도를 높인다.

- GLC 분리용 column으로 packed column이 제시되었는데 대상 성분의 크로마토그래피 특성이나 분리능이 열등할 경우에는 50% phenylsiloxane이 포함된 methylsilicone계통의 liquid phase로 15~30m 길이의 bonded phase capillary column을 사용한다. 대상 성분들은 극성이 높으므로 가급적 극성의 liquid phase을 사용하되 머무름 시간을 적절히 조절하여 peak의 대칭성을 최우선으로 한다. 또한 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용하여 정량 분석의 재현성을 확보한다. NPD에 대한 감도는 충분히 높으므로 정량한계 확보에 대한 어려움은 없다.

8.4.32 잔류농약 분석법 4.1.4.50

톨크로포스-메칠(Tolclofos-methyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : tolclofos-methyl
화학명 (IUPAC) : *O*-2,6-dichloro-*p*-tolyl *O*,*O*-dimethyl phosphorothioate
분자식 : $C_9H_{11}Cl_2O_3PS$
평균분자량 : 301.1
질량분석 시의 M+질량 : 300.0
Log P_{ow} : 4.56
물에 대한 용해도 : 1.1 mg/L
증기압 : 57 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

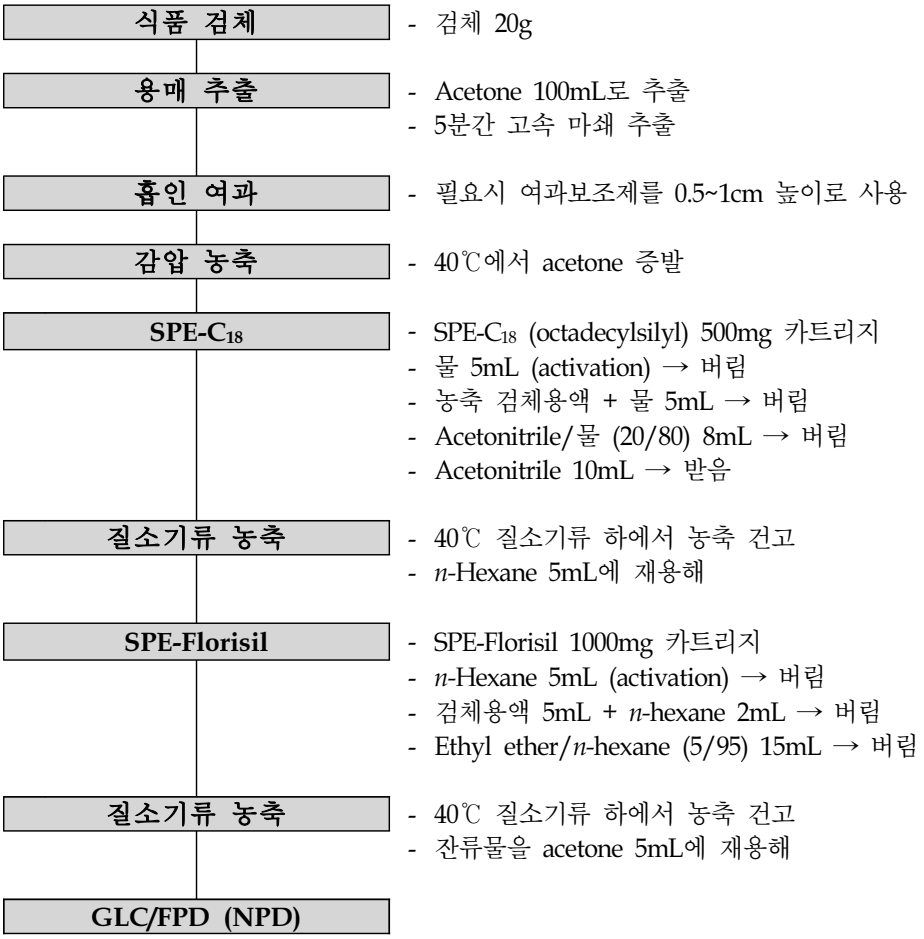
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Tolclofos-methyl	0.07	-	0.05~0.2	0.05	-	-	0.2

2) 분석법 개요

습윤화한 세절 검체에 acetone을 가하여 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 수용성 농축액을 SPE-C_{18} (octadecylsilyl)에 통과시켜 고상 추출한다. C_{18}에 포집된 성분을 acetonitrile로 용출시킨 후 농축 건고하고 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 15 m, 1.0 μm)
칼럼온도 : 185℃, 등온조건 (필요에 따라 적절히 온도를 조절)
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃

캐리어가스 및 유량 : nitrogen 또는 helium (tolclofos-methyl이 약 7분에서 유출하는 유속으로 조정)
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 tolclofos-methyl은 전형적인 유기인계 살충제로서 물에 대한 용해도가 낮고 log P_{ow} 값이 4.6인 비극성 화합물이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone 사용하여 대상농약을 추출한다. 액-액 분배를 대신하여 고상추출법을 이용, 분배한다. 즉 수용성 농축액을 SPE-C_{18} (octadecylsilyl)에 흘려보내면 비극성인 대상성분은 C_{18}에 분배되고 물 및 극성 불순물은 포집되지 않고 그대로 통과한다. 포집된 성분은 물에 비하여 비극성용매인 acetonitrile 등으로 용이하게 용출시킬 수 있다. 이러한 SPE-C_{18}은 고전적 액-액 분배와 그 정제효과가 매우 유사하다.

- 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 정제 효과가 뚜렷하다.

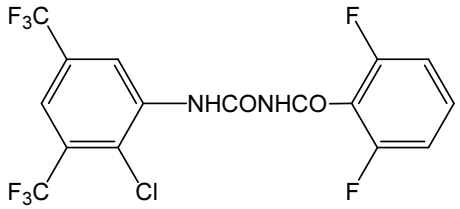
- 분석법 상 GLC 검출기는 NPD로 제시되어 있지만, 대상 화합물의 분자구조 내에 1개의 인과 2개의 염소 원자를 함유하고 있으므로 NPD와 FPD (P), 그리고 ECD 모두가 사용가능하다. 기기분석 시의 선택성 및 재현성을 감안할 때 FPD (P)가 가장 우선적으로 추천된다.

- Tolclofos-methyl 잔류분의 재확인을 위한 GC-MS에서 분자이온의 상대적 이온강도가 높지 않으므로 SIM을 위한 fragment (m/z)는 높은 강도이면서 분자구조를 반영할 수 있는 250, 265로 설정한다.

8.4.33 잔류농약 분석법 4.1.4.53

비스트리플루론(Bistrifluron)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : bistrifluron
화학명 (IUPAC) : 1-[2-chloro-3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea
분자식 : $C_{16}H_7ClF_8N_2O_2$
평균분자량 : 446.7
질량분석 시의 M+질량 : 446.0
Log P_{ow} : 5.74
물에 대한 용해도 : 〈0.03 mg/L
증기압 : 2.7×10^{-3} mPa (25℃)
pKa : 9.58, 약산성

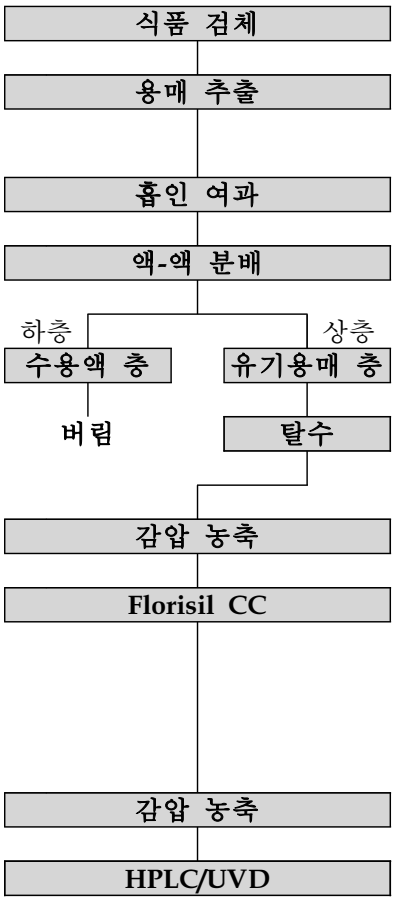
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bistrifluron	-	-	1.0	0.2~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체를 습윤화하고 acetone을 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인 여과한 후 포화식염수와 물을 가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 Florisil column chromatigraphy로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g
- Acetone 100mL로 추출
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 450mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (15/85) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (40/60) 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 CH_3CN/water (70/30) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (60/40, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : UV 256 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

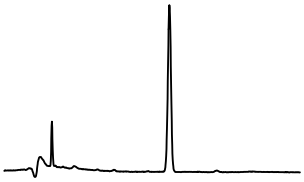


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
bistrifluron (10.0분) 8 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (60/40, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
이온화 : Electrospray ionization (ESI) negative-ion mode
주입량 : 10 μL
Capillary temperature : 330℃
Cone voltage : -39 V
분자량 범위 : 100~500

표 1. LC-MS ESI(-) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Bistrifluron	5.7	446	445

6) 분석법 해설

- Bistrifluron은 과실 및 채소류에서 사용되는 전형적인 benzoylphenylurea계 살충제로서 잔류허용기준은 0.2 mg/kg이므로 일반적 잔류분석법 기준인 0.05 mg/kg의 분석감도가 요구된다.

- Bistrifluron은 pKa가 9.6으로 매우 약한 산성의 거의 해리하지 않는 비극성 화합물이다. 그러나 증기압이 0.0027 mPa으로 낮은 편이며 분자 내에 urea기의 존재로 인하여 열에 취약하므로 GLC로 분석하기는 어려운 화합물이다. 다른 benzoylphenylurea 살충제와 유사하게 분자 내에 256 nm의 장파장을 흡수하는 발색단을 보유하고 있어 HPLC/UVD로 충분히 분석 가능하다.

- Bistrifluron은 log P_{ow}가 5.7로 알려진 비극성 화합물이므로 추출 및 분배법은 중간~비극성 농약 잔류분석법에서 일상적으로 사용되는 방법을 그대로 사용할 수 있다. 즉, 추출에는 검체를 습윤화한 후 acetone을 사용한다. 추출액에 포화식염수/물을 다량 첨가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 이 방법은 추출액의 농축과정을 생략할 수 있어 간편하며 bistrifluron은 1회 분배로도 우수한 효율로 회수된다.

- 흡착 chromatography에서 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용하되 SPE가 아닌 활성화시킨 Florisil 10 g을 일반 유리제 column (내경 15 mm)에 충전하여 사용한다. 이는 충분한 흡착제를 사용하여 검체 중 간섭 성분을 가급적 많이 제거하기 위한 것이며 곡류 등 일부 유지 검체에 대해서도 *n*-hexane-acetonitrile 분배과정을 생략하는 것이 가능하기 때문이다. 또한 Florisil의 활성화 과정을 정확히 수행할 경우 그 재현성이 SPE에 비하여 우수하다.

- HPLC 분석 시에 bistrifluron은 256 nm의 비교적 장파장을 흡수하므로 기기분석의 선택성이 우수한 편이다. 또한 상당히 비극성의 화합물이므로 대부분의 극성 간섭물질은 보다 빠른 머무름 시간에 용출되므로 검체 간의 분석 간격도 설정하기가 용이하다.

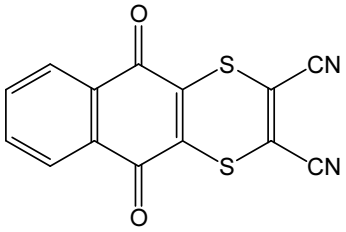
표 2. 배추 중 회수율 및 정량한계

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)	정량한계 (mg/kg)
Bistrifluron	0.2	105.6±3.5	0.02
	1.0	103.5±4.0	

8.4.34 잔류농약 분석법 4.1.4.55

디치아논(Dithianon)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : dithianon
화학명 (IUPAC) : 5,10-dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-*b*]-1,4-dithiine-2,3-dicarbonitrile
분자식: $C_{14}H_4N_2O_2S_2$
평균분자량 : 296.3
질량분석 시의 M+질량 : 296.0
Log P_{ow} : 3.2
물에 대한 용해도 : 0.14 mg/L
증기압 : 2.7×10^{-6} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

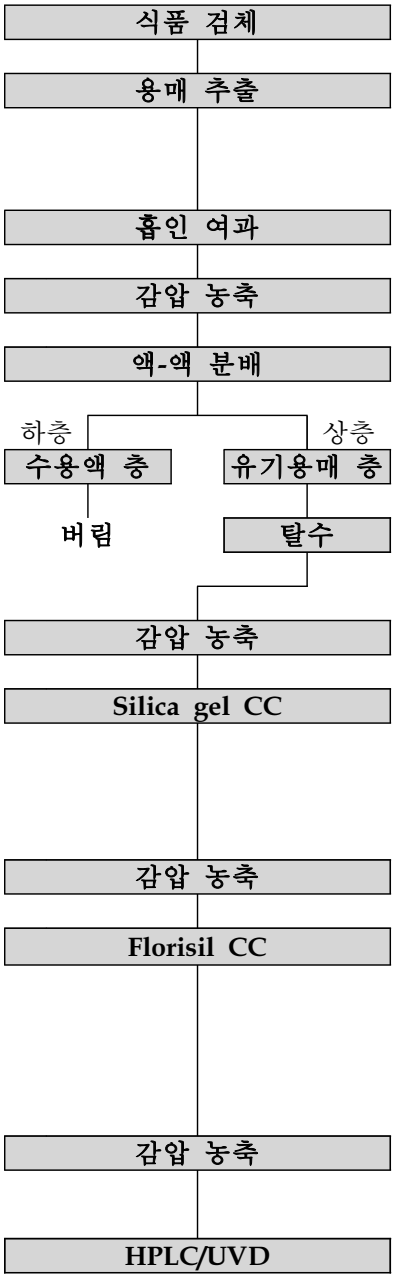
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Dithianon	0.01	0.1	1.0~5.0	0.1~3.0	-	0.5	0.1

2) 분석법 개요

세절한 검체를 산성화한 후 acetone으로 고속마쇄, 추출하고 흡인 여과한다. 여액 중 acetone을 감압 증발시키고 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 50g
- 4N HCl 5mL 첨가
- Acetone 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 30분간 진탕 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 acetone 증발
- 5% NaCl 수용액 200mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetic acid 0.5mL 첨가
- 건고 후 benzene 10mL에 재용해
- Silica gel (5% 함수) 15g (내경 15mm)
- 검체용액 + benzene 40mL → 버림
- Benzene 60mL → 받음
- Acetic acid 0.5mL 첨가
- 건고 후 dichloromethane 10mL에 재용해
- Florisil 15g (내경 15mm)
- Dichloromethane 100mL로 습식 충전 후 유출
- 검체용액 + dichloromethane 40mL → 버림
- Dichloromethane 60mL → 받음
- Acetic acid 0.5mL 첨가
- 잔류물을 methanol/acetic acid (95/5) 4mL에 재용해
- Membrane filter (PVDF)를 통과시켜 미세 여과

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : methanol/물/acetic acid (80/20/1, v/v/v)
이동상 유량 : dithianon이 약 4~5분에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : UV 254 nm
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Dithianon은 과수 및 채소에 주로 보호용 살균제로서 사용되는 quinone계 화합물이다. 화합물은 해리하지 않는 중간 극성의 화합물 (log P_{ow} 3.2)이나 휘발성이 낮고 열에 대한 안정성이 열등하여 보통 GLC로는 분석되지 않는다. 따라서 잔류분석법은 HPLC를 이용한다. 긴 conjugation system이 내재하는 화학구조에서 예상되는 바와 같이 dithianone은 UV에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용하는 것이 최적이다.

- 추출은 검체를 산성화한 후 acetone을 사용, 마쇄 추출하는데 이때 산을 첨가하는 것은 추출과정 중 dithianon의 안정성을 확보하기 위한 것이다. 이와 같이 dithianon은 잔류분석 수준에서 그 안정성이 떨어져 분석 중에 분해되는 정도가 심하므로 각 과정마다 산을 첨가하여 안정화한다. 그럼에도 불구하고. 분석은 가급적 빠른 시간에 수행하여야 재현성 있는 분석 결과를 얻을 수 있다. 또한 분석실 환경 및 분석자의 숙련도에 따라 분석의 정밀도가 크게 영향을 받으므로 주기적으로 회수율을 검정하여 분석 결과의 신뢰성을 확보하여야 한다.

- 분배는 농축한 검체용액에 NaCl 수용액을 첨가한 후 *n*-hexane으로 2회 분배함으로써 dithianon이 충분히 회수된다. Chromatography에 의한 정제는 silica gel과 Florisil의 2종 흡착제를 사용하여 연속 정제하는데 불순물 간섭 정도가 심하지 않은 사과 등 보

통의 과실 및 채소 검체에서는 Florisil 흡착크로마토그래피 한 과정으로도 충분하다.

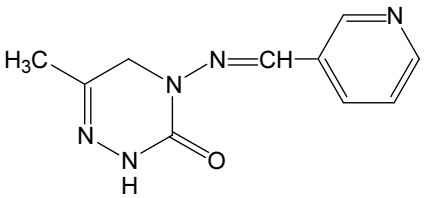
- HPLC에서의 측정파장은 254 nm로 제시되어 있으나 최대흡광파장 260 nm에서 분석하여도 무방하며 선택성이 다소 향상된다. 이동상에는 acetic acid와 같은 산을 첨가, 산성을 유지하여야 peak의 모양이 대칭형으로 나타난다.

- 분석법의 정량한계는 0.05 mg/kg 수준이며 회수율은 다른 농약의 경우보다 다소 낮은데 70~90% 범위로 나타나면 정상적으로 분석과정을 수행하였다고 할 수 있다.

8.4.35 잔류농약 분석법 4.1.4.56

피메트로진(Pymetrozine)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : pymetrozine
화학명 (IUPAC) : (*E*)-4,5-dihydro-6-methyl-4-(3-pyridylmethyleneamino)-1,2,4-triazin-3(2*H*)-one
분자식 : $C_{10}H_{11}N_5O$
평균분자량 : 217.2
질량분석 시의 M+질량 : 217.1
Log P_{ow} : -0.18
물에 대한 용해도 : 290 mg/L (pH 6.5, 25℃)
증기압 : 〈4×10^{-3} mPa (25℃)
pKa : 4.06

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Pymetrozine	0.03	-	0.5~1.0	0.03~3.0	-	-	0.2

* EC (2001).

2) 분석법 개요

균질화한 검체에 borax 완충용액을 가하여 pymetrozine의 이온화를 억압하는 조건으로 조절하고 methanol을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 농축하고 농축

액을 hydromatrix cartridge에 가하여 흡수시키고 포화 NaCl 수용액과 borax 완충용액을 첨가한 후 ethyl acetate로 분배 유출시킨다. Ethyl acetate 용출액을 감압 농축하고 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

식품 검체
- 균질화 검체 30g (과실류) 또는 15g (채소류)

용매 추출
- Borax 완충용액 (pH 9.0) 20mL + methanol 100mL
- 2시간 진탕 추출

흡인 여과
- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 methanol 20mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- Methanol을 첨가, 총 부피를 150mL로 조절한 후 50mL (과실류 10g, 채소류 5g 해당량)를 분취함.

감압 농축
- 40℃에서 methanol을 증발 제거하여 약 3mL로 농축.

Hydromatrix 분배
- 다공성 규조토 15g 카트리지 (함수용량 10mL)
- 농축 검체액 3mL (과실류 10g, 채소류 5g 해당량) 첨가
- 포화 NaCl 수용액 3mL + borax 완충용액 4mL로 잔류물을 씻어 순차적으로 첨가, 흡수시킨 후 20분간 방치
- Ethyl acetate 100mL로 분배 용출

감압 농축
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate 5mL에 재용해

Silica gel CC
- SPE-silica 1g 카트리지
- Ethyl acetate 10mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL → 버림
- Methanol/ethyl acetate (5/95) 20mL → 받음

감압 농축
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitile/borax 완충용액 (15/85) 5mL에 재용해
- Membrane filter (PVDF, 0.45μm)를 통과시켜 미세 여과

HPLC/UVD

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물 (13/87, v/v)
이동상 유량 : pymetrozine이 약 7~10분에서 유출하는 유속으로 조정.
검출기 파장 : UV 300 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Pymetrozine은 해충에 대하여 feeding blocker로서 작용, 먹이 섭취를 중단시켜 치사에 이르게 하는 살충기작을 나타내는 침투성 살충제이다. 주로 채소, 과실 및 서류 재배시에 발생하는 진딧물을 방제하기 위하여 전면 살포 혹은 토양 살포용으로 사용된다. 생체 및 환경 중에서 이행성이 있으나 잔류기간은 비교적 짧으며 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 모화합물에 한정된다.

- Pymetrozine은 log P_{ow}가 -0.18인 극성 화합물이며 짝산의 pKa가 4.06인 약한 염기성 화합물이다. 따라서 GLC에 의한 분석은 어려우며 HPLC/자외흡광검출법으로 분석한다.

- 검체 추출은 검체에 borax (sodium tetraborate) 완충용액을 가하여 약염기성으로 조절, pymetrozine의 이온화를 억압한 조건에서 methanol로 추출한다. Pymetrozine 짝산의 pKa는 4.06이므로 추출액 전체의 pH를 6 이상으로 조절하여야 protonation이 억압, 유기용매 가용성이 된다. 농산물 검체 중에는 체액이 약산성인 검체가 다수 있으므로 약염기성 완충용액을 가하여 확실한 pH 조절이 되도록 한다. 또한 pymetrozine의 극성이 높으므로 추출용매로는 acetone이나 acetonitrile 보다는 극성이 높은 methanol을 사용한다. Methanol 추출액은 점도가 높아 일부 검체에서 여과 속도가 느린 경우가 발생할 수 있으므로 여과보조제를 사용한다.

- Methanol 추출액은 감압 농축할 때에 돌비 (突沸, bumping) 현상이 일어나기 쉬우므로 splash protector를 플라스크에 부착하고 진공도를 세심하게 조절한다.

- 농축액의 분배는 hydromatrix 분배법을 이용한다. Hydromatrix는 표면적이 넓은 입자로 되어 있는 흡착력을 불활성시킨 다공성 규조토이다. 농축 수용액을 가하면 입자에 얇은 피막의 형태로 분포하게 되며 분배 과정은 수용액 피막과 수용액과 섞이지 않으면서 흘러가는 유기용매 간에 이루어진다. Hydromatrix는 충전제 량에 따라 함수용량이 한정되어 있으므로 총 수용액의 부피는 함수용량을 절대 초과하지 않도록 주의하여야 한다. 분배의 원리는 분액깔대기를 이용한 분배법과 완전히 동일하나 층 분리가 어려운 경우에도 적용이 가능하고 일부의 경우 분배 효율이 다소 높은 장점이 있다.

- Pymetrozine은 극성이 높은 화합물이므로 물과 섞이지 않은 비극성 유기용매로의 분배가 어렵다. 따라서 borax 완충용액에 의한 이온억압과 함께 포화 NaCl 수용액에 의한 salting-out 효과, 그리고 극성이 강한 ethyl acetate를 분배용매로 사용하여 유기용매층으로의 분배효율을 높인다.

- 분배 추출액은 최종적으로 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. Pymetrozine은 극성이 높으므로 충전제는 Florisil이나 alumina 보다 흡착력이 상대적으로 약한 silica gel을 사용한다. 대부분의 비극성 불순물은 ethyl acetate 분획에서 용출되므로 최종 용액의 정제도는 우수하다.

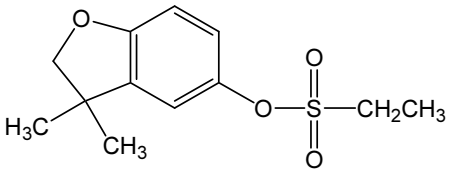
- Pymetrozine은 염기성 화합물이므로 HPLC 분석 시에 일반적인 천연 silica-based C_{18}으로 충전된 분석용 column을 사용할 경우, silica 중에 불순물로서 함유된 소량의 금속에 의하여 backward tailing 현상이 일어날 수 있다. 따라서 합성 silica-base를 사용한 C_{18} column을 사용한다. 또한 이동상 중 물의 함량이 매우 높으므로 endcapping 정도가 너무 큰 column에서는 hydrophobic collapse 현상이 발생, 머무름 시간이 매우 짧아지면서 분리가 불량할 수 있다. 따라서 endcapping 정도가 적정한 C_{18} column이나 C_{18} group에 embeded polar group ligand가 삽입된 column을 사용하는 것이 바람직하다.

- HPLC 분석 시의 검출파장은 300 nm로 장파장이므로 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성은 비교적 적다. 따라서 검체 종류에 따라 정량한계를 확보하기 위해서 검체 주입량을 증가시키는 것이 가능하다.

8.4.36 잔류농약 분석법 4.1.4.57

벤퓨러세이트(Benfuresate)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : benfuresate
화학명 (IUPAC) : 2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate
분자식 : $C_{12}H_{16}O_4S$
평균분자량 : 256.3
질량분석 시의 M+질량 : 256.1
Log P_{ow} : 2.41 (20℃)
물에 대한 용해도 : 261 mg/L (25℃)
증기압 : 1.43 mPa (20℃), 2.78 mPa (25℃)
pKa : -

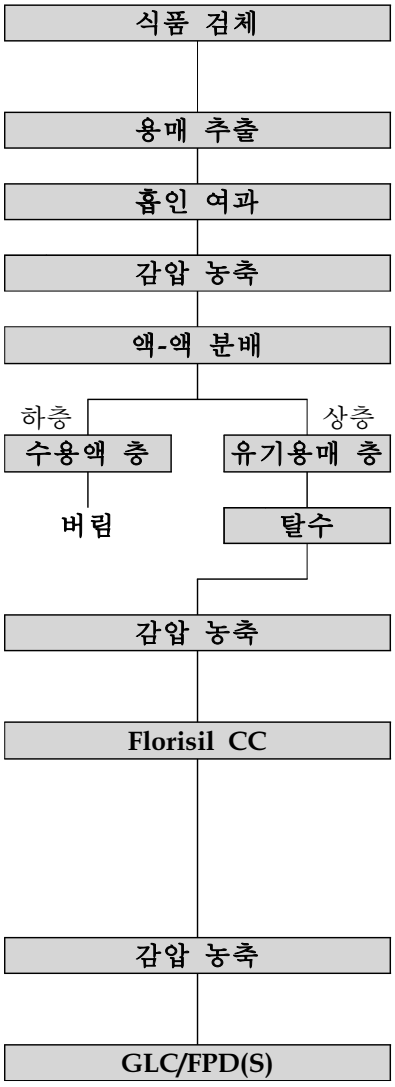
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Benfuresate	0.01	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 감압 농축하여 분액여두에 옮긴 후 NaCl 수용액을 첨가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 분배액을 감압 농축하고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제한 후 GLC/FPD (sulfur mode)로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 20g
- 곡류의 경우 40mL의 증류수를 가한 후 30분간 습윤화
- Acetone 100mL로 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제 사용
- 40℃이하에서 acetone 증발
- 증류수 100mL + 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 감압 농축 건고
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 5mL에 재용해
- SPE-Florisil 1g 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 검체액 5mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 15mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (25/75) 25mL → 받음
- 40℃이하에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃염광검출기 (FPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)

칼럼온도 : 210℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Benfuresate는 주로 수도 및 곡류, 과실류 등에서 다년생 잡초를 방제하기 위하여 사용되는 토양처리형의 잡초발생후 제초제이다. 국내에서는 주로 수도 재배 시에 사용되며 단제보다는 다른 약제와의 혼합제 형태로 많이 사용되고 있다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Benfuresate는 log P_{ow}가 2.41인 중간 극성의 화합물이고 증기압이 2.78 mPa (25℃)로 어느 정도 있으며 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 황 원자를 1개 함유하고 있으므로 FPD를 사용하는데 감도가 다소 낮은 반면 선택성이 우수하므로 시료 용액을 농축함으로써 용이하게 분석법의 감도를 높일 수 있다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 중간 극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 농축하여 수용성 농축액을 분액여두에 옮겨 식염수를 첨가, *n*-hexane으로 분배 추출한다. Benfuresate는 중간 극성이므로 *n*-hexane 층으로의 분배 효율을 높이기 위하여 추출액 중 acetone을 증발, 제거한다.

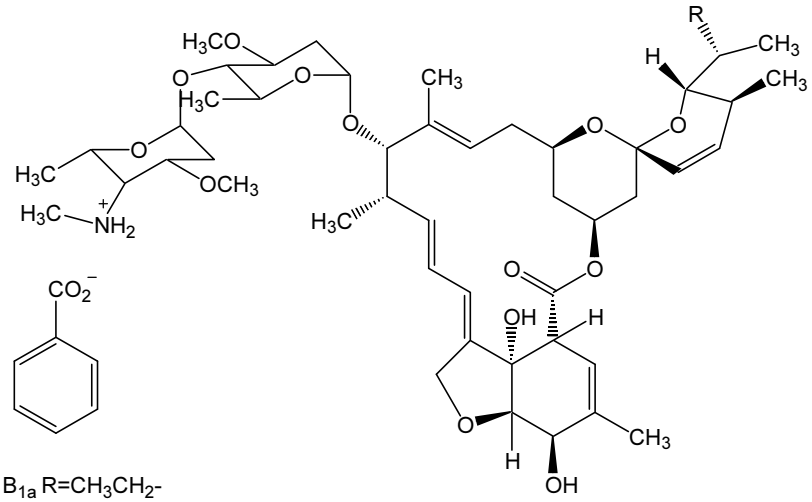
- 최종적으로 분배 추출액은 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. 세척과 용출 과정으로 구성된 용출용매 체계에서 상당량의 간섭물질이 효과적으로 제거된다.

- GLC column은 비극성의 liquid phase를 사용하여 비교적 빠르게 대상 성분을 유출시킨다. FPD의 sulfur mode에서는 S_2에 의한 감응성으로 인하여 주입량/peak 면적 간 비례곡선은 2차함수로 나타난다. 따라서 peak 면적의 제곱근을 주입량과 회귀시켜 직선적 검량선을 얻도록 한다.

8.4.37 잔류농약 분석법 4.1.4.59

에마멕틴 벤조에이트(Emamectin benzoate)

1) 대상 농약의 특성



B_{1a} R=CH_3CH_2-

B_{1b} R=CH_3-

일반명 (ISO) : emamectin benzoate

화학명 (IUPAC) : a mixture of (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*S*,6'*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-6'-[(*S*)-*sec*-butyl]-21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19-troioxatetracyclo[15.6.1.$1^{4,8}$.$0^{20,24}$]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'*H*-pyran)-12-yl 2,6-dideoxy-3-*O*-methyl-4-*O*-(2,4,6-trideoxy-3-*O*-methyl-4-mathylamino-α-*L*-lyxo-hexopyranosyl)-α-*L*-arabino-hexopyranoside (B1a) and (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*S*,6'*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-21,24-dihydroxy-6'-isopropyl-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.$1^{4,8}$.$0^{20,24}$] pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'*H*-pyran)12-yl 2,6-dideoxy-3-*O*-methyl-4-*O*-(2,4,6-trideoxy-3-*O*-methyl-4-methylamino-α-*L*-lyxo-hexopyranosyl)-α-*L*-arabino-hexopyranoside (Bib)

조성 : B1a와 B1b의 9:1 혼합물

분자식 : $C_{56}H_{81}NO_{15}$ (B1a), $C_{55}H_{79}NO_{15}$ (B1b)

평균분자량 : 1,008.3 (B1a), 994.2 (B1b)

질량분석 시 emamectin benzoate 형광유도체의 M+질량 : 971.5 (B1a), 957.5 (B1b)
Log P_{ow} : 5.0
물에 대한 용해도 : 24 mg/L
증기압 : 4×10^{-3} mPa (21℃)

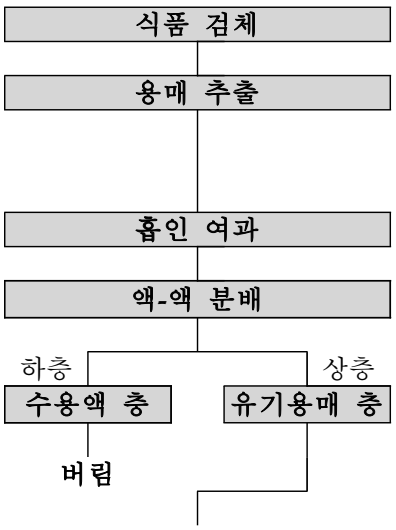
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Emamectin benzoate	0.0025	-	0.03~0.2	0.05~0.1	-	-	0.05

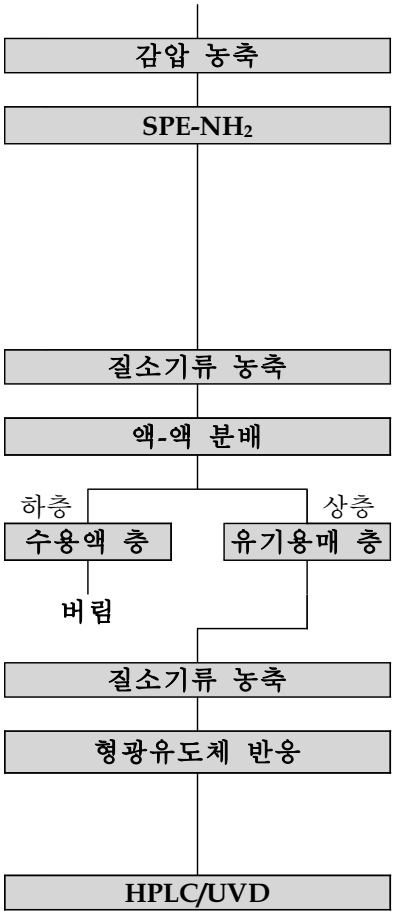
2) 분석법 개요

세절 검체에 acetonitrile, 물 및 NaCl을 첨가하고 ethyl acetate를 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출액 중 수용액 층을 제거하고 농축한 후 SPE-NH_2 카트리지를 사용한 약음이온교환 크로마토그래피에 의하여 정제한다. 용출액을 다시 액-액 분배에 의하여 추가 정제하고 *N*-methylimidazole/trifluoroacetic anhydride 시약을 사용, 형광유도체를 형성한 후 HPLC/FLD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- Acetonitrile 1mL + 물 4mL + NaCl 1g 첨가
- Ethyl acetate 20mL + 10mL × 2로 3회 추출
- 각 5분간 고속 마쇄 추출
- 진탕 후 정치, ethyl acetate 층을 취함



- Ethyl acetate 3mL에 재용해
- SPE-NH_2 (aminopropyl) 500mg 카트리지
- Methanol에 녹인 1% ammonium acetate 5mL + methanol 에 녹인 1% H_3PO_4 5mL + 물 5mL + methanol 5mL + ethyl acetate 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 + ethyl acetate 3mL → 버림
- Methanol에 녹인 1% ammonium acetate 20mL → 받음
- 40℃에서 1mL로 농축
- 물 10mL 첨가
- Ethyl acetate 10mL × 4회 분배 추출
- Ethyl acetate/acetonitrile (25/75) 4mL에 재용해
- *N*-Methylimidazole 0.3mL 첨가, 1분간 진탕 후 방냉
- Trifluoroacetic anhydride/CH_3CN (2:1) 0.3mL 첨가
- 5분간 방치 후 물 0.4mL 첨가

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 형광검출기 (FLD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : methanol/물 (92/8, v/v)
이동상 유량 : emamectin benzoate가 약 15분정도에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : 여기파장 365 nm, 형광파장 470 nm
분석법의 정량한계 : 0.005 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Emamectin benzoate는 방선균의 일종인 *Streptomyces avermitilis*로부터 분리한 천연 살충/구충성분인 avermectins의 한 부류이다. 채소 및 과실류의 살충/살응애약으로 사용되며 생물학적 활성이 높아 단위면적 당 유효성분 살포량이 매우 적은 반면 잔류허용기준도 0.03~0.2 mg/kg으로 매우 엄격하여 고감도 분석법이 요구된다.

- Emamectin benzoate는 macrocyclic lactone 화합물로서 유사체인 B1a와 B1b의 혼합물이고 각 성분의 분자량이 1,008 및 994에 달하는데 분자 중 치환 당 (糖)구조에 결합된 amino기가 benzoic acid와 4차 암모늄염을 이루고 있는 화합물이다. 따라서 큰 분자량과 이온성을 고려할 때 GLC로는 분석이 불가능하여 HPLC로 분석한다. 자외선 영역의 최대 흡광파장은 245 nm이나 큰 분자량으로 인하여 검출감도가 낮고 (HPLC/UVD에서의 LOQ 약 4 ng) 최소 잔류허용기준은 0.03 mg/kg으로 엄격한 수준이므로 이에 합당한 분석 감도를 얻기 힘들다.

- Emamectin benzoate의 감도를 높이기 위하여 그림 1과 같은 형광유도체 형성반응을 이용한다. 즉, emamectin benzoate에 *N*-methylimidazole/trifluoroacetic anhydride 시약을 작용시켜 탈수반응을 시키면 분자구조 중 일부가 aromatic ring화되면서 형광유도체가 형성되며 이를 형광검출기로 분석하는 방법이다.

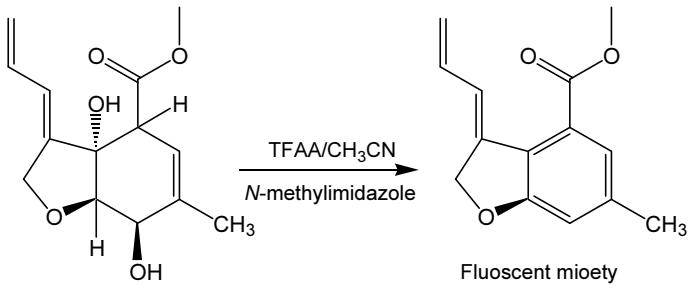


그림 1. Emamectin benzoate의 형광유도체 형성 반응

- 검체의 추출은 NaCl을 가하여 이온강도를 높인 상태에서 ethyl acetate로 수회 진탕 추출하는 방법을 사용한다. Emamectin benzoate는 이온성 화합물임에도 불구하고 이온부분을 제외한 비극성 분자부분이 상대적으로 매우 크기 때문에 화합물의 전체 극성은 비극성 (log P_{ow} 5.0) 성분에 해당한다.

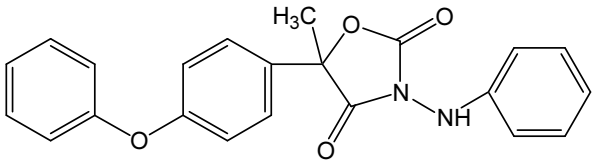
- 추출액은 수용액과 ethyl acetate 층으로 구성된 biphasic mixture이므로 분액여두에 옮겨 수용액 층을 버리고 유기용매 층을 농축한 후 약음이온교환 크로마토그래피로 정제한다. SPE-NH_2에서 emamectin benzoate는 이온강도가 높은 (ammonium acetate가 함유된) 극성용매에서 용출되므로 비극성의 간섭물질을 효과적으로 제거할 수 있다.

- 형광 고리화 반응시약은 수분에 매우 민감하므로 신속히 유도체 반응을 수행한다. 사용한 시약은 수분과 가급적 접촉되지 않는 조건에서 밀봉, 냉장 보존한다. 또한 형광 유도체 형성의 정상적 반응 유무를 재확인하기 위하여 유도체 형성전의 검체용액은 분할, 재 (再)분석이 가능하도록 보관하여야 한다.

8.4.38 잔류농약 분석법 4.1.4.60

파목사돈(Famoxadone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : famoxadone
화학명 (IUPAC) : 3-anilino-5-methyl-5-(4-phenoxyphenyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione
분자식 : $C_{22}H_{18}N_2O_4$
평균분자량 : 374.4
질량분석 시의 M+질량 : 374.1
Log P_{ow} : 4.65
물에 대한 용해도 (mg/L) : 0.24 (pH 5), 0.11 (pH 7), 0.038 (pH 9)
증기압 : 6.4×10^{-4} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

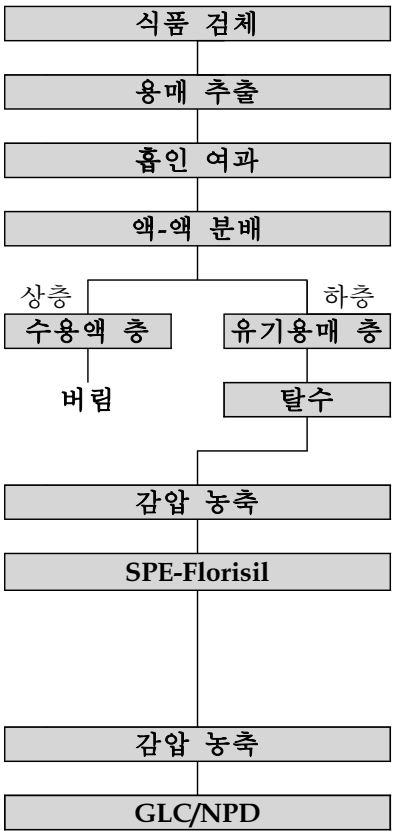
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Famoxadone	0.006	-	0.5~5.0	0.1~2.0	-	0.1	0.1

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가하여 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축 건고하고 Florisil column chromatography로 추가 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- Acetone 100mL + 50mL로 2회 추출
- 각 3분간 고속 마쇄 추출
- 10% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 acetone/*n*-hexane (5/95) 5mL에 재용해
- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 20mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 ethyl acetate 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 15 m, 1.5 μm)
칼럼온도 : 270℃
주입부 온도 : 240℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Famoxadone은 미생물 *Strobilurus tenacellus*로부터 추출된 천연항균물질 strobilurin의 유도체이다. 기존 살균제에 저항성인 병원균에 탁월한 약효를 나타내는 장점이 있어 최근에 이르러 그 사용량이 급증하고 있으며 곡류, 채소 및 과실에 광범위하게 사용되고 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약의 잔류분석법에서 저지방 검체에 대하여 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 acetone을 사용한다. Acetone은 US FDA법이나 AOAC법에서 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 유기인계 및 카바메이트계 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매로서 이미 많은 연구자들에 의하여 중간~비극성농약 추출에 그 효율과 재현성이 인정된 바 있다.

- 분배용매로는 대상농약들이 비극성인 중성 성분임을 감안하여 수용성 유기용매 추출액을 NaCl 수용액으로 희석하여 이온강도를 높인 후 (salting-out) 직접 비극성 용매 dichloromethane으로 분배하는 방법을 사용하며 famoxadone은 우수한 분배효율로 회수된다.

- 종실류 등 유지 검체에 대해서는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가로 적용하여 유지 및 비극성 간섭물질을 제거하여야 할 필요성이 있으나 일반 과실 및 채소검체에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략한다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거 효율이 우수한 Florisil을 사용한다. 이 분석법에서 용출액은 일부의 carotenoids 등이 함께 용출되어 황색을 띠나 그 정제 효과는 우수하다.

- Famoxadone은 분자 내에 2개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 GLC에서의 검출기로는 NPD를 사용한다. 감도는 그다지 뛰어나지 않으나 잔류허용기준을 판정하거나 분석법 기준 0.05 mg/kg까지는 용이하게 분석된다. 다만 휘발성이 비교적 낮고 분자 내

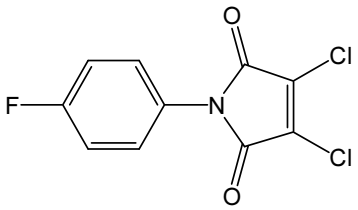
에 -NH기를 함유하고 있으므로 충분히 conditioning된 column을 사용하지 않을 경우 backward tailing 현상이 발생하거나 재현성이 불량해질 수 있다.

- Famoxadone은 HPLC로도 분석이 가능하다. 검출기로는 자외부흡광검출기를 사용하는데 최대흡광파장은 230 nm이며 흡광계수는 2×10^4 $cm^{-1}M^{-1}$ 정도이므로 충분히 감도가 높다. 화합물 분리에는 4~5 μm의 구형 silica 입자에 octadecylsilyl (C_{18})기를 결합시킨 column을 사용하며 이동상으로 acetonitrile/water 혼합액을 40/60 (v/v)~60/40 (v/v) 비율로 혼합하고 famoxadone의 머무름 시간이 10분 정도가 되도록 조절, 사용한다.

8.4.39 잔류농약 분석법 4.1.4.61

플루오로이미드(Fluoroimide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fluoroimide
화학명 (IUPAC) : 2,3-dichloro-*N*-4-fluorophenylmaleimide
분자식 : $C_{10}H_4Cl_2FNO_2$
평균분자량 : 260.1
질량분석 시의 M+질량 : 259.0
Log P_{ow} : 3.04
물에 대한 용해도 : 0.61 mg/L
증기압 : 3.4 mPa (25℃)
pKa : 비해리성

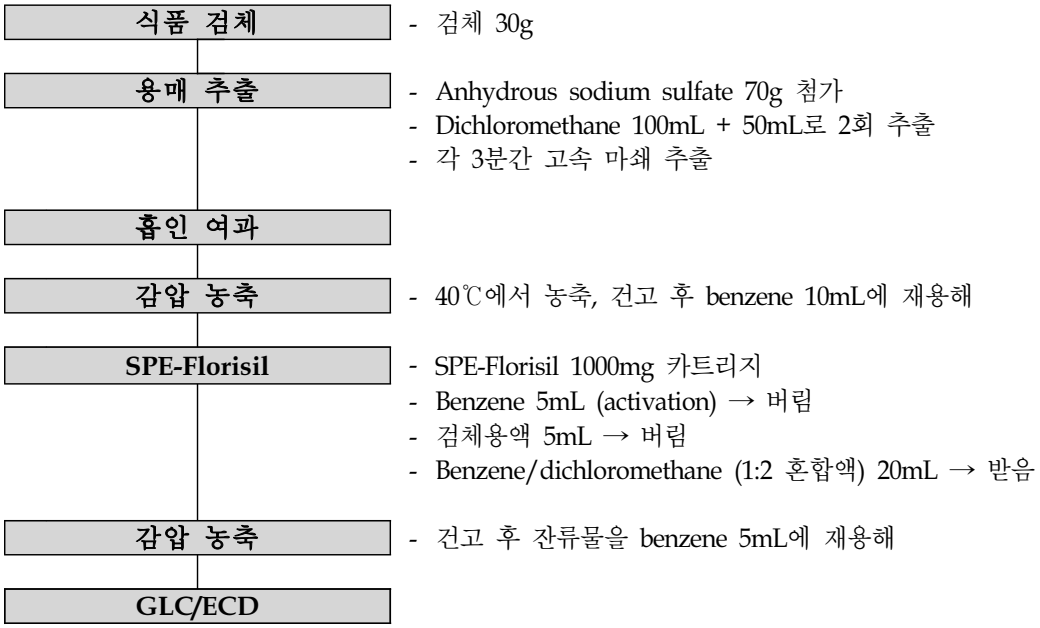
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fluoroimide	-	-	0.5	-	-	-	0.1

2) 분석법 개요

검체에 다량의 anhydrous sodium sulfate와 dichloromethane을 가하여 고속 마쇄, 검체 중 수분을 탈수하면서 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 감압 농축 한 후 SPE-Florisil로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25~0.53 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Fluoroimide는 비극성 농약이므로 함수 검체를 수용성 유기용매로 추출하는 것이 보편적이나 또 다른 방법으로 검체 탈수 후 비극성 용매로 직접 추출할 수도 있다. 즉, 다량의 anhydrous sodium sulfate를 사용하여 탈수한 후 dichloromethane이나 ethyl acetate로 직접 추출하는 것이 가능하며 효율은 수용성 추출용매인 acetone 등을 사용할 때와 거의 대등하다.

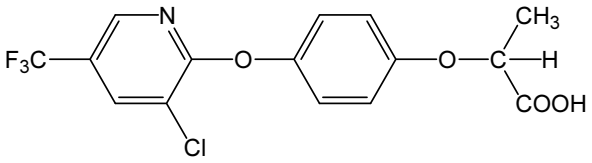
- Fluoroimide는 현재 과실 및 서류에만 잔류허용기준이 고시되어 있어 유지 검체는 분석 대상 검체가 아니나 유지 검체를 분석할 경우에는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 및 비극성 불순물의 양을 줄인다. 현미, 콩 등 유지 검체에 대해서는 불순물 제거효율이 높으나 저유지 검체인 배추, 사과 및 감자 등에 대해서는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법 의한 정제정도가 미미하며 불순물의 양도 상대적으로 적으므로 생략이 가능하다.

- 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 Florisil이 보편적이며 이 분석법에서도 정제 효과가 뚜렷하다. 용출용매로 benzene/dichloromethane을 사용하나 benzene의 건강 위해성이 염려될 경우에는 dichloromethane/acetonitrile/*n*-hexane 혼합액의 조합으로 대체 가능하다.

8.4.40 잔류농약 분석법 4.1.4.63

할록시포프(Haloxyfop)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : haloxyfop
화학명 (IUPAC) : (*RS*)-2-[4-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy) phenoxy]propionic acid
분자식 : $C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$
평균분자량 : 361.7
질량분석 시 haloxyfop-methyl ester의 M+질량 : 375.1
Log P_{ow} : 0.27 (pH 7)
물에 대한 용해도 (mg/L) : 28 (pH 5), 250,000 (pH 9)
증기압 : $<1.33\times10^{-3}$ mPa (25℃)
pKa : 2.9, 약산성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)*					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Haloxyfop	0.0003	-	-	0.05~0.1	0.05	-	-

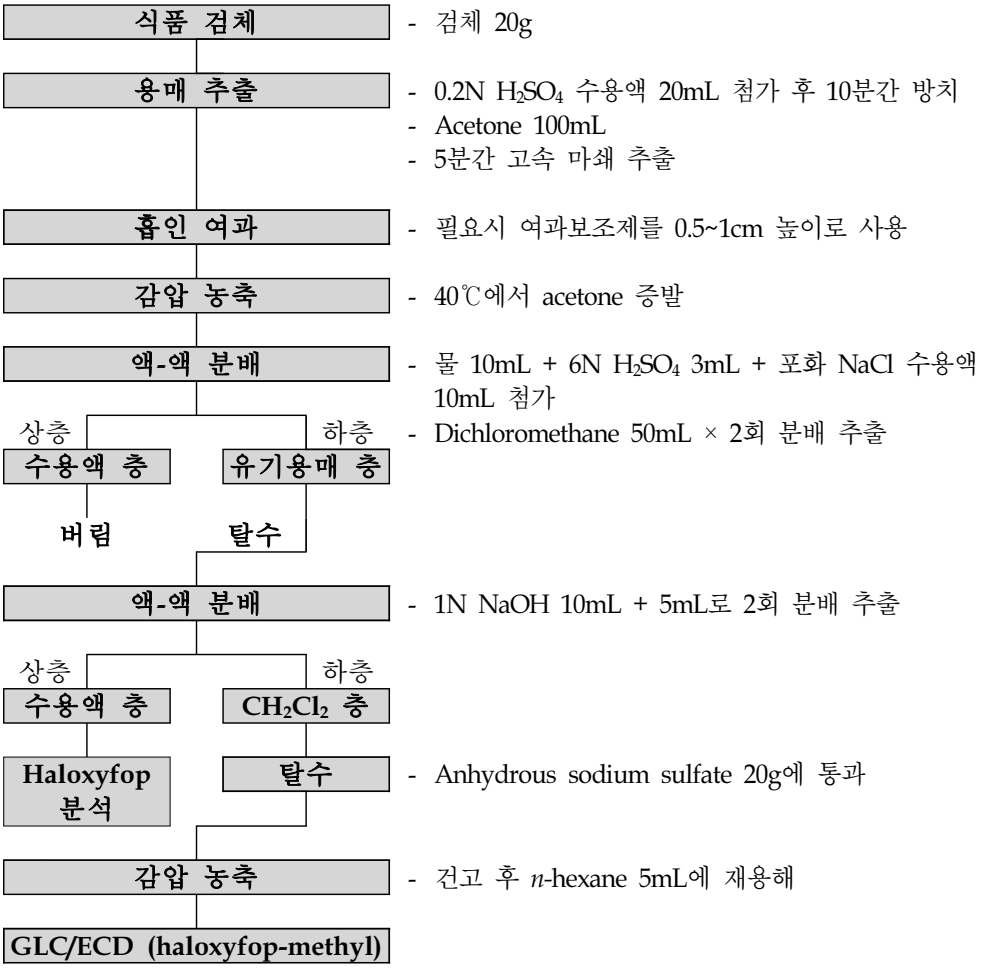
* Haloxyfop esters 및 conjugates 포함.

2) 분석법 개요

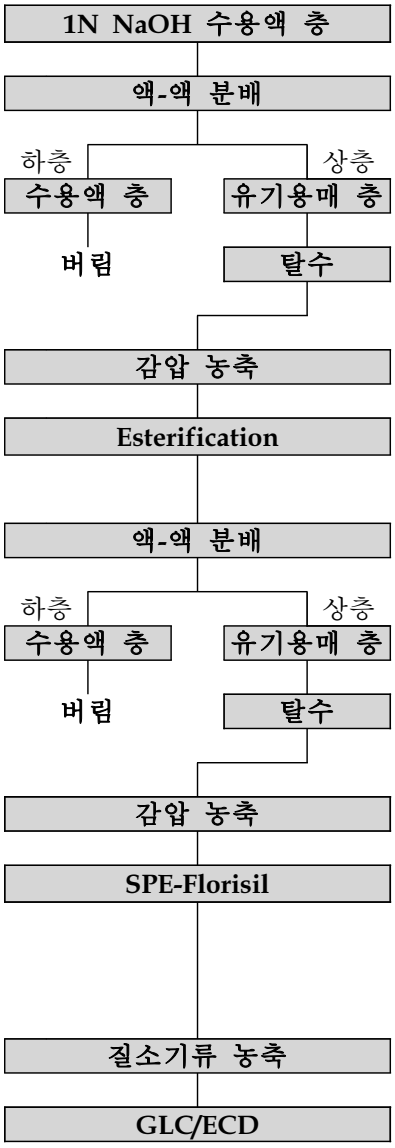
세절 검체를 산성화한 후 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 ester와 acid를 동시에 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 분액여두에 옮겨 산성화하고 포화식염수와 물을 가하여 희석한 후 dichloromethane으로 ester와 acid 모두

를 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 NaOH 수용액으로 추출하여 haloxyfop acid 분석에 공시하고, 남은 dichloromethane 층은 감압 농축 건고하고 *n*-hexane에 재용해하여 GLC/ECD로 haloxyfop-methyl을 분석한다. Haloxyfop acid가 포함된 NaOH 수용액 층은 H_2SO_4 수용액을 가하여 산성화하고 ethyl ether로 분배 추출한다. Ether 추출액을 감압 농축건고하고 BF_3/methanol 시약과 반응시켜 methyl ester를 형성한다. 반응액을 *n*-hexane으로 분배 추출하고 SPE-Florisil로 추가 정제하여 GLC/ECD로 유도체화한 haloxyfop-methyl ester를 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- Haloxyfop 분석



- 6N H_2SO_4 5mL 첨가
- Ethyl ether 10mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 10g에 통과
- 잔류물을 methanol 1mL에 재용해
- 14% Boron trifluoride (BF_3)/methanol 용액 1mL 첨가
- 밀봉 후 80℃에서 5분간 반응 후 방냉
- 5% Na_2SO_4 수용액 10mL + 물 5mL 첨가
- *n*-Hexane 20mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 acetone/hexane (10/90) 5mL에 재용해
- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 5mL + ethyl acetate/*n*-hexane (6/94) 5mL (pre-washing) + 검체용액 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (6/94) 20mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
질소·인검출기 (NPD)

분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.2~0.53 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Haloxyfop은 aryloxyphenoxypropionic acid계 제초제의 일종으로 일반 벼농사용 제초제와는 달리 단자엽 잡초를 효과적으로 방제하므로 일명 graminicide라고 불린다. 국내 및 전세계적으로 밭작물 재배 시 다양한 협엽 (狹葉) 잡초를 방제하기 위하여 단제 또는 혼합제의 형태로 많이 사용된다. Haloxyfop은 대부분 ester 형태의 중성 화합물 형태로 전면 살포되나 사용 후 환경이나 생체 중에서 빠른 속도로 가수분해되어 acid 형태로 전환되며, 이러한 acid 형태가 실제 유효성분으로 알려져 있다. 따라서 모화합물과 더불어 acid 형태의 대사산물이 대상 분석성분에 포함되어야 한다.

- Haloxyfop의 잔류분은 acid와 ester를 합하여 총량을 acid 기준으로 표시한다. 잔류허용기준은 0.05~0.1 mg/kg으로 상당히 낮으므로 잔류분석법 기준을 만족하기 위해서는 고감도 분석법이 필요하다. 물리화학적 특성은 ester와 acid 간에 대조적인 특성을 보여 ester는 비극성 화합물인 반면 acid는 약하게 해리하는 약산성 화합물이다. 따라서 이들 화합물들을 동시에 분석할 수 있는 분석기기는 현재 없으므로 검체 조제 과정 중 ester와 acid를 분리, 화합물별로 개별 분석하거나, ester를 acid로 전환하여 acid 총량 기준으로 분석하는 접근법이 이용된다.

- 본 분석법에서는 전자의 방법을 이용한다. 즉, haloxyfop-methyl은 모화합물의 형태로 GLC를 이용하여 직접 분석하며 acid는 ester와의 분리과정을 거친 후 methylation하여

methyl ester 형태로 분석한다. 따라서 기기분석성분은 모두 동일한 haloxyfop-methyl이 된다. Haloxyfop-methyl은 분자구조 내에 1개의 염소원자, 3개의 불소원자 및 1개의 질소원자를 포함하고 있어 GLC 분석 시의 검출기로는 ECD와 NPD를 이용할 수 있다.

- 검체로부터 비극성인 ester와 약산성인 acid 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 검체를 산성화한 후 acetone을 사용한다. Haloxyfop acid의 pKa는 2.9이므로 검체를 pH 1 이하로 산성화할 경우 acid는 이온 억압되어 유기용매 가용의 특성을 나타내게 되므로 acetone으로 충분히 추출이 가능하다. 이러한 산성조건에서 haloxyfop-methyl은 비교적 안정하나 추출 및 분배과정을 신속히 수행하여 분해 가능성을 최소화한다.

- 추출액을 농축한 후 ion-associated partition법을 이용하여 haloxyfop-methyl과 acid를 분리한다. 즉, haloxyfop acid는 약산성의 해리가능 화합물이므로 알칼리조건에서는 수용성, 산성에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 산성조건에서 액-액 분배하여 dichloromethane 층으로 ester와 acid를 모두 회수한 후 NaOH 수용액으로 분배하면 acid는 알칼리 수용액으로 분배되고 ester는 dichloromethane 층에 남게 된다. 이때 acid 분석 측면에서는 dichloromethane 층을 버림으로써 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거하게 된다. Haloxyfop은 NaOH 수용액을 재차 산성화하고 ethyl ether로 분배 추출하면 우수한 효율로 회수된다.

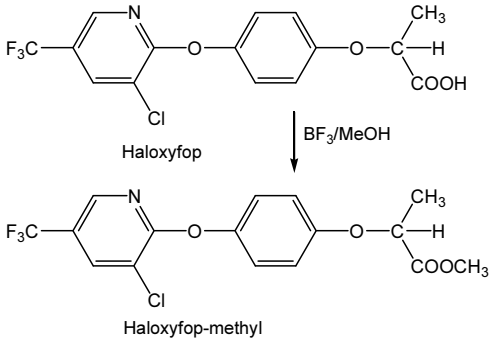


그림 1. Haloxyfop의 methyl ester 형성 반응

- Haloxyfop의 methyl ester를 생성하는 반응은 그림 1과 같다. 반응은 매우 신속하게 일어나 80℃에서 5분 이내에 종결된다. 반응용 시험관은 반응 시에 밀봉하는데 마개 안쪽 표면이 PTFE (Teflon™)로 lining된 것을 사용하여야 부반응 (side reaction)을 최

소화할 수 있다. BF_3/methanol 시약은 수분에 민감하므로 공기 중에 장기간 노출되는 것을 최소화하도록 신속하게 사용한 후 밀봉, 관리한다.

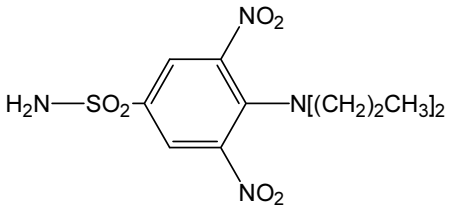
- Haloxyfop-methyl은 ion-associated partition 과정 중의 dichloromethane 층을 농축, 건고한 후 시험용액으로 하나 추출액의 정제정도가 불량할 경우에는 acid의 methylation 후 이용되는 SPE-Florisil 정제법을 동일하게 적용하여 추가 정제한다.

- GLC 분석 시에 제시된 검출기는 ECD와 NPD이나 haloxyfop-methyl 분자 내에 1개의 질소원자 만을 포함하고 있어 NPD에 대한 감도는 낮다. 반면에 1개의 염소원자와 3개의 불소원자를 포함하고 있어 ECD에 대한 감도는 NPD에 비하여 상당히 높으며 검출기의 안정성도 우수하다.

8.4.41 잔류농약 분석법 4.1.4.64

오리잘린(Oryzalin)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : oryzalin
화학명 (IUPAC) : 3,5-dinitro-N^4,N^4-dipropylsulfanilamide
분자식 : $C_{12}H_{18}N_4O_6S$
평균분자량 : 346.4
질량분석 시의 M+질량 : 346.1
Log P_{ow} : 3.73 (pH 7)
물에 대한 용해도 : 2.6 mg/L
증기압 : 〈0.0013 mPa (25℃)
pKa : 9.4, 약산성

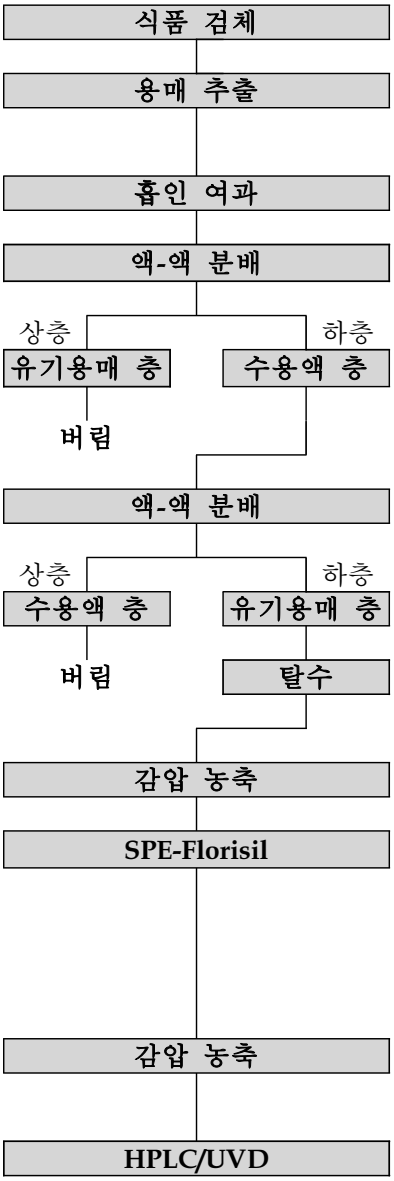
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Oryzalin	0.12	-	0.05	-	-	-	-

2) 분석법 개요

세절한 검체를 methanol로 고속마쇄, 추출하고 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가한 후 *n*-hexane으로 씻어버리고, dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 50g
- Methanol 300mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 포화 NaCl 수용액 60mL + 물 240mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL로 분배 추출하여 버림.
- Dichloromethane 60mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 dichloromethane 5mL에 재용해
- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (activation) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Dichloromethane 5mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (5/95) 10mL → 받음
- 건고 후 acetonitrile/water (50/50) 5mL에 재용해
- Membrane filter (PVDF)에 통과시켜 미세 여과

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : oryzalin이 약 18분에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : UV 290 nm
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Oryzalin은 dinitroaniline계의 화합물로서 잡초 발생전에 과수 및 밭작물의 잡초방제에 사용되는 선택성 제초제이다. 잔류허용기준은 0.05 mg/kg으로 엄격한 편이므로 고감도의 잔류분석법이 요구된다.

- Oryzalin은 pKa가 9.4인 매우 약산성의 중간 극성 화합물이므로 일반적 비해리 화합물에 대한 분석과정으로 검체 추출 및 정제가 가능하다. 단, benzenesulfonamide의 약한 해리성을 이용하여 효과적인 정제가 가능하다.

- 추출에는 비해리 화합물에 보편적으로 사용하는 acetone, acetonitrile 및 methanol 중 methanol을 사용한다. 대상화합물은 중간 극성이나 약하게 해리하는 특성을 가지고 있으므로 3개 용매 중 가장 극성이 큰 methanol을 사용하는 것이 추출 효율 측면에서 유리하며 함께 추출되는 비극성 간섭물질의 양도 적은 편이다.

- 액-액 분배 시에는 추출액에 포화식염수/물을 가하여 희석하고 먼저 *n*-hexane으로 세정하는 분배법을 적용한다. 이 조건에서 oryzalin은 *n*-hexane으로 분배되지 않으므로 유지 및 비극성 간섭물질을 효과적으로 제거할 수 있다. Oryzalin은 수용액 층을 dichloromethane으로 재차 분배 추출하면 비로소 유기용매 층으로 회수된다.

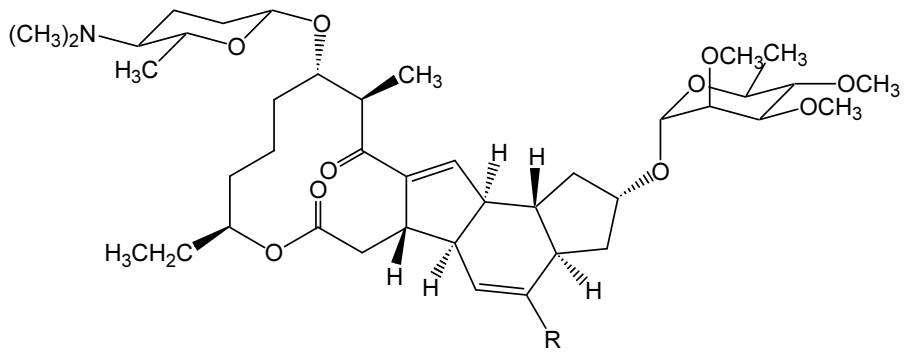
- Chromatography 정제에는 SPE-Florisil을 사용하며 정제 효과가 뚜렷하다. Oryzalin은 화합물 자체의 색깔이 진한 황색이므로 SPE-Florisil의 용출 체계를 점검할 경우 육안으로 쉽게 용출 양상을 확인할 수 있다.

- HPLC 분석 시에 oryzalin은 해리성이 미약하므로 이동상에 산을 첨가하지 않아도 sharp한 대칭성 peak를 얻을 수 있다. Oryzalin은 분자내의 nitro group 존재로 인하여 장파장의 발색단을 보유하고 있고 흡광계수도 높아 UVD를 이용, 고감도의 선택적 분석이 가능하다. 분석법에서는 머무름 시간을 18분으로 제시하였으나 acetonitrile 함량을 다소 높여 머무름 시간이 약 10분이 되도록 조절, 분석하여도 무방하다.

8.4.42 잔류농약 분석법 4.1.4.66

스피노사드(Spinosad)

1) 대상 농약의 특성



Spinosyn A,R=H-

Spinosyn D,R=CH_3-

일반명 (ISO) : spinosad

화학명 (IUPAC) : a mixture of (2*R*,3a*S*,5a*R*,5b*S*,9*S*,13*S*,14*R*,16a*S*,16b*R*)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-*O*-methyl-α-*L*-mannopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetradeoxy-β-*D*-erythropyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-14-methyl-1*H*-8-oxacyclododeca[*b*]*as*-indacene-7,15-dione (spinosyn A) and (2*S*,3a*R*,5a*S*,5b*S*,9*S*,13*S*,14*R*,16a*S*,16b*R*)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-*O*-methyl-α-*L*-mannopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetradeoxy-β-*D*-erythropyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-4,14-dimethyl-1*H*-8-oxacyclododeca[*b*]*as*-indacene-7,15-dione (spinosyn D)

조성 : spinosyn A 및 spinosyn D의 혼합물

분자식 : $C_{41}H_{65}NO_{10}$ (spinosyn A), $C_{42}H_{67}NO_{10}$ (spinosyn D)

평균분자량 : 732.0 (spinosyn A), 746.0 (spinosyn D)

질량분석 시의 M+질량 : 731.5 (spinosyn A), 745.5 (spinosyn D)

Log P_{ow} : 2.8 (pH 5), 4.0 (pH 7), 5.2 (pH 9) (spinosyn A),
3.2 (pH 5), 4.5 (pH 7), 5.2 (pH 9) (spinosyn D)

물에 대한 용해도 (mg/L) : : 235 (pH 7) (spinosyn A), 0.33 (pH 7) (spinosyn D)

증기압 (mPa) : 3.0×10^{-5} (25℃) (spinosyn A), 2.0×10^{-5} (25℃) (spinosyn D)

pKa : 8.1 (spinosyn A), 7.9 (spinosyn D)

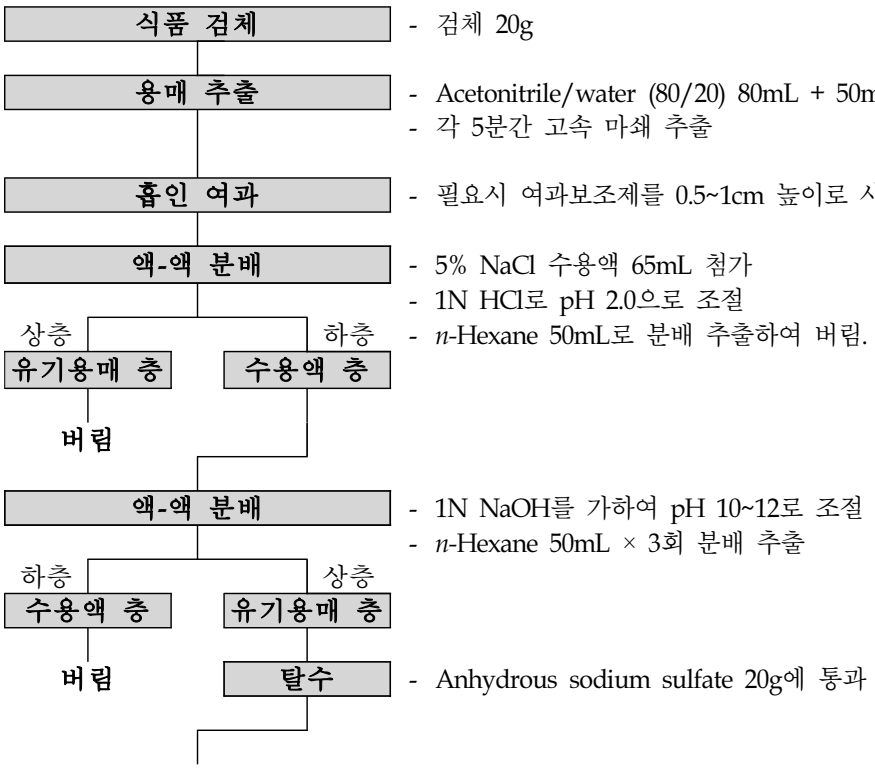
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

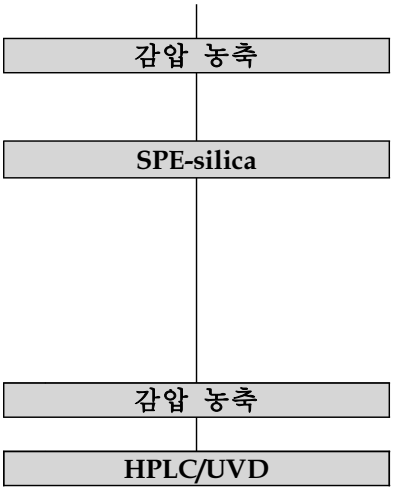
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Spinosad	0.02	-	0.05~1.0	0.1~5.0	-	-	0.1

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetonitrile/water 혼합액을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 감압 여과하고 ion-associated partition법을 이용하여 분배, 정제한다. 분배 추출액을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 건고 후 methanol/acetonitrile/2% ammonium acetate 수용액 (20/20/60) 5mL에 재용해
- SPE-silica 1000mg 카트리지
- Acetonitrile 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Acetonitrile 5mL → 버림
- Acetone 4mL → 버림
- Acetonitrile/trimethylamine (98/2) 10mL → 받음
- 건고 후 methanol/acetonitrile/2% ammonium acetate 수용액 (1/1/1) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/methanol/2% ammonium acetate (46/40/14, v/v/v)
이동상 유량 : spinosad A와 D가 약 12분과 15분 정도에서 유출하는 유속으로 조정한다.
검출기 파장 : UV 245 nm
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Spinosad는 방선균의 일종인 *Saccharopolyspora spinosa*의 배양액으로부터 추출되어 사용되는 천연 살충제로 과실 및 채소류의 해충 방제에 널리 사용된다. 잔효성이 짧은 접촉/식독제이므로 사용 및 잔류성 측면에서 유리한 농약이다. 잔류허용기준은 0.1~5.0 mg/kg으로 보편적 농약 수준이나 분자량이 732~746으로 타 농약에 비하여 2배 정도 크므로 상대적으로 고감도 분석법이 요구된다. 또한 spinosad의 유효성분은

spinosyn A와 D의 혼합물로 구성되어 있어 분석성분은 2개 성분이다.

- Spinosad는 분자구조 내 당류 (糖類)에 결합되어 있는 dimethylamine으로 인하여 약하게 해리하는 약염기성 화합물이다. 분자량이 크고 휘발성이 낮으며 해리성 화합물이므로 기기분석에는 HPLC를 이용한다. 또한 자외선 영역 245 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다. 이동상은 이온억압조건으로 사용하는데 spinosad 짝산의 pKa가 7.9~8.1 범위이므로 이동상의 pH를 7.0 정도로 설정하고 염농도를 첨가, 이온강도를 높이면 sharp한 대칭형 peak를 얻을 수 있다.

- 검체 추출에는 비해리 화합물에 보편적으로 사용하는 용매인 acetonitrile의 수용액을 사용한다. 대상화합물은 약하게 해리하는 특성을 가지고 있어 극성이 산도에 따라 중간~비극성 범위에서 변화하므로 물을 첨가, 극성을 높여 사용하는 것이 추출 효율 측면에서 유리하며 함께 추출되는 비극성 간섭물질의 양도 적은 편이다.

- 액-액 분배은 대상 화합물의 약염기 특성을 이용, ion-associated 분배법을 적용하여 효과적으로 간섭물질을 제거한다. 즉 추출액을 산성화한 후 비극성 용매로 분배 추출하여 버림으로써 유지 및 비극성 간섭물질을 제거한다. 수용액 층의 산도를 약알칼리성으로 조절하고 재차 비극성 용매로 분배 추출하면 spinosad는 회수된다.

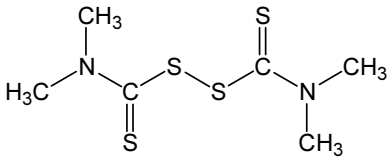
- 추가 정제법으로는 SPE-silica의 흡착크로마토그래피법을 이용한다. Spinosad는 약염기성이므로 silica 표면의 hydroxyl 활성기와 강하게 흡착, 일상적 유기용매로는 용출되지 않으므로 간섭물질을 효과적으로 제거할 수 있다. Spinosad는 약염기가 함유된 극성 용매를 흘려보내어 용출시킬 수 있다.

- Spinosad는 안정성이 떨어져 분석 중에 분해될 가능성이 높다. 특히 광분해가 심하므로 필요할 경우 실험실 조명조차도 일부 변경하여야 한다. 분석 과정은 신속히 수행하며 대부분의 간섭물질이 ion-associated partition 과정에서 제거되므로 일상적 검체는 SPE-silica의 추가 정제법을 생략하는 것이 가능하다.

8.4.43 잔류농약 분석법 4.1.4.67

티람(Thiram)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : thiram
화학명 (IUPAC) : tetramethylthiuram disulfide; bis(dimethylthiocarbamoyl) disulfide
분자식 : $C_6H_{12}N_2S_4$
평균분자량 : 240.4
질량분석 시 M+질량 : thiram 240.0, *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate 211.1
Log P_{ow} : 2.1
물에 대한 용해도 : 16.5 mg/L (20℃)
증기압 : 2×10^{-2} mPa (25℃)
pKa : 8.19

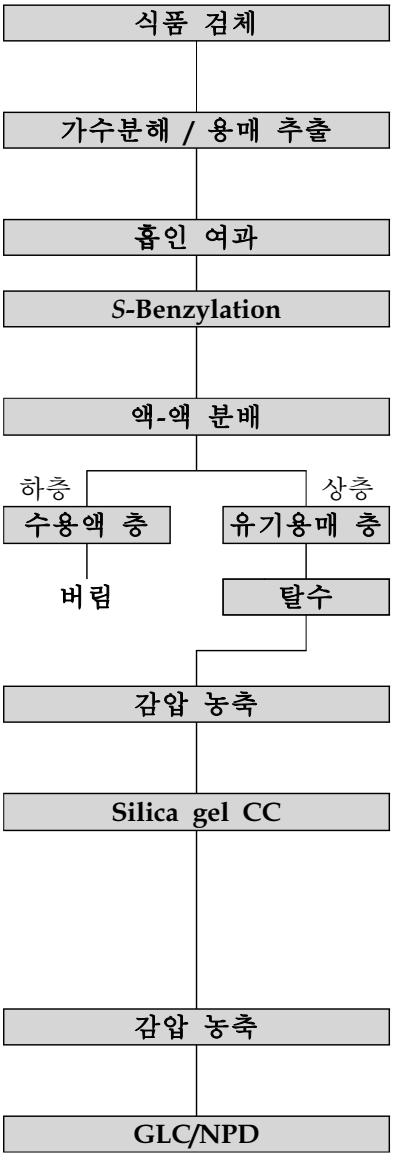
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Thiram	0.01	-	10.0	-	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물 검체에 NaOH 수용액과 methanol을 가하여 교반, thiram을 sodium *N,N*-dimethyldithiocarbamate로 알칼리 가수분해한다. 가수분해물을 흡인 여과하고 여액에 benzyl chloride를 첨가하여 *S*-benzylation한다. 반응물에 NaCl 수용액을 첨가하고 생성된 유도체를 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 분배액을 감압 농축하고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 50g
- 콩류의 경우 5g에 증류수 10mL를 가한 후 2시간 방치

- 2N NaOH 수용액 50mL + methanol 100mL
- 30분간 교반

- 잔류물을 methanol/증류수 (50/50) 50mL로 씻어 합침

- Benzyl chloride 0.5mL 첨가
- 가끔 교반하면서 3시간 방치

- 4% NaCl 수용액 100mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃이하에서 감압 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

- Silica gel (60~80mesh, 5% 함수) 10g (내경 15mm)
- *n*-Hexane 100mL로 습식 충전 → 버림
- 검체액 5mL → 버림
- *n*-Hexane 10mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (10/90) 100mL → 받음

- 40℃이하에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)

분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.2~0.53 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 180℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Thiram은 dimethyldithiocarbamate계 살균제로 다양한 작물에서 발생하는 병해 방제와 종자 소독을 위하여 널리 사용된다. 보호용 살균제로 특이한 살균 작용점은 알려져 있지 않으나 광범위한 곰팡이 병에 대하여 예방 효과를 나타낸다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물로서 ethylene thiourea가 보고된 바 있으나 생성량이 미미한 것으로 평가, 현재는 이를 포함하고 있지 않으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Dithiocarbamate계 살균제는 화학 구조에 따라 dialkyldithiocarbamate계와 alkylenebisdithiocarbamate계로 구분하는데 산 분해 반응에 의하여 모두 carbon disulfide를 방출한다. 따라서 총 dithiocarbamate계 살균제의 잔류량은 산 분해 반응에 의하여 발생되는 carbon disulfide를 기준으로 표시한다. 제시된 분석법은 국내에서 주로 사용되는 thiram을 주 대상 성분으로 하나 그 외 *N,N*-dimethyldithiocarbamate moiety를 함유하고 있는 dithiocarbamate계 살균제가 통합되어 분석된다.

- Thiram은 log P_{ow}가 2.1인 중간 극성의 화합물이고 증기압이 2×10^{-2} mPa (25℃)로 휘발성이 어느 정도 있으나 분자 내 disulfide 결합이 취약하여 열분해되므로 GLC로 직접 분석하기 어렵다. 따라서 안정한 형태의 유도체로 전환하여 분석한다. 즉, 검체 중의 thiram 잔류분을 알칼리 가수분해하여 sodium *N,N*-dimethylcarbamate를 생성하고 이를 benzylation하여 열에 비교적 안정한 *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate로 전환, GLC로 분석한다.

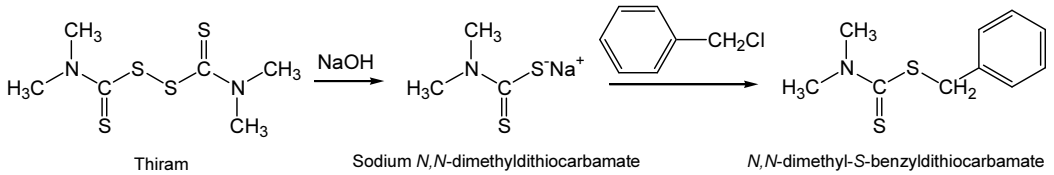


그림 1. Thiram의 가수분해 및 유도체 생성 반응

- 검체에 NaOH 수용액/methanol 혼합액을 가하고 교반하여 thiram을 가수분해한다. Thiram은 알칼리조건에서 신속히 가수분해되어 *N,N*-dimethylcarbamic acid를 생성함과 동시에 NaOH와의 산-염기 반응에 의하여 sodium salt를 생성한다. Carbamic acid 자체로는 불안정하여 다시 dimethylamine과 carbon disulfide로 분해되나 sodium salt를 형성하면 비교적 안정하다.

- 생성된 sodium *N,N*-dimethylcarbamate는 benzyl chloride와 반응시켜 *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate를 생성시킨다. 이 반응은 전형적인 친핵성 치환반응인데 dithiocarbamic anion은 좋은 친핵체이므로 1차의 benzylic carbon을 공격, chloride를 용이하게 이탈시킨다. 생성된 유도체는 비해리성의 비교적 안정한 화합물이므로 충분히 GLC로 분석이 가능하다.

- 최종적으로 분배 추출액은 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. 생성된 *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate의 분해 가능성을 최소화하기 위하여 silica gel은 deactivation하여 사용하며 낮은 용출 강도의 용매를 사용하여 대상 성분을 신속히 용출시키는데 상당량의 간섭물질이 column에 포집되어 제거된다.

- GLC column은 비극성의 liquid phase를 사용하여 비교적 빠르게 대상 성분을 유출시킨다. *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate는 분자 내에 질소와 황 원자를 각각 1개 및 2개 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD와 FPD (sulfur mode)를 사용할 수 있다. NPD를 우선적으로 제시하였으나 FPD를 사용하여도 무방하다. FPD의 sulfur mode에서는 S_2에 의한 감응성으로 인하여 주입량/peak 면적 간 비례곡선은 2차함수로 나타난다. 따라서 peak 면적의 제곱근을 주입량과 회귀시켜 직선적 검량선을 얻도록 한다. 또한 GLC에서 검체 분석은 정량 분석의 재현성을 확보하기 위하여 가급적 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법의 사용을 권장한다.

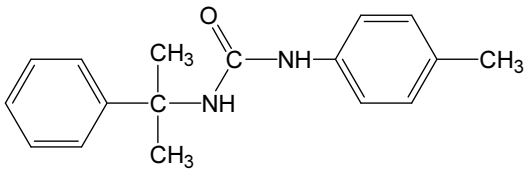
- 분석성분이 *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate이므로 유도체를 합성하여 표준품으로 사용할 경우에는 thiram과의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.

  Thiram 잔류량 (mg/kg) = *N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate 잔류량 (mg/kg) × (thiram 분자량 240.4) / (*N,N*-dimethyl-*S*-benzyldithiocarbamate 분자량 211.4)

8.4.44 잔류농약 분석법 4.1.4.68

다이므론(Dymron)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : daimuron, dymron (JMAF)
화학명 (IUPAC) : 1-(1-methyl-1-phenylethyl)-3-*p*-tolylurea; 1-(α,α-dimethylbenzyl)-3-*p*-tolylurea
분자식 : $C_{17}H_{20}N_2O$
평균분자량 : 268.4
질량분석 시의 M+질량 : 268.2
Log P_{ow} : 2.7
물에 대한 용해도 : 1.2 mg/L (20℃)
증기압 : 4.53×10^{-4} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

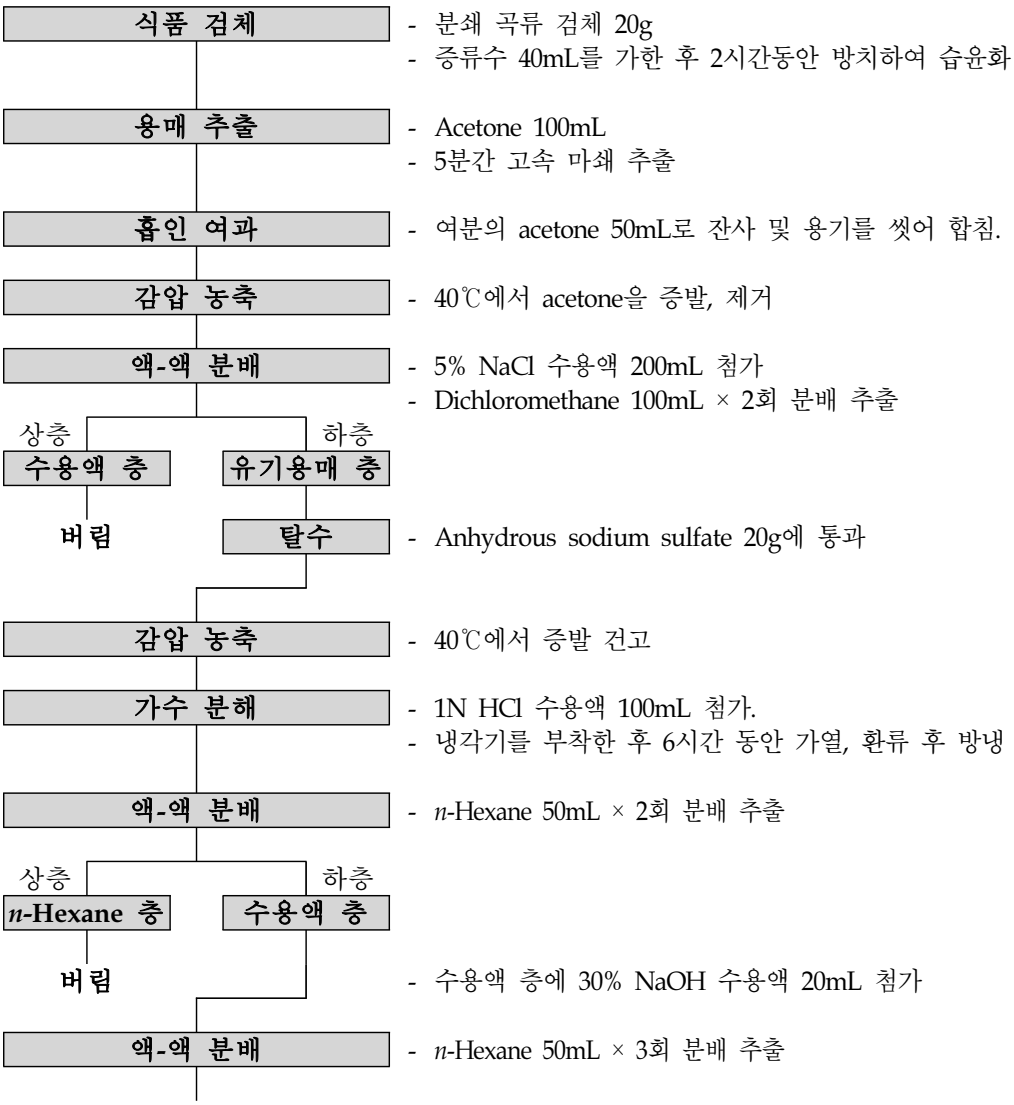
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Daimuron	0.3	0.05	-	-	-	-	-

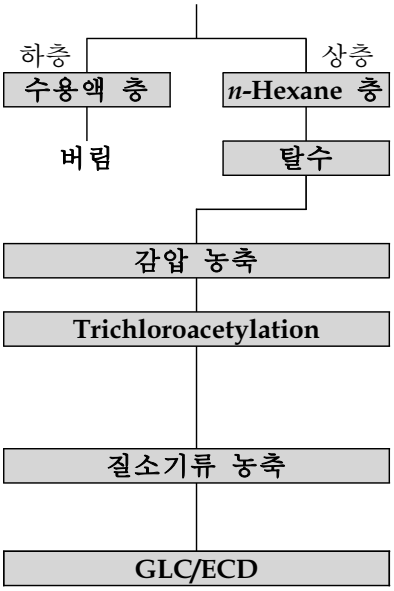
2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 곡류 검체에 acetone을을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 농축하고 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 산성조건에서 환류, 가수분해산물인 *p*-toluidine을 생성시킨다. 산성 반응액을 *n*-hexane으로 분배, 세정하고 수용액 층

의 산도를 알칼리조건으로 조절한 후 *n*-hexane으로 *p*-toluidine을 분배 추출한다. 추출액을 탈수, 감압 농축하고 trichloroacetylation하여 생성된 유도체 1,1,1-trichloro-4'-methylacetanilide를 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- *n*-Hexane에 녹인 1% trichloroacetyl chloride 용액 4방울 + acetone에 녹인 0.1% pyridine 용액 4방울
- 밀봉 후 가끔 교반하면서 실온에서 1시간동안 반응
- 40℃에서 증발 건고
- *n*-Hexane 20mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 280℃까지 온도를 상승시켜 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Dymron은 세포분열 저해에 의하여 잡초를 방제하는 phenylurea계 선택성 제초제이다. 주로 벼 재배 시에 잡초 발아전 또는 잡초 발아후 초기 처리용으로 사용되는데 단제보다는 혼합제의 한 성분으로 포함되어 입제 또는 액상수화제 형태로 수면에 살포

된다. 생체나 환경 중 독성 대사산물은 없으므로 잔류분은 전적으로 모화합물로 정의된다.

- Dymron은 log P_{ow}가 2.7인 중간 극성의 중성 화합물이며 증기압은 4.53×10^{-4} mPa 이므로 비휘발성이다. 대상 화합물은 휘발성이 낮고 분자구조 내에 urea기를 함유하고 있으므로 흡착 및 열분해 가능성으로 인하여 직접 GLC로 분석하기는 어렵다. 따라서 검체 추출 및 액-액 분배에 의한 정제 후에 모화합물을 가수분해하여 *p*-toluidine을 생성시킨다. 가수분해산물을 ion-associated partition에 의하여 추가 정제한 후 perchloroacylation 반응을 수행하여 전자포획성 유도체를 형성하고 이를 GLC/ECD로 분석한다. 가수분해 및 유도체 형성반응은 그림 1과 같다.

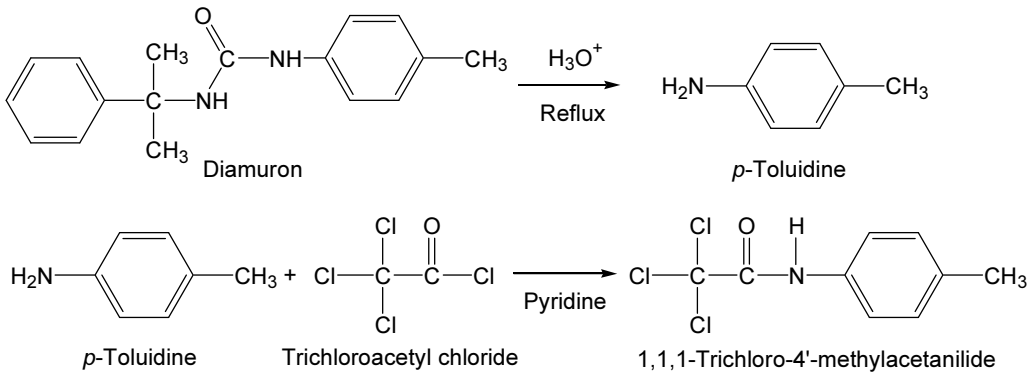


그림 1. Daimuron의 가수분해 및 유도체 형성반응

- 검체 중 모화합물을 추출하기 위한 용매로는 비극성 농약의 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 acetone을 사용한다. 분석 대상이 건조 검체인 곡류이므로 수용성 유기용매 추출법에서 우수한 추출 효율을 얻기 위해서는 acetone 추출 전에 미리 증류수를 가하여 10분간 방치, 습윤화 과정을 수행하는 것이 필수적이다. 추출 농축액의 조정제 (組精製)를 위한 액-액 분배는 대상성분이 중간 극성의 중성 성분임을 감안하여 dichloromethane으로 2회 분배 추출하는 방법을 이용하며 추출효율은 95% 이상이다.

- 분배 추출액의 건고물에 1 N의 hydrochloric acid를 가하고 6시간 동안 가열, 환류하여 Dymron의 amide기를 가수분해, 정량적으로 *p*-toluidine을 생성시킨다. *p*-Toluidine은 염기성 화합물이므로 ion-associated partition 과정에 의하여 반응액을 정제한다. 즉,

산성의 반응용액에서 *p*-toluidine은 protonation되어 4차 암모늄 이온 형태로 수용성을 나타내므로 *n*-hexane과 같은 유기용매로 분배 추출하더라도 여전히 수용액 층에 존재한다. 이러한 hexane 세정과정에 의하여 비극성의 불순물을 제거한다. 남은 수용액층에 염기를 가하여 산도를 알칼리성으로 조절하면 *p*-toluidine은 protonation이 억압, 유기용매 가용성인 중성의 화합물 형태가 되므로 *n*-hexane과 같은 유기용매로 분배 추출되며 수용성 불순물이 제거된다. 이러한 해리 특성을 이용한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이어서 흡착크로마토그래피와 같은 별도의 정제법을 추가하지 않더라도 기기분석이 가능하다.

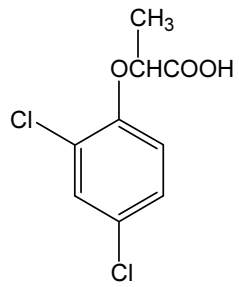
- *p*-Toluidine은 해리성 화합물이므로 GLC 상 크로마토그래피 특성이 좋지 않을 뿐만 아니라, GLC에서 주로 이용되는 선택성 고감도 검출기 중 ECD 및 FPD에는 반응을 나타내지 않고 분자 내에 질소 원자 1개만을 함유하고 있어 NPD에서의 감도도 열등하다. 따라서 크로마토그래피 특성의 개선과 감도 향상을 위하여 유도체 형성법을 이용한다. 그림 1에 나타낸 반응은 carbonyl group을 함유한 화합물에서 전형적인 nucleophilic substitution 반응이다. 즉, acid chloride 시약 (trichloroacetyl chloride)에 nucleophile로서 *p*-toluidine을 치환 반응시키며 pyridine은 HCl scavenger로서 반응의 산물로 함께 생성되는 HCl을 포집, 평형 반응의 완결을 위한 염기이다.

- 형성된 유도체에는 3개의 염소 원자가 포함되므로 GLC 분석 시에 ECD에 대한 감도가 매우 뛰어나다. 또한 검체 분석은 splitless 검체주입법/승온조건을 사용하여 분리능 및 감도를 향상시킨다. 유도체의 GLC 상 정량한계는 수십 picogram 혹은 그 이하이므로 최종 검체용액의 부피는 곡류에 대한 잔류허용기준 0.05 mg/kg으로부터 요구되는 분석법의 정량한계 0.02 mg/kg 수준으로 적절히 조절한다. 반응액을 과다하게 농축할 경우 반응 불순물에 의한 간섭이 우려되므로 추가의 정제과정이 요구된다.

8.4.45 잔류농약 분석법 4.1.4.69

디클로르프로프(Dichlorprop)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : dichlorprop
화학명 (IUPAC) : (*RS*)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid
분자식 : $C_9H_8Cl_2O_3$
평균분자량 : 235.1
질량분석 시 dichlorprop-2,2,2-trichloroethyl ester의 M+질량 : 363.9
Log P_{ow} : 1.11 (pH 5), 〈1 (pH 7 및 9)
물에 대한 용해도 : 350 mg/L
증기압 : 〈1×10^{-2} mPa (20℃)
pKa : 3.00, 약산성

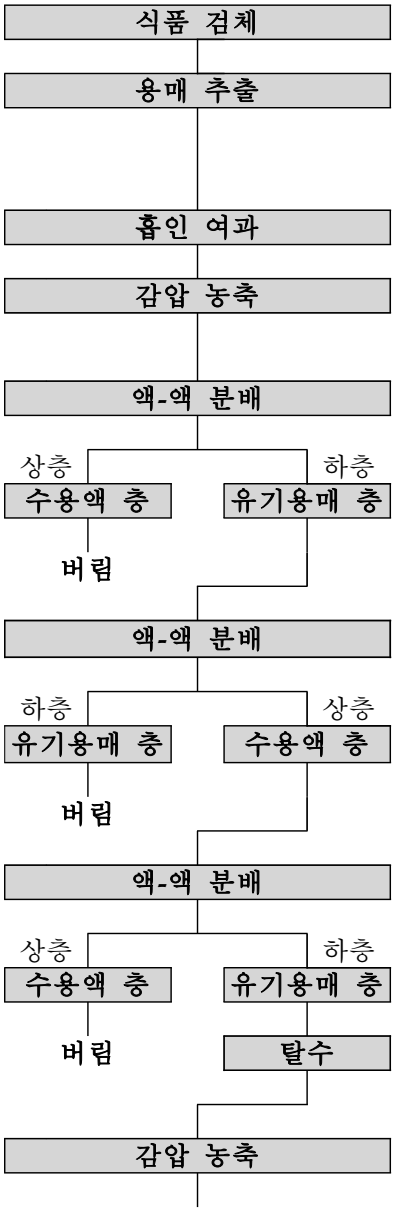
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Dichlorprop	0.031	-	0.05	-	-	-	-

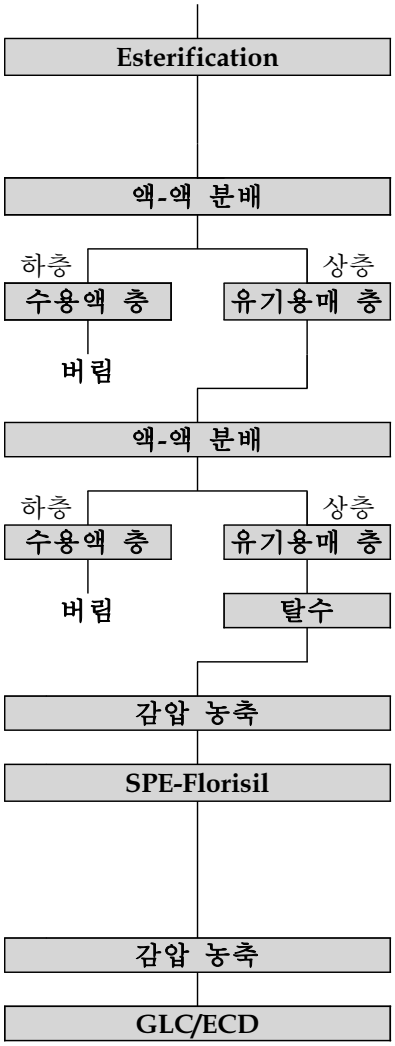
2) 분석법 개요

세절 검체를 산성화한 후 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 pH 조절에 의한 세척 및 추출과정으로 구성된 ion-associated partition법으로 정제한다. Acid 분자내의 carboxylic acid 작용기를 2,2,2-trichloroethyl ester화한 후 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- 6N HCl 수용액 5mL 첨가
- Acetone 60mL로 추출
- 30분간 진탕 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 20ml로 농축
- 0.5N HCl 50mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- 2% $NaHCO_3$ 수용액 50mL × 2회 분배 추출
- 6N HCl 약 8mL를 첨가하여 pH 2로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과



- 2,2,2-Trichloroethanol 0.5mL + pyridine에 용해한 2% *N,N'*-dicyclohexylcarbodimide (DCC) 0.5mL 첨가 후 밀봉
- 실온에서 하룻밤 반응

- 반응액을 *n*-hexane 50mL와 2% $NaHCO_3$ 50mL로 씻어 분액여두에 옮기고 진탕

- 0.2N HCl 수용액 50mL 첨가하여 산성화한 후 진탕

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃에서 약 10mL로 농축

- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 10mL (activation) + 검체용액 → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 5mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (15/85) 20mL → 받음

- 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 280℃

검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- 대상성분은 phenoxyalkanoic acid계의 생장조절제로서 국내에서 장기간 널리 사용해 온 auxin 유사활성의 화합물이다. 이들 phenoxyalkanoic acid 화합물들은 carboxylic acid기로 인하여 GLC로 직접 분석하기는 힘들다. 또한 자외 영역의 흡수파장이 짧으며 형광 특성도 없으므로 통상적 HPLC법으로도 분석이 어렵다. 따라서 주로 사용되는 분석법은 분자 내에 chlorine 원자가 있다는 점에 착안하여 carboxylic acid를 ester화, 휘발성을 높여 GLC/ECD로 분석하는 것이 보편적이다.

- ECD에 대한 감도를 향상시키기 위해서 haloalcohol을 반응시키는데 이 분석법에서 이용한 ester 반응은 그림 1과 같다. 이러한 유도체를 형성할 경우 dichlorprop 분자는 추가로 3개의 염소 원자를 함유하므로 ECD에 대한 감도가 크게 증대된다.

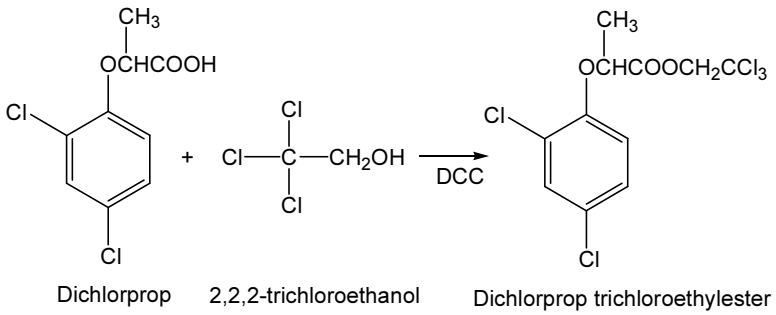


그림 1. Dichlorprop의 trichloroethyl ester 형성 반응

- 검체로부터 dichlorprop을 추출하기 위한 용매로는 검체를 산성화한 후 acetone을 사용한다. Dichlorprop의 pKa는 3.0이므로 검체를 pH 1 이하로 산성화할 경우 acid는

이온 억압되어 유기용매 가용의 특성을 나타내게 되므로 acetone으로 충분히 추출이 가능하다.

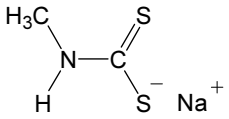
- 분배 정제과정은 pH 조절에 의한 ion-associated partition법을 사용한다. 즉, acid 대상 성분은 약산성의 해리가능 화합물이므로 알칼리조건에서는 수용성, 산성에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 알칼리조건에서 유기용매로 분배하여 버림으로써 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거 할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 산성으로 조절하면 대상 acid 성분은 유용성의 비해리 형태가 되므로 NaCl 수용액을 첨가하여 ionic strength를 보다 증대시켜 유기용매로 분배하면 우수한 분배 효율로 회수할 수 있다.

- Trichloroethylation을 수행하면 검체로부터 함께 추출되는 간섭물질 중 carboxylic acid 작용기를 보유한 유기 산성물질도 함께 ester화되어 3개의 chlorine 원자를 보유하게 되므로 ECD에 대한 높은 반응을 나타낸다. 따라서 검체의 chromatogram은 비록 Florisil column chromatography를 수행, 정제되었다 하더라도 그다지 깨끗하지는 않다. 그러나 형성된 대상성분의 감도가 매우 뛰어나므로 검체 용액을 적절히 희석하여 분석하면 큰 문제는 없다. 시약 중 DCC는 수분에 의하여 분해되므로 취급 및 보관에 주의를 요한다.

8.4.46 잔류농약 분석법 4.1.4.70

메탐-소디움(Metam-sodium)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metam-sodium
화학명 (IUPAC) : sodium methyldithiocarbamate
분자식 : $C_2H_4NNaS_2$
평균분자량 : 129.2
Log P_{ow} : 〈1 (25℃)
물에 대한 용해도 : 722000 mg/L (20℃)
증기압 : Non-volatile

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

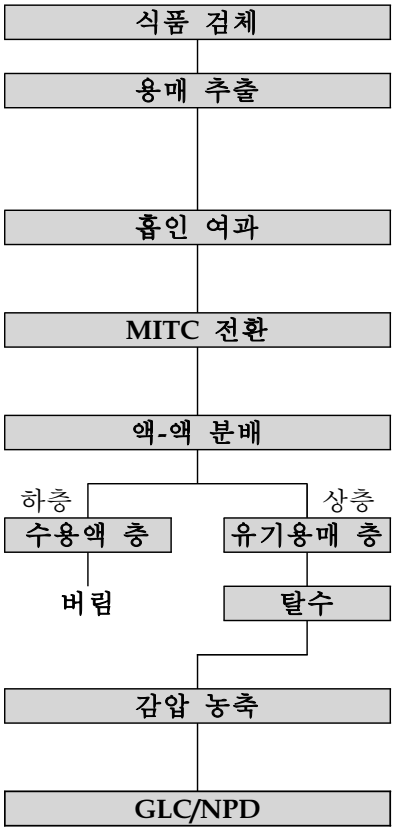
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metam-sodium	0.001~0.01	-	-	0.05	-	-	-

* BfR, 2006 및 US EPA, 1994.

2) 분석법 개요

세절 또는 분쇄 검체에 EDTA 완충용액 (pH 7)과 methyl bromoacetate를 가하고 고속 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액에 염산 수용액을 가하여 pH 4로 산성화하고 교반, metam을 정량적으로 methyl isothiocyanate (MITC)로 전환시킨다. MITC 전환 추출액을 분액여두에 옮겨 diisopropyl ether로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수하고 diethylene glycol을 keeper로 사용, 감압 농축하여 일정량으로 조절한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 20g
- 0.05M EDTA 완충 수용액 (pH 7) 170mL + methyl bromoacetate 1mL 첨가
- 20초간 고속 마쇄 추출
- 여분의 0.05M EDTA 완충용액 30mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 5분간 교반 후 2M HCl 수용액을 가하여 pH 4로 조절
- 실온에서 90분간 교반
- Diisopropyl ether 100mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetone에 녹인 5% diethylene glycol 용액 1mL 첨가
- 40℃에서 10mL로 농축

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 280℃까지 온도를 상승시켜 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min

주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Metam은 식용작물의 식재 전에 토양 살균, 살충, 살선충 및 제초를 목적으로 사용하는 토양훈증제로서 methylisothiocyanate (MITC, H_3C-N=C=S) 전구물질 (前驅物質, precursor)이다. 즉, 살포 후 유효성분은 신속히 MITC로 전환되며 이 MITC가 실제 유효 성분이다. Metam은 모화합물인 methyldithiocarbamic acid의 안정화를 위하여 sodium 및 ammonium염의 형태로 사용되는데 고농도액일 경우 비교적 안정하나 희석하여 낮은 농도로 존재하거나 산성조건일 경우 용이하게 분해된다. 따라서 모화합물 상태로는 분석이 어려우므로 MITC로 전환, 분석한다.

- Metam은 물에 대한 용해도가 높으며 산성조건에 빠르게 분해되므로 검체 추출은 pH가 중성으로 조절된 EDTA 완충 수용액으로 추출한다. 첨가제로 사용하는 methyl bromoacetate ($BrCH_2COOCH_3$)는 최루제(lachrymator)이므로 사용에 주의한다.

- 추출액에 함유된 metam은 산성조건에서 교반하면 정량적으로 용이하게 MITC로 전환된다. MITC는 log P_{ow}가 1.37인 화합물이므로 alcohol이나 ether에 쉽게 가용되므로 diisopropyl ether로 분배 추출이 가능하다. MITC는 증기압이 2.13 kPa로 휘발성이 상당히 높으므로 농축 시에는 반드시 keeper solution을 사용하며 과다한 농축이나 건고를 할 경우 대상성분의 손실이 발생하므로 세심한 주의가 필요하다.

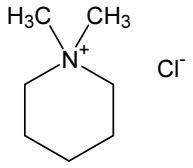
- MITC 분자 내에는 질소와 황원자를 각각 1개씩 함유하고 있으므로 GLC 분석 시의 검출기로는 NPD와 FPD가 가능하다. FPD는 sulfur mode로 사용하는데 선택성 및 안정도는 NPD보다 우수하나 감도가 낮고 peak 면적이 주입량의 제곱에 비례하므로 정량과정이 다소 불편한 단점이 있다. GLC에서 검체 분석은 splitless 검체주입법/승온조건을 사용하여 분리능 및 감도를 향상시킨다.

- 분석성분이 MITC이므로 MITC 표준품을 사용할 경우에는 metam과의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.
  Metam-sodium 잔류량 (mg/kg) = MITC 잔류량 (mg/kg) × (metam-sodium 분자량 129.2) / (MITC 분자량 73.1)
  Metam-ammonium 잔류량 (mg/kg) = MITC 잔류량 (mg/kg) × (metam-ammonium 분자량 124.2) / (MITC 분자량 73.1)

8.4.47 잔류농약 분석법 4.1.4.71

메피쿼트 클로라이드(Mepiquat chloride)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : mepiquat chloride
화학명 (IUPAC) : 1,1-dimethylpiperidinium chloride
분자식 : $C_7H_{16}ClN$
평균분자량 : 149.7
질량분석 시 1-methyl piperidine의 M+질량 : 99.1
Log P_{ow} : -3.55 (pH 7)
물에 대한 용해도 : 〉50% w/w (20℃)
증기압 : 〈1×10^{-11} mPa (20℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

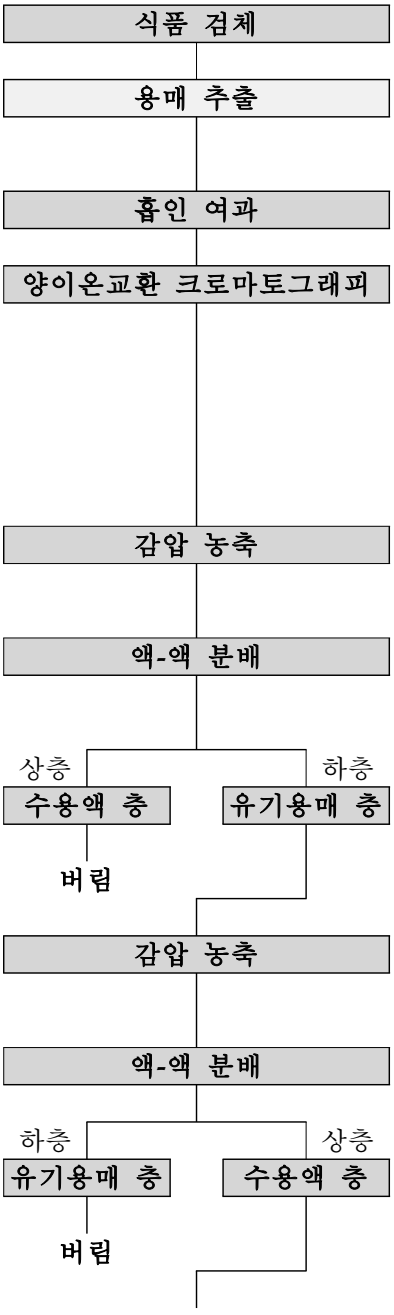
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Mepiquat chloride	0.2	-	0.5	-	-	-	-

* EC (2008).

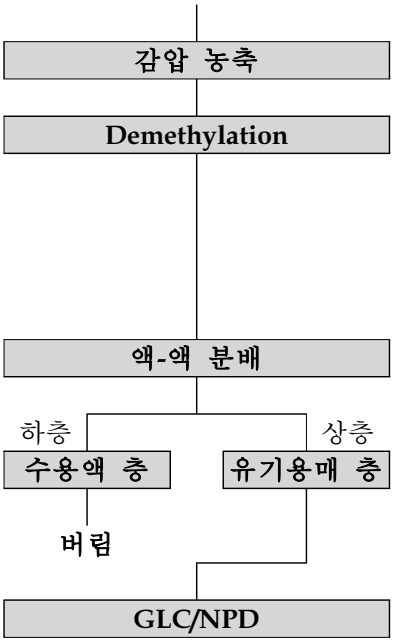
2) 분석법 개요

함수 농산물 검체에 염산수용액/methanol 혼합액을 가하여 진탕 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 양이온교환크로마토그래피에 의하여 추출액을 정제한다. mepiquat 양이온을 dipicrylamine과 ion-pair를 형성시켜 dichloromethane으로 분배 추출하고 diethanolamine/HMPA 시약으로 탈메틸화 반응을 시킨다. 생성된 휘발성의 1–methylpiperidine을 냉각, 포집하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 20g
- 0.5N HCl 수용액/methanol (25/75) 100mL
- 30분간 진탕 추출
- Dowex 50W-X4 (50~100mesh) 12g
- Methanol 50mL로 습식 충전 → 버림
- Methanol 50mL로 pre-washing → 버림
- 검체액 100mL → 버림
- Methanol 100mL → 버림
- 1.5N HCl 수용액 200mL → 받음
- 50℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 증류수 20mL에 재용해
- 10% NaOH 수용액을 가하여 pH 11~13으로 조절
- 0.02% dipicrylamine이 함유된 dichloromethane 30mL × 3회 분배 추출
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 2N HCl 수용액 50mL에 재용해
- Dichloromethane 10mL × 2회 분배 세척



- 50℃이하에서 증발 건고
- 포집관에 *n*-hexane 2.5mL 첨가 후 냉각
- 잔류물에 diethanolamine 3mL + HMPA 2mL 첨가
- 포집관 장착 후 질소 기류 통과
- 190~200℃에서 90분간 반응
- 반응 종결 후 포집관 입구를 *n*-hexane 1mL로 세척 첨가
- 10% NaOH 수용액 1mL로 분배 세척
- 10% NaOH 수용액 0.5mL첨가

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-WAX capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 120℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 270℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 1 μL, split
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Mepiquat는 식물체내 gibberellic acid의 생합성을 저해함으로써 생장억제제로 사용되는 식물생장조절제이다. 목화의 생장억제 및 꼬투리 성숙, 양파나 생강의 측아 발생억제

등 등 다양한 용도로 사용되는데 국내에서는 과수 특히 포도의 착립 증진제로 주로 사용하고 있다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Mepiquat는 이온성 화합물이므로 GLC를 이용하여 직접 분석하기는 불가하고 분자 내에 뚜렷한 발색단/형광단이 없으므로 HPLC를 이용한 분석도 어렵다. 따라서 mepiquat의 분자구조를 일부 변경, 1-methylpiperidine으로 전환, GLC로 분석한다. 1-Methylpiperidine은 질소 원자를 1개 함유하고 있으므로 NPD를 검출기로 사용한다.

- 검체 추출은 대상 성분이 양이온이므로 검체를 산성조건으로 조절하여 수용성 methanol로 추출한다. 추출액은 양이온교환크로마토그래피를 이용하여 1차적으로 정제하는데 먼저 상대적으로 약한 농도의 산성조건에서 대상 성분을 양이온교환수지에 포집시키고 methanol을 흘려보내어 불순물을 제거한다. 이 후 더 강한 농도의 양이온(H^+)이 존재하는 용매를 흘려보내어 양이온교환 수지에 포집된 대상 양이온을 교환, 용출시킨다.

- 용출액은 감압 농축한 후 pH를 알칼리성으로 조절하고 dipicrylamine이 함유된 dichloromethane으로 분배 추출한다. Mepiquat 양이온은 알칼리조건에서 음이온으로 해리되는 dipicrylamine과 ion-pair를 형성, 유기용매에 대한 가용성이 증대되므로 dichloromethane 층으로 분배되며 이 과정에서 수용성 간섭물질이 제거된다.

- 분배 추출액은 감압 농축, 건고한 후 mepiquat를 염기성의 diethanolamine과 반응시켜 1-methylpiperidine을 형성시킨다.

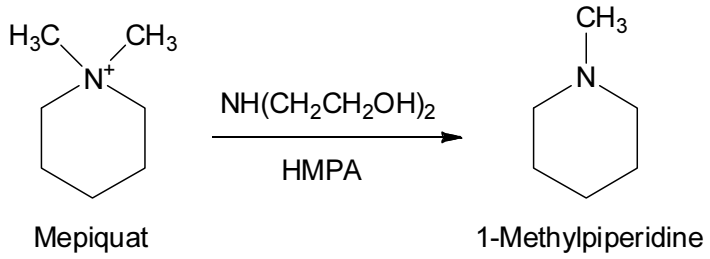


그림 1. Mepiquat의 demethylation에 의한 1-methylpiperidine 형성 반응.

- 1-Methylpiperidine은 비점이 106℃인 휘발성 화합물이므로 질소 기류로 sweeping하여 냉각 포집한다. 1-Methylpiperidine은 또한 염기성 화합물이므로 NaOH 수용액을 첨가하여 이온억압조건을 유지하면서 유기용매 층에 존재하는 대상 성분을 GLC로 분석한다.

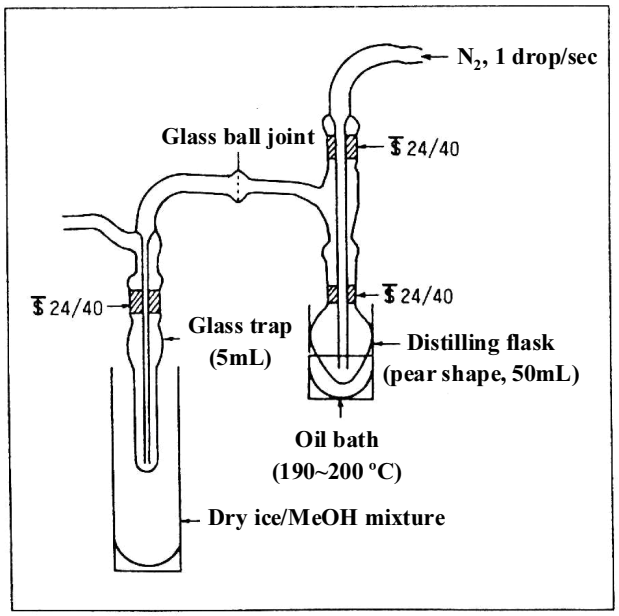


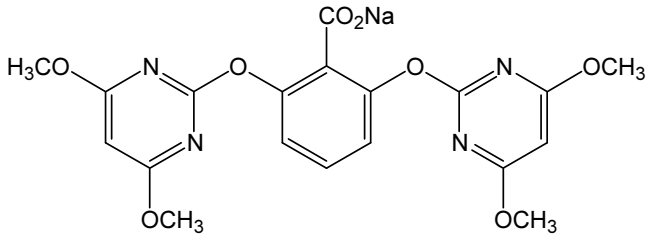
그림 2. Mepiquat demethylation 및 1-methylpiperidine 포집 장치

- GLC의 분리용 column은 1-methylpiperidine이 염기성 화합물임을 감안하여 극성이 높은 liquid phase를 채용한다. GLC에서의 크로마토그래피 특성이 양호하지 않으므로 동작조건을 세심하게 조절, 최적 조건을 설정하여야 한다.

8.4.48 잔류농약 분석법 4.1.4.72

비스피리박-소디움(Bispyribac-sodium)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : bispyribac
화학명 (IUPAC) : sodium 2,6-bis(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yloxy)benzoate
분자식 : $C_{19}H_{17}N_4NaO_8$
평균분자량 : 452.4
질량분석 시 bispyribac-methyl의 M+질량 : 444.3
Log P_{ow} : -1.03 (23℃)
물에 대한 용해도 : 68700 mg/L (20℃)
증기압 : 5.05×10^{-6} mPa (25℃)
pKa : 3.35 (20℃)

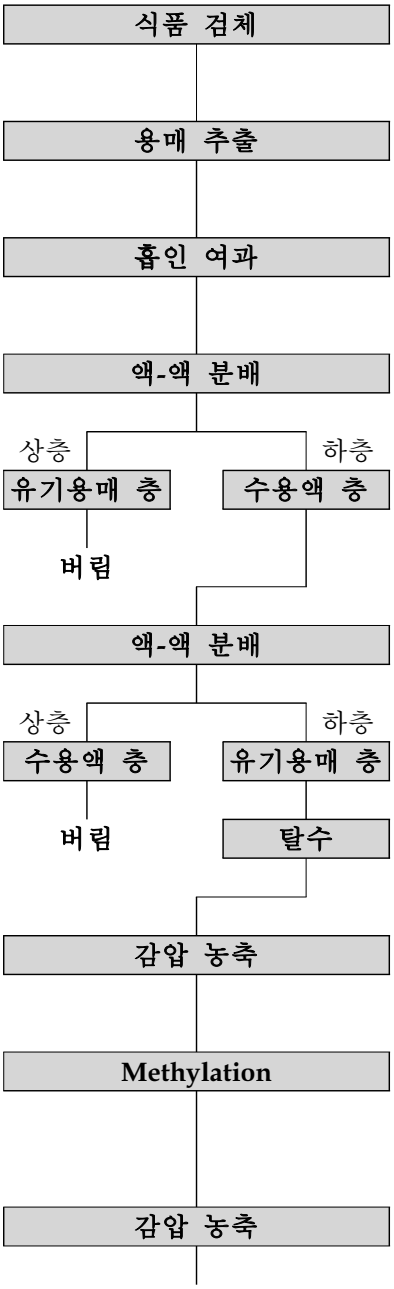
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bispyribac-sodium	0.011	0.1	-	-	-	-	-

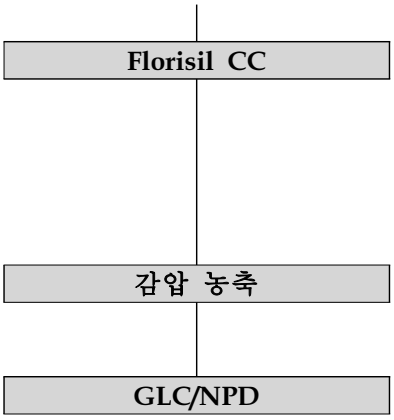
2) 분석법 개요

농산물 검체에 acetonitrile/증류수 혼합액을 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 증류수와 포화식염수를 가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출하여 버린다. 수용액층을 산성화하고 dichloromethane으로 분배 추출한 후 methylation하여 ester를 형성시킨다. 반응액을 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 20g
- Acetonitrile/증류수 (80/20) 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 증류수 400mL + 포화식염수 50mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL로 분배 추출하여 버림
- 1N HCl 수용액 1mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 ethyl acetate 2mL에 재용해
- Ethyl ether/methanol (80/20) 1mL 첨가
- Trimethylsilyldiazomethane 0.5mL 첨가
- 밀봉 후 실온에서 1시간 방치
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 benzene 10mL에 재용해



- SPE-Florisil 1g 카트리지
- Benzene 20mL (activation) → 버림
- 검체액 10mL → 버림
- Benzene 20mL → 버림
- Ethyl acetate/benzene (20/80) 30mL → 받음

- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 benzene 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 80℃에서 2분간 유지, 10℃/min의 비율로 280℃까지 온도를 상승시켜 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 1 µL, splitless
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Bispyribac-sodium은 선택성의 침투성 잡초발생 후 처리제로서 주로 수도 재배 시에 사용하는 pyridinyloxybenzoic acid계 제초제이다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Bispyribac-sodium은 pKa가 3.35인 약산성 화합물이므로 직접 GLC로 분석하기는 힘들다. 따라서 휘발성과 비극성 특성을 부여하기 위하여 분자 내 carboxylic acid를 methyl

ester 형태로 전환하여 GLC로 분석한다. 분자 내에 4개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD를 사용하는 것이 최적이다.

- 시료의 추출은 모화합물이 약산성의 극성 화합물이므로 극성이 높은 acetonitrile/증류수 혼합액을 추출 용매로 사용한다. 추출물을 흡인 여과한 후 과량의 NaCl 수용액을 가하고 *n*-hexane으로 분배 추출하여 버리는데 이 과정에서 bispyribac은 수용액 층에 존재하므로 비극성 간섭물질들이 효과적으로 제거된다. 수용액 층의 산도를 산성으로 조절하면 bispyribac의 이온화가 억압, 유기용매에 대한 가용성이 증대되므로 dichloromethane으로 분배 추출하여 회수한다. Dichloromethane 추출액을 anhydrous sodium sulfate로 탈수시킬 때 sodium sulfate의 산도가 중성을 초과하면 약산성의 대상 화합물이 sodium sulfate와 염을 생성하여 포집될 수 있으므로 사용 전에 미리 적정 산도 여부를 확인한다.

- 정제된 분배 추출액은 감압 농축 건고하고 다음과 같은 methylation 반응에 공시한다. Methylation reagent로는 녹황색 액체 형태인 trimethylsilyldiazomethane을 사용하는데 이 시약은 precursor로서 *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluenesulfonamide (Diazald™)를 이용하여 기체인 diazomethane을 직접 발생시켜 사용하는 것보다 폭발 등 위험성이 적은 장점이 있다. 반응용매에는 반드시 일정량의 methanol이 함유되어야 하는데 methanol 함량이 부족할 경우에는 $RCOOCH_2Si(CH_3)_3$와 같은 부반응에 의하여 인위적 간섭물질이 발생할 가능성이 있기 때문이다.

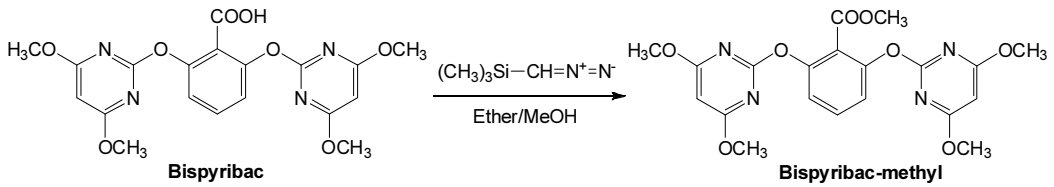


그림 1. Bispyribac의 methylation 반응

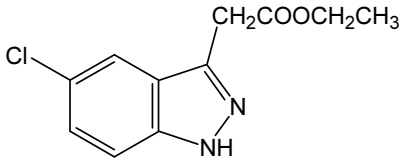
- 반응액은 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하는데 액-액 분배과정에서 대부분의 불순물들이 제거되었으므로 비교적 용이하게 깨끗한 최종 용액을 얻을 수 있다.

- 제시한 GLC 분석용 column은 0.25 mm 내경의 narrow bore capillary column이므로 capillary inlet에 연결, splitless mode로 검체용액을 주입한다. 그러나 정량분석의 재현성을 확보하고자 할 경우에는 0.53 mm 내경의 capillary column을 채용, packed inlet에 시료용액 전량을 직접 주입하고 등온조건을 사용하는 것이 보다 유리하다.

8.4.49 잔류농약 분석법 4.1.4.73

에티클로제이트(Ethychlozate)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : ethychlozate
화학명 (IUPAC) : ethyl 5-chloro-3(1*H*)-indazolylacetate
분자식 : $C_{11}H_{11}ClN_2O_2$
평균분자량 : 238.7
질량분석 시 ethychlozate acid의 M+질량 : 210.0
Log P_{ow} : 2.5
물에 대한 용해도 : 225 mg/L
증기압 : 6.09×10^{-2} mPa (25℃)

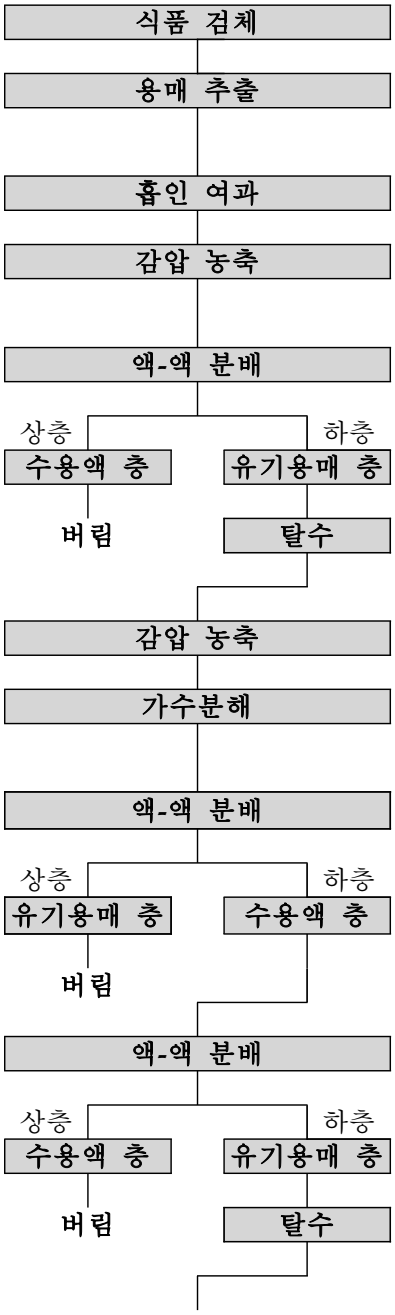
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Ethychlozate	0.28	-	0.05	-	-	-	-

2) 분석법 개요

산성화한 세절 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 ester와 acid를 동시에 추출한다. 추출액을 흡인 여과한 후 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액을 산성화하여 ester와 acid를 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 농축하고 methanol에 재용해한 후 NaOH 수용액을 가하여 가수분해, ester를 acid로 전환시킨다. 가수분해액의 pH를 조절, ion-associated partition법으로 정제한 후 HPLC/FLD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g
- 6N HCl 수용액 1mL 첨가
- Acetone 80mL로 추출
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 40℃에서 acetone 증발
- 2% KH_2PO_4 수용액 40mL를 가하고 6N HCl를 첨가, pH 2.0±0.2로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 methanol 5mL에 재용해
- 4N KOH 수용액 4mL 첨가
- 실온에서 30분 간 교반 반응.
- 2% K_2HPO_4 40mL를 가하고 pH 8.0±0.2로 조절
- *n*-Hexane 50mL로 분배 추출하여 버림
- 6N HCl 수용액을 첨가하여 pH 2.0±0.2로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

감압 농축

- 건고 후 잔류물을 CH_3CN/methanol/water/formic acid (15/20/65/0.1) 5mL에 재용해

HPLC/FLD

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 형광검출기 (FLD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/methanol/물/formic acid (15/20/65/0.1, v/v/v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : 여기파장 300 nm, 형광파장 330 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

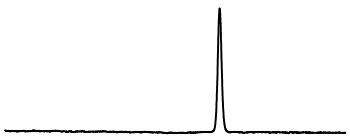


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
ethychlozate acid (12.6분) 8 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물/formic acid (25/75/0.1, v/v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
이온화 : Electrospray ionization (ESI) positive-ion mode
주입량 : 10 μL

분자량 범위 : 100~300
Capillary temperature : 330℃
Cone voltage : 79 V

표 1. LC-MS ESI(+) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Ethychlozate	10.4	238	239

6) 분석법 해설

- Ethychlozate는 과실류의 재배 시에 사용되는 auxin 유사활성의 생장조절제이다. Ethychlozate는 ethyl ester 형태의 중성 화합물 형태로 제조, 전면 살포되나 사용 후 환경이나 생체 중에서 빠른 속도로 가수분해되어 acid 형태로 전환되며, 이러한 acid 형태가 실제 유효성분으로 알려져 있다. 따라서 모화합물과 더불어 acid 형태의 대사산물이 대상 분석성분에 포함되어야 한다.

- Ethychlozate의 잔류분은 ester와 acid를 합하여 총량을 acid 기준으로 표시한다. 물리화학적 특성은 ester와 acid 간에 대조적인 특성을 보여 ester는 비극성 화합물인 반면 acid는 약하게 해리하는 약산성 화합물이다. 따라서 이들 화합물들을 동시에 분석할 수 있는 분석기기는 현재 없으므로 검체 조제과정 중 ester와 acid를 분리, 화합물 군별로 개별 분석하거나, ester를 acid로 전환하여 acid 총량 기준으로 분석하는 접근법이 이용된다.

- 본 분석법에서는 ester와 acid를 모두 포함하기 위하여 후자의 방법으로 총 acid 잔류분을 정량한다. Ethychlozate는 분자 내에 존재하는 carboxylic acid기로 인하여 GLC로 직접 분석하기는 힘들다. 따라서 이온억압 조건에서 HPLC로 분석하는데 분자 내에 indazole ring의 존재로 형광이 강하게 나타나므로 검출기로는 형광검출기 (FLD)를 사용한다.

- 추출은 검체를 산성으로 조절한 후 acetone으로 ester와 acid를 함께 추출한다. 추출액은 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액의 산도를 pH 2.0의 산성으로 조절한 후 dichloromethane으로 ester와 acid 모두를 분배 추출한다. Ethychlozate acid는 carboxylic acid를 함유하고 있어 pKa가 3.0 부근으로 예상되므로 pH 2.0이하에서 이

온강도가 충분할 경우 효율적으로 회수된다. Dichloromethane 추출액은 건고한 후 알칼리 조건에서 ester를 acid로 가수분해한다. 이후 acid가 포함된 가수분해액의 정제는 phenoxyalkanoic acid나 graminicide 분석 시와 유사한 ion-associated partition법을 사용하며 그 정제 효과가 우수하다. 즉, ethychlozate가 약산성 화합물이므로 알칼리성에서는 해리되어 수용성 이온이 되는 반면 산성조건에서는 이온화가 억압되어 유기용매 가용성이 되는 점을 이용하여 분배 시에 세정과정을 수행함으로써 유지를 비롯한 비극성 간섭물질을 효과적으로 제거한다.

- Ethychlozate 분석 과정에서 ester의 가수분해 반응을 그림 2에 나타내었다.

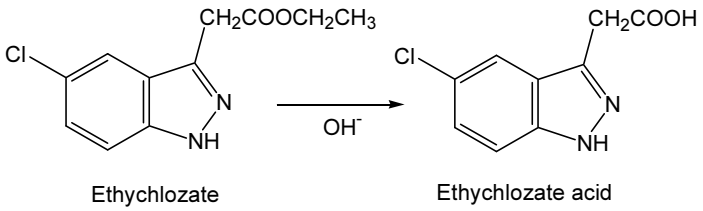


그림 2. Ethychlozate의 ester 가수분해 반응

- Ethychlozate는 형광성을 나타내므로 HPLC 분석 시에 선택성이 뛰어나 이러한 ion-associated partition에 의한 정제로도 충분히 분석이 가능하며 chromatography와 같은 추가적 정제과정은 생략이 가능하다.

표 2. 감귤 중 회수율 및 정량한계

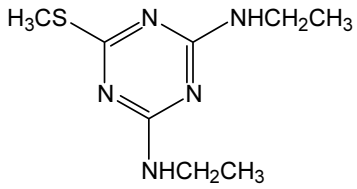
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Ethychlozate	0.2	84.5±0.5	0.02
	1.0	89.9±5.6	

* 3반복 평균±표준편차.

8.4.50 잔류농약 분석법 4.1.4.74

씨메트린(Simetryn)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : simetryn
화학명 (IUPAC) : N^2,N^4-diethyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine
분자식 : $C_8H_{15}N_5S$
평균분자량 : 213.3
질량분석 시의 M+질량 : 213.1
Log P_{ow} : 2.6
증기압 : 9.5×10^{-2} mPa (20℃)
pKa : 4.0, 약염기성

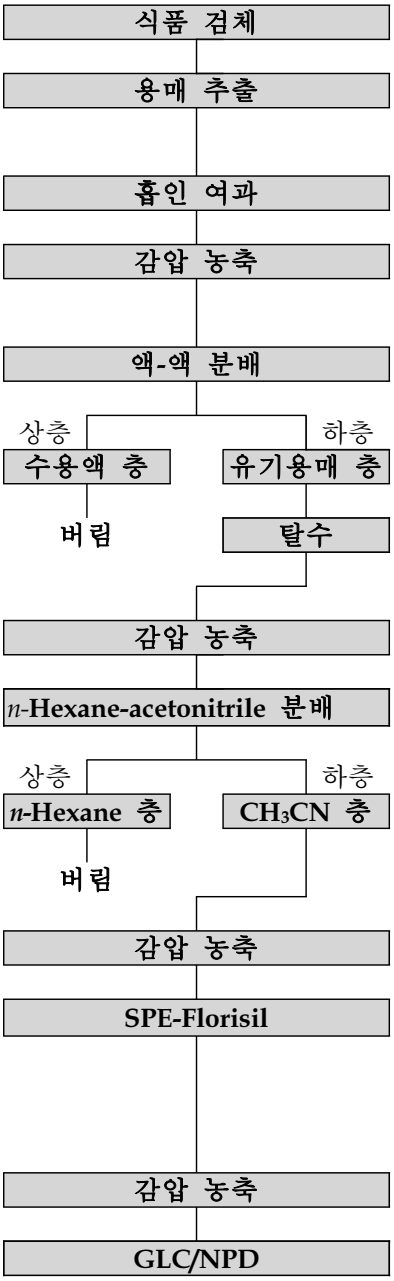
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Simetryn	0.011	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 유지 검체는 *n*-hexane-acetonitrile 분배법으로 유지 및 비극성 불순물을 제거한다. 추출액을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- Acetone 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 약 40mL로 농축
- 5% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 *n*-hexane 30mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 50mL × 2회 분배 추출
- 잔류물을 *n*-hexane 2mL에 재용해
- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Acetone/*n*-hexane (15/85) 12mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 130℃에서 검체를 주입하고 3분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 250℃에서 10분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Simetryn은 triazine계 제초제로서 metribuzin 등과 같은 약염기성 화합물이나 일상적 중간~비극성 성분들의 보편적 방법으로 잔류분을 분석할 수 있다. Simetryn은 증기압이 0.095 mPa로 다소 높은 특성을 나타내므로 GLC로 분석이 가능한 화합물이다. 화학구조 내에 5개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD를 사용한다. 그러나 대상성분이 약염기성 화합물이며 log P_{ow} 값이 2.6으로 극성이 다소 높은 편이므로 GLC 분석 중 backward tailing 현상이 발생할 수 있으며 검체 주입 시 마다 peak의 재현성도 불량할 가능성이 많다. 따라서 분리용 column을 충분히 conditioning하고 표준용액을 검체용액과 교대로 주입, 보정하여야 최상의 분석 재현성을 얻을 수 있다.

- 추출 용매로는 대상 화합물이 중간 극성이므로 중성 화합물에 대한 잔류분석법에서 표준적 용매로 널리 사용되고 있는 acetone을 사용한다. 액-액 분배법은 농축 추출액을 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출하며 simetryn은 우수한 효율로 회수된다. *n*-Hexane/acetonitrile 분배법은 비극성인 유지나 왁스의 제거에

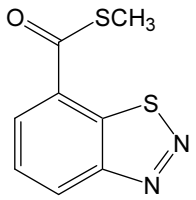
주로 이용되는 정제법으로 고유지 검체인 현미 및 콩류 등 검체에서는 그 적용이 필수적이다. 저유지 검체인 채소, 과실 및 서류 등의 검체에서는 그 정제정도가 미미하므로 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정의 생략도 가능하다.

- 분배 추출액의 추가 정제법으로 이용하는 흡착크로마토그래피법에서 흡착제로는 Florisil을 사용한다. SPE-Florisil을 사용하여 크로마토그래피 정제 과정을 간편하게 하더라도 simetryn은 분자 중에 5개의 nitrogen을 함유, NPD에 대한 감도가 높으므로 선택성이나 분석 감도 상의 큰 문제는 없다.

8.4.51 잔류농약 분석법 4.1.4.75

아시벤졸라-에스-메칠(Acibenzolar-S-methyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : acibenzolar-S-methyl
화학명 (IUPAC) : *S*-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate
분자식 : $C_8H_6N_2OS_2$
평균분자량 : 210.3
질량분석 시의 M+질량 : 210.0
질량분석 시 acibenzolar acid의 $[M+H]^+$ 질량 : 180.0
Log P_{ow} : 3.1 (25℃)
물에 대한 용해도 : 7.7 mg/L (pH 7.5~7.9, 25℃)
증기압 : 4.6×10^{-1} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

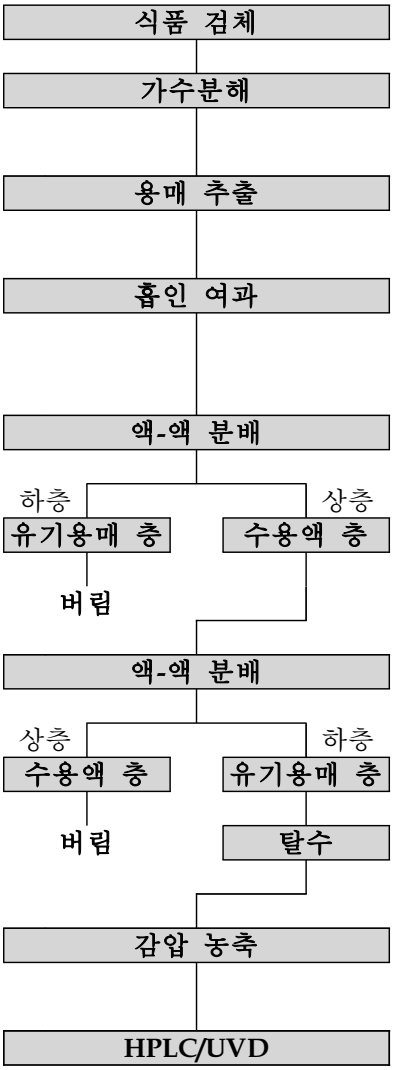
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Acibenzolar-S-methyl	0.1	0.3	0.2~2.0	0.3~2.0	-	-	-

* EC, 2001.

2) 분석법 개요

세절 또는 분쇄 검체에 NaOH 수용액을 가하고 가열, 모화합물의 thioester기를 carboxylic acid로 가수분해하여 대사산물인 acibenzolar acid로 전환한다. 총 acibenzolar acid를 methanol로 진탕 추출하고 염기성 조건에서 dichloromethane으로 분배 세척하여 비극성 방해물질을 제거한다. 추출액의 산도를 산성으로 조절한 후 acibenzolar acid를 dichloromethane으로 분배 추출한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 25g
- 증류수 16mL + 1N NaOH 수용액 4mL
- 60℃에서 1시간 동안 방치 후 방냉
- Methanol 100mL + calcium chloride 2g 첨가
- 1시간 동안 진탕 추출
- Glass-fiber filter 사용
- Methanol 20mL로 용기 및 잔사를 씻어 합한 후 총량를 150mL로 조절하고 60mL (검체 10g 해당량)를 취함
- 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- 1N HCl 수용액 20mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile 4mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : 0.1% acetic acid 함유 acetonitrile/0.1% acetic acid 수용액 (20/80, v/v)

이동상 유량 : 1.2 mL/min
검출기 파장 : UV 235 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

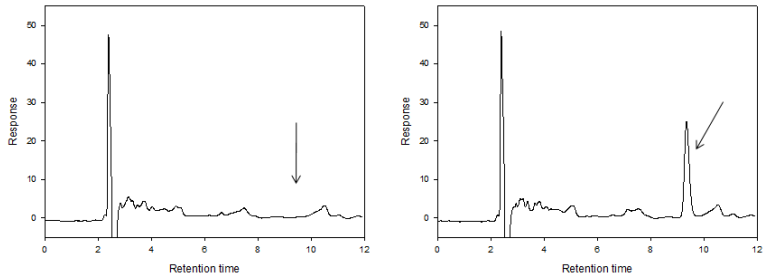


그림 1. 감귤 검체 중 acibenzolar-S-methyl 분석 크로마토그램
좌, 무처리 검체; 우, 2.5 mg/kg 처리 검체

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 2.7 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : 0.1% formic acid 함유 acetonitrile/0.1% formic acid 수용액 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 0.3 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Acibezolar acid	3.6	180	181

6) 분석법 해설

- Acibenzolar-S-methyl은 자체의 살균작용은 없으나 작물체의 병원균에 대한 자체 저항성 (Systemic activated resistance, SAR)을 증강시켜 발병을 예방하는 독특한 작용기작의 항병원성 살균제이다. 진균, 세균, 바이러스성 병원균 뿐만 아니라 해충 및 선충에도 효과가 있으나 주로 단제 또는 타 살균제와 혼합제 형태로 살균제 용도로 사용되고 있다. 만성독성은 ADI가 0.1 mg/kg 체중으로 매우 안전하나 작물의 자체 방어체계 활성화에 소요되는 기간에 상당한 잔효성이 있다. Acibenzolar-S-methyl은 약제 살포 후 식물체내에서 thioester기가 분해되어 acibenzolar acid를 대사산물로서 생성하므로 잔류분은 모화합물과 대사산물 acibenzolar acid의 합으로 정의된다.

- Acibenzolar-S-methyl은 log P_{ow} 3.1인 중성의 비극성 화합물이며 대사산물은 carboxylic acid기를 함유하고 있는 극성의 약산성 화합물이므로, 두 화합물간의 물리화학적 특성이 너무 차이가 커 동시 분석법을 개발하는 것은 매우 어렵다. 따라서 2종의 대상성분을 개별적으로 분석하거나 두 성분을 하나의 성분으로 통합하여 분석하는 방법 중에서 선택하여야 하는데, 본 분석법에서는 후자의 분석 방법을 이용한다. 즉, 그림 2에 나타낸 바와 같이 검체를 가수분해하여 함께 함유되어 있는 acibenzolar-S-methyl과 acibenzolar acid 잔류분 중 acibenzolar-S-methyl을 acibenzolar acid로 전환, 전체 잔류분을 acibenzolar acid 형태로 분석한다.

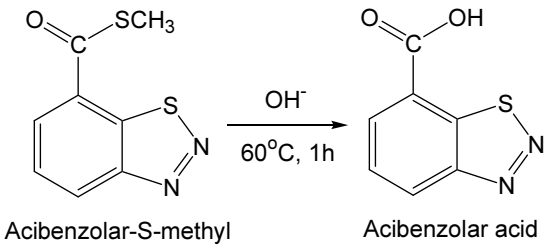


그림 2. Acibenzolar-S-methyl의 가수분해 반응

- 검체의 추출은 먼저 0.2 N 농도의 NaOH 수용액을 검체에 첨가한 후 가열, acibenzolar-S-methyl을 acibenzolar acid로 가수분해하며 이 조건에서 acibenzolar acid는 안정하다. 검체 중에 이미 잔류하거나 acibenzolar-S-methyl의 가수분해에 의하여 생성된 acibenzolar acid는 극성이 높고 sodium 염의 형태로 존재하게 되므로 이를 추출하기 위하여 극성이 큰 methanol을 추출용매로 사용한다. Calcium chloride는 입자를

응집시켜 흡인 여과를 용이하기 위하여 첨가하며 추출액의 산도가 알칼리성이므로 여과지는 손상의 우려가 있어 glass-fiber filter를 사용한다.

- 추출액의 정제는 acibenzolar acid의 해리성을 이용하여 ion-associated partition을 적용한다. 즉, 알칼리성의 추출액에서 acibenzolar acid는 해리, 이온 형태로 수용성을 나타내므로 dichloromethane과 같은 유기용매로 분배 추출하더라도 여전히 수용액 층에 존재한다. 이러한 dichloromethane 세정에 의하여 비극성의 불순물을 제거한다. 남은 수용액 층에 산을 가하여 산성으로 조절하면 acibenzolar acid는 해리가 억압, 유기용매 가용성인 중성의 화합물 형태가 되므로 dichloromethane 층으로 분배 추출되며 수용성 불순물이 제거된다. 이러한 해리 특성을 이용한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이어서 흡착크로마토그래피와 같은 별도의 정제법을 추가하지 않더라도 기기분석이 가능하다.

- Dichloromethane 분배 추출액의 탈수를 위하여 사용되는 anhydrous sodium sulfate는 일부 시약에서 규격과는 달리 액성이 약알칼리성인 경우가 있으므로 그 선정에 유의하여야 한다. 대상성분은 약산성 화합물이므로 알칼리성에서는 해리, 염의 형태로 sodium sulfate에 포집되어 회수율이 저하될 수 있으므로 사용 전에 액성이 중성~약산성 범위인가를 미리 확인하여야 한다.

- HPLC 분석 시에 이동상은 acibenzolar acid의 이온화를 억압하기 위하여 산성의 이동상을 사용한다. Acibenzolar acid의 최대 흡광파장은 235 nm으로 장파장이 아니므로 정량한계 0.05 mg/kg이 확보되는 한 가급적 머무름 시간을 길게 설정하는 것이 불순물에 의한 간섭을 최소화할 수 있다. LC-MS 재확인법에서 acibenzolar acid는 분자 내에 lone pair를 보유한 질소 원자가 2개 존재하여 protonation이 용이하므로 이온화법으로는 ESI, positive ion법을 이용하며 $[M+H]^+$ ion은 충분한 intensity로 관찰되므로 감도 부족의 문제는 없다.

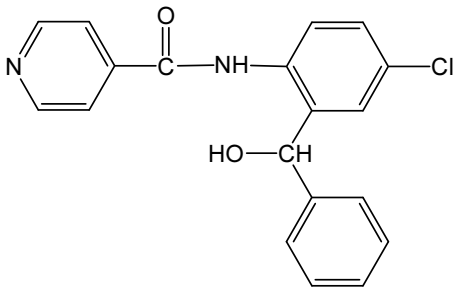
- 분석성분이 acibenzolar acid이므로 acibenzolar acid를 표준품으로 사용할 경우에는 acibenzolar-S-methyl과의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.

Acibenzolar-S-methyl 잔류량 (mg/kg) = acibenzolar acid 잔류량 (mg/kg) ×
(acibenzolar-S-methyl 분자량 210.3) / (acibenzolar acid 분자량 180.2)

8.4.52 잔류농약 분석법 4.1.4.76

이나벤화이드(Inabenfide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : inabenfide
화학명 (IUPAC) : 4′-chloro-2′-(*α*-hydroxybenzyl)isonicotinilide
분자식 : $C_{19}H_{15}ClN_2O_2$
평균분자량 : 338.8
질량분석 시 chloroacetyl-inabenfide의 M+질량 : 414.1
Log P_{ow} : 3.13
물에 대한 용해도 : 1 mg/L (30℃)
증기압 : 0.063 mPa (20℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

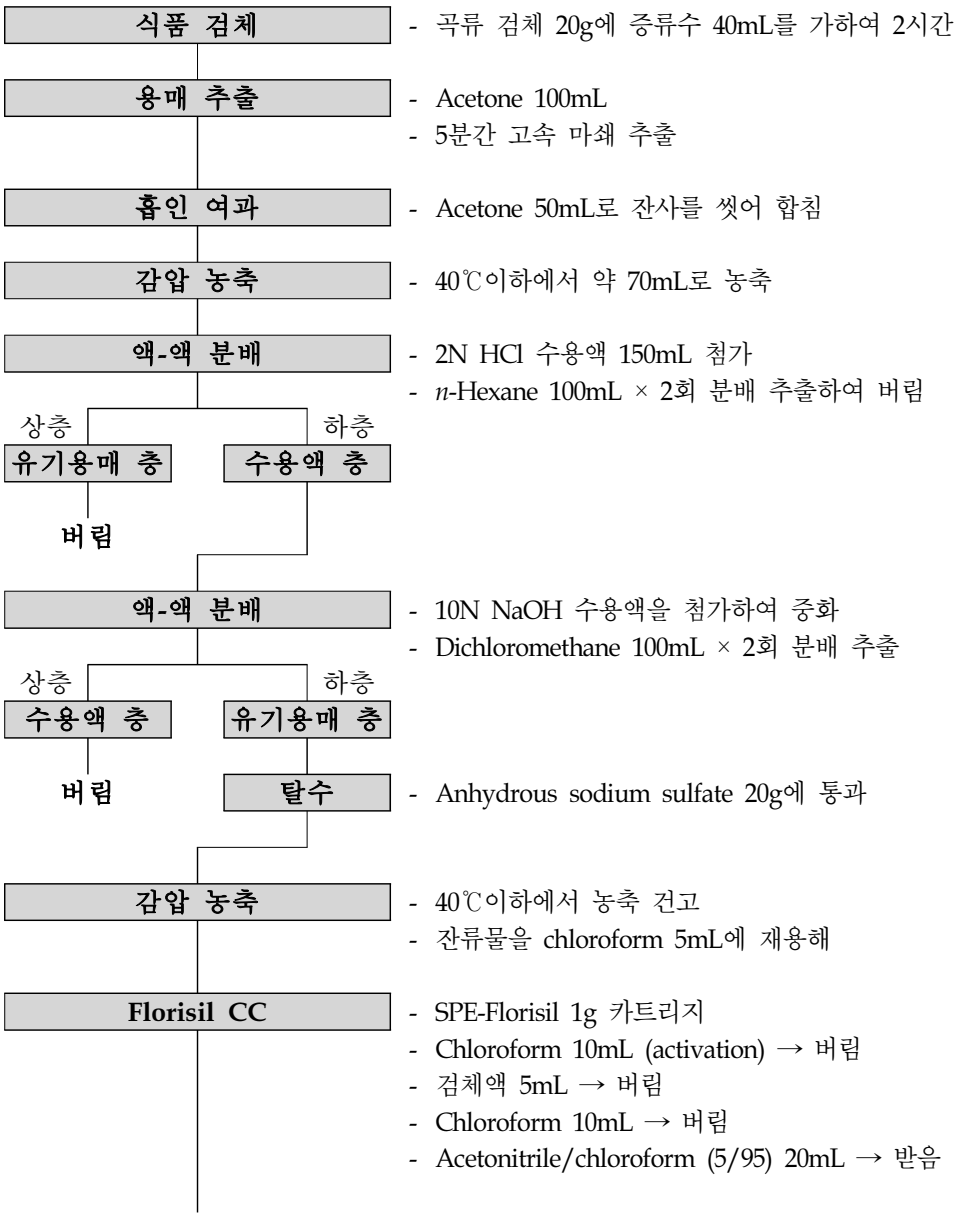
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Inabenfide	-	0.05	-	-	-	-	-

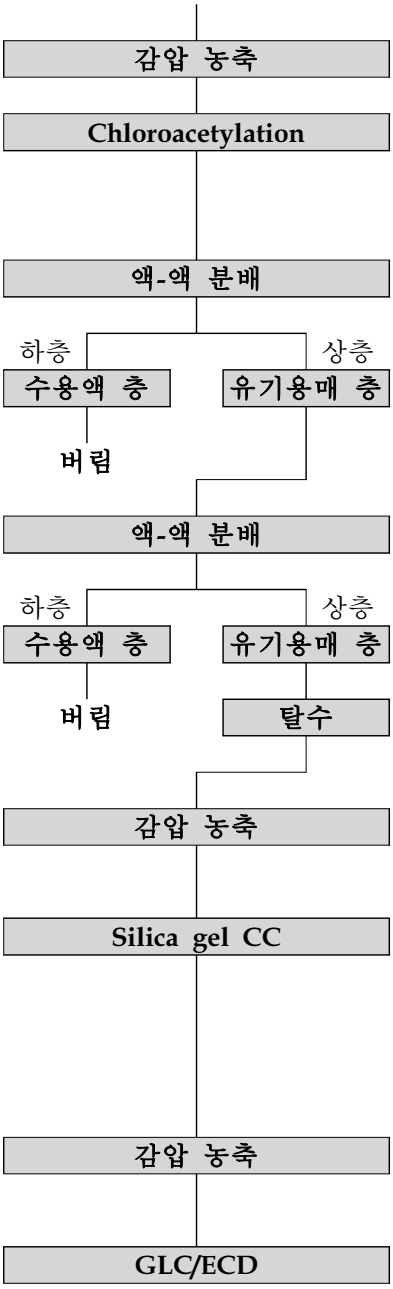
2) 분석법 개요

습윤화한 검체에 acetone을 가하여 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 농축하여 분액여두에 옮기고 산성화한 후 *n*-hexane으로 분배 추출하여 버린다. 수용액 층을

중화하고 dichloromethane으로 분배 추출한 후 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 1차 정제한다. 추출물을 chloroacetylation하고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 40℃이하에서 증발 건고
- 5% chloroacetic anhydride의 benzene 용액 10mL + pyridine 0.1mL 첨가
- 실온에서 30분간 진탕
- Benzene 30mL + 증류수 50mL 첨가
- 포화 NaHCO3 수용액 50mL + 증류수 50mL로 2회 분배 추출하여 버림
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetone/*n*-hexane (30/70) 5mL에 재용해
- SPE-silica 1g 카트리지
- Acetone/*n*-hexane (30/70) 10mL (activation) → 버림
- 검체액 5mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (30/70) 10mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (40/60) 20mL → 받음
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 220℃
주입부 온도 : 280℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Inabenfide는 식물체내 gibberellin 생합성을 저해하는 작용을 나타내며 주로 벼의 하위 절간을 단축시켜 도복을 경감시킬 목적으로 사용하는 식물생장조절제이다. 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다. Inabenfide는 분자 내에 carboxamide기, alcohol기, pyridine기 등을 갖고 있어 직접 GLC로 분석하기에는 크로마토그래피 특성이 좋지 못하다. 따라서 alcohol기를 acetylation하여 분석한다.

- Inabenfide의 log P_{ow}는 3.13으로 비극성~중간 극성의 화합물이므로 습윤화한 검체를 acetone으로 추출한다. 추출액은 농축한 후 분액여두에 옮겨 산성화한 후 *n*-hexane으로 분배하여 버린다. Inabenfide 분자내의 pyridine기는 산성조건에서 protonation되므로 대상 성분은 수용액 층에 존재하며 이러한 *n*-hexane 세척과정에 의하여 대부분의 비극성 간섭물질이 제거된다. 수용액 층의 산도를 중성으로 조절하여 protonation을 억압, 유기용매의 가용성을 증대시켜 dichloromethane으로 분배 추출한다.

- 분배 추출액은 1차적으로 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. Inabenfide는 분자 내 극성 작용기의 존재에 따라 비교적 높은 용출 강도의 용매에서 용출되므로 세척용매에 의하여 불순물 제거효과가 기대된다.

- 유도체 형성은 다음과 같은 반응에 의하여 진행된다. Chloroacetic anhydride 시약을 사

용하여 alcohol기에 대하여 일상적인 acetylation 반응으로 수행하는데 inabenfide 분자 내에 1개의 염소 원자만을 추가한다. 이는 inabenfide 분자 내에 이미 하나의 염소 원자를 보유하고 있으므로 검출기 ECD의 높은 감도에 요구되는 2개 염소 원자 개수를 만족시키기 위한 것이다. 이러한 chloroacetylation에 함께 반응하는 간섭물질은 1개의 염소 원자만을 보유하게 되므로 ECD에 대한 감도가 여전히 낮으므로 기기분석의 선택성이 증대된다.

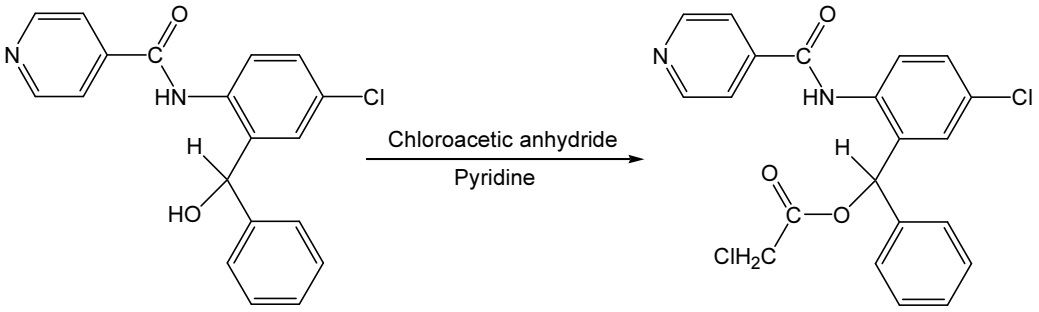


그림 1. Inabenfide의 chloroacetylation 반응

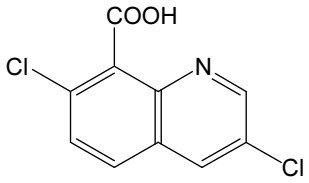
- 반응액은 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종적으로 정제하는데 acetylation된 유도체는 극성이 낮아지므로 보다 약한 용출강도의 용매에서 용이하게 용출된다.

- 제시한 GLC 분석용 column은 0.25 mm 내경의 narrow bore capillary column이므로 capillary inlet에 연결, splitless mode로 검체용액을 주입한다. 그러나 정량분석의 재현성을 확보하고자 할 경우에는 0.53 mm 내경의 capillary column을 채용, packed inlet에 시료용액 전량을 직접 주입하고 등온조건을 사용하는 것이 보다 유리하다.

8.4.53 잔류농약 분석법 4.1.4.77

퀸크로락(Quinclorac)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : quinclorac
화학명 (IUPAC) : 3,7-dichloroquinoline-8-carboxylic acid
분자식 : $C_{10}H_5Cl_2NO_2$
평균분자량 : 242.1
질량분석 시의 M+질량 : 241.0
질량분석 시 quinclorac-methyl ester의 M+질량 : 255.0
Log P_{ow} : -0.74 (pH 7)
물에 대한 용해도 : 0.065 mg/L (pH 7, 20℃)
증기압 : 〈0.01 mPa (20℃)
pKa : 4.34 (20℃)

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Quinclorac	0.3	0.05	-	-	-	-	-

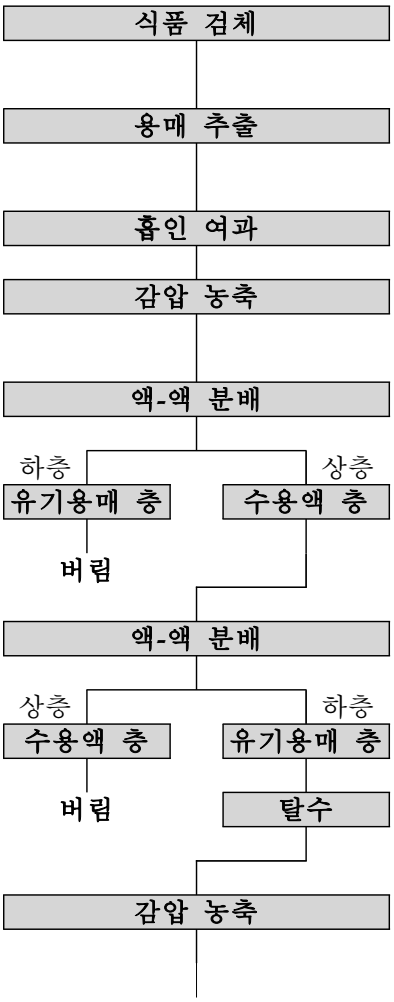
* US EPA, 1992.

2) 분석법 개요

세절 또는 분쇄 검체에 NaOH 수용액을 가하여 알칼리성으로 조절한 후 acetone으로 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인여과하고 산도를 산성으로 조절한 후 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸다. 농축액의 산도를 약알칼리성으로 조절하고 dichloromethane으

로 분배 세척하여 비극성 방해물질을 제거한다. 추출액의 산도를 산성으로 조절한 후 quinclorac을 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 silica gel column chromatography로 정제한 후 diazomethane 시약과 반응시켜 methyl ester를 형성한다. 반응액을 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 10g
- 0.1N NaOH 수용액 50mL 첨가 후 1시간동안 방치

- Acetone 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출

- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용

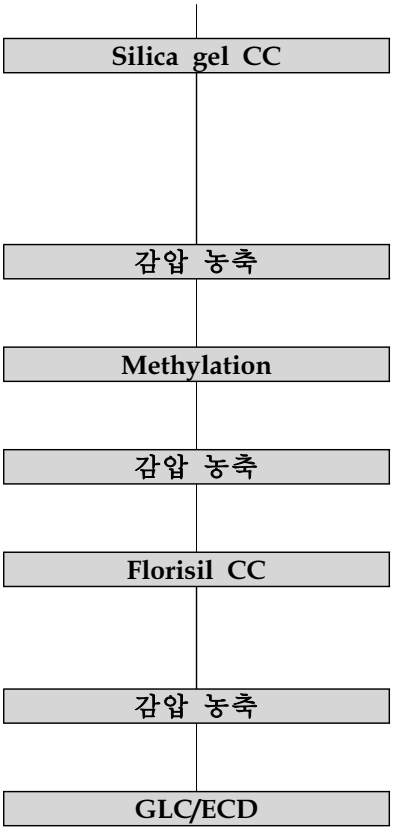
- H_2SO_4 1.5mL 첨가
- 40℃에서 약 30mL로 농축

- $NaHCO_3$를 첨가, pH 8로 조절
- Dichloromethane 50mL 분배 추출

- H_2SO_4를 첨가하여 pH 2로 조절
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- Methanol/dichloromethane (40/60) 5mL에 재용해



- SPE-silica 1g 카트리지
- Deionized water 5mL + methanol 5mL + dichloromethane 5mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL + methanol/dichloromethane (40/60) 12mL→ 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetone 0.5mL에 재용해
- Diazomethane-ether 용액 3mL 첨가 후 1시간 방치
- Diazomethane-ether 용액 3mL 재차 첨가 후 1시간 방치
- 40℃에서 증발 건고
- *n*-Hexane/ether (30/70) 1mL에 재용해
- SPE-Florisil 1g 카트리지
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 반응액 1mL + *n*-hexane/ether (30/70) 12mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.20~0.32 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 130℃에서 3분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 250℃까지 온도를 상승시켜 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Quinclorac은 합성 auxin의 일종으로 quinolinecarboxylic acid계 선택성 제초제로서 특히 벼농사 중 발생하는 피의 방제에 탁월한 효과가 있다. 그러나 후작물로서 재배되는 호로과 및 가지과 작물에 약해를 유발할 가능성이 높아 벼 재배 후 시설재배를 위주로 하는 우리나라에서는 1990년대 중반에 그 등록이 취소되었다. 전세계적으로는 벼농사에서 광범위하게 사용되고 있는 약제이다. 생체 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분은 모화합물로 한정된다.

- Quinclorac은 분자 내에 carboxylic acid기를 함유하고 있는 pKa가 4.34인 약산성 화합물이므로 휘발성 및 기체크로마토그래피 특성이 열등하여 GLC로 직접 분석하기는 어렵다. 따라서 carboxylic acid기를 ester화하여 중성의 화합물로 변환, 분석한다. 분자 내에 2개의 염소 원자를 함유하고 있어 GLC의 ECD 검출기에 대한 감도가 높으므로 별도의 halogen이나 전자포획기를 도입할 필요 없이 단순한 methyl ester화만으로도 충분한 감도를 얻을 수 있다.

- 검체 추출은 약산성 화합물을 추출하는 일반적 방법을 사용한다. 즉, 염기를 가하여 해리를 유발하고 생성된 음이온 형태를 극성 추출용매로 추출하는 방법과 산을 가하여 이온화를 억압, 중성 형태를 비극성 유기용매로 추출하는 방법이 있는데 본 분석법에서는 전자의 방법을 이용한다. 곡류 검체에 NaOH 수용액을 가하여 알칼리 조건과 습윤화를 동시에 수행한 후 acetone으로 추출한다. 추출용매로 methanol을 사용할 수도 있으나 여과 및 농축에 불리하므로 물의 함량을 높인 acetone을 사용한다. 추출액이 알칼리성이므로 여과지의 손상이 있을 수 있으므로 여과보조제를 사용, 신속하게 흡인 여과하거나 glass-fiber filter를 사용한다.

- 추출액을 정제하기 위한 액-액 분배는 quinclorac의 해리성을 이용하여 ion-associated partition을 적용한다. Quinclorac의 pKa가 4.34이므로 pH 6.5 이상에서는 99% 이상이 해리한다. 따라서 알칼리성 추출액에서 quinclorac은 해리, 이온 형태로 수용성을 나타내므로 dichloromethane과 같은 유기용매로 분배 추출하더라도 여전히 수용액 층에 존재한다. 이러한 dichloromethane 세정에 의하여 비극성의 불순물을 제거한다. 남은 수용액 층에 산을 가하여 산성으로 조절하면 quinclorac의 해리가 억압, 유기용매 가용성인 중성의 화합물 형태가 되므로 dichloromethane 층으로 분배 추출되며 수용성 불순물이 제거된다. 이러한 해리 특성을 이용한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이어서 흡착크로마토그래피와 같은 별도의 정제법을 추가하지 않더라도 기기분석이 가능하다. 본 분석법에서는 추출액의 정제도를 높이기 위하여 silica gel 흡착크로마

토그래피를 추가로 수행한다. Quniclorac은 silica gel에서 매우 늦게 용출되므로 극성 용매를 검체 주입전에 미리 흘려 deactivation시킨다.

- Methylation에는 그림 1에 나타낸 바와 같이 diazomethane 시약을 사용하는데 BF_3/methanol 등 다른 esterification 시약을 사용할 경우 수율이 80% 정도로 다소 낮다. Diazomethane은 gas 형태이므로 Diazald™ 등 여러 종류의 전구체 (precursor) 시약을 사용하여 반응 직전 ether에 녹인 형태로 조제하는데 폭발 위험 및 발암성이 있으므로 전구체 시약 및 전용 기구의 사용법을 숙지하여야 한다. 반응의 완결을 위하여 2회에 걸쳐 diazomethane과 반응시킨다.

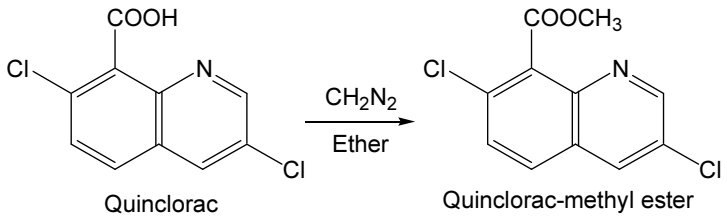


그림 1. Diazomethane에 의한 quinclorac의 methylation

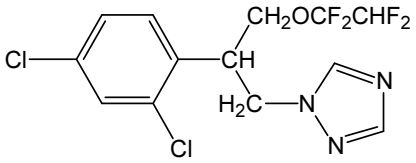
- 반응액은 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 추가 정제하는데 quinclorac의 methyl ester는 비극성의 중성 화합물이므로 용이하게 용출된다.

- GLC 분석을 위한 최종 용액은 정제도가 높아 색소 등 불순물의 불순물은 거의 관찰되지 않는다. GLC에서 승온조건으로 column efficiency를 향상시켰으므로 검체 주입은 적절한 split ratio를 적용, split법으로 사용하여도 정량한계 이하로 충분히 분석이 가능하다.

8.4.54 잔류농약 분석법 4.1.4.79

테트라코나졸(Tetraconazole)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : tetraconazole
화학명 (IUPAC) : (*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propyl-1,1,2,2,-tetrafluoroethylether
분자식 : $C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$
평균분자량 : 372.1
질량분석 시의 M+질량 : 371.0
Log P_{ow} : 3.56 (20℃)
물에 대한 용해도 : 156 mg/L
증기압 : 0.18 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

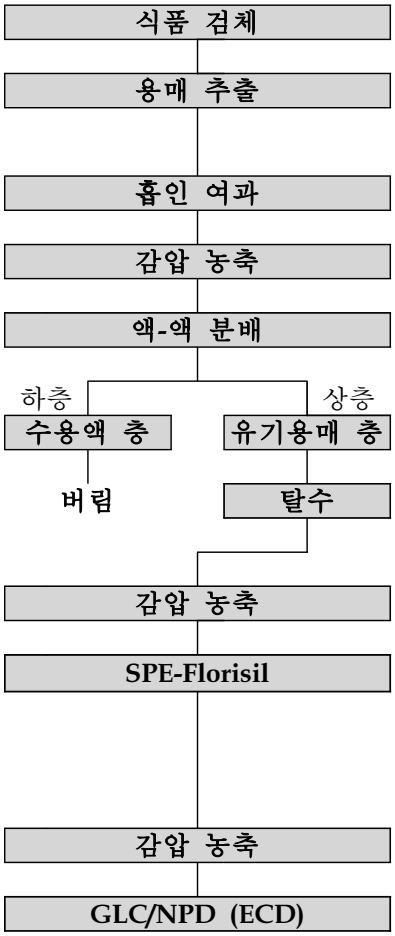
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Tetraconazole	0.004		0.2~2.0	0.2~3.0	-	-	0.1

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 methanol/염산 수용액의 혼합액을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 분배액을 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD 또는 ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 50g
- Methanol/1N HCl 수용액 (90/10) 150mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 40℃에서 methanol 증발
- 포화 NaCl 수용액 80mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 잔류물을 *n*-hexane 2mL에 재용해
- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Acetone/*n*-hexane (30/70) 12mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 280℃에서 10분간 유지한다.

주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Tetraconazole은 전형적인 EBI계 살균제이다. 대상성분은 휘발성이 0.18 mPa로 상당하므로 기기분석법으로는 GLC가 가능하다. 대상 농약성분은 aryl-aryl기의 bridge구조를 가지고 있으며 bridge 내 phenyl기에 결합된 탄소는 키랄성이므로 enantiomer가 존재하나 광학활성을 제외한 물리적 특성이 동일하므로 일상적 GLC에서는 분리되지 않는다. 분자구조 내에 3개의 질소와 2개의 염소 원자를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD와 ECD 모두가 사용 가능하다.

- 추출에는 비해리 화합물에 보편적으로 사용하는 acetone, acetonitrile 및 methanol 중 methanol을 사용한다. 대상화합물은 중간 극성이나 가장 극성이 큰 methanol을 사용하여도 우수한 추출 효율을 나타내며 함께 추출되는 비극성 간섭물질의 양이 acetone이나 acetonitrile에 비하여 적어 정제과정이 간편해지는 장점이 있다. 추출액은 농축하여 methanol을 제거하는데 수분이 포함되어 있어 감압 농축할 때에 돌비 (突沸, bumping) 현상이 일어날 수 있으므로 splash protector를 플라스크에 부착하거나 진공도를 세심하게 조절한다.

- 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. 즉, 추출액을 농축하여 methanol을 제거하고 포화 NaCl 수용액을 첨가하여 *n*-hexane으로 분배하면 tetraconazole은 우수한 효율로 회수된다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을

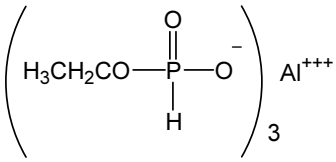
줄인다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하다. Tetraconazole은 과실, 채소 및 서류에 등록 사용되고 있어 *n*-hexane-acetonitrile 분배법이 필요 없으나 향후 유지 작물에 적용될 경우에는 이 분배법의 채용이 필수적이다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Tetraconazole은 분자 중에 3개의 질소 원자와 2개의 염소 원자를 함유하고 있어 NPD와 ECD에 대한 감도가 상당하고 머무름 시간이 긴 편이어서 간섭물질과의 겹침 가능성이 적다. 따라서 SPE-Florisil을 사용하여 크로마토그래피 정제 과정을 간편하게 하더라도 선택성이나 분석 감도상의 큰 문제는 없다.

8.4.55 잔류농약 분석법 4.1.4.80

포세틸-알루미늄(Fosetyl-aluminium)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fosetyl-aluminium
화학명 (IUPAC) : aluminium tris-*O*-ethylphosphonate
분자식 : $C_6H_{18}AlO_9P_3$
평균분자량 : 354.1
질량분석 시 fosetyl-methyl ester의 M+질량 : 124.0
Log P_{ow} : -2.1 to -2.7
물에 대한 용해도 : 111,300 mg/L (pH 6)
증기압 : $<1\times10^{-4}$ mPa (25℃)
pKa : 4.7, 약산성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fosetyl-aluminium	2.98	-	1.0~25.0	5.0~30.0	-	2.0	20.0

2) 분석법 개요

농산물 검체에 물을 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 C_{18} 카트리지에 통과시켜 비극성 불순물을 제거한다. 용출액을 증발 건고하고 diazomethane 발생시약을 사용, methylation하여 GLC/NPD 또는 FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

식품 검체	- 검체 50g
용매 추출	- 물 70mL로 5분간 고속 마쇄 추출
흡인 여과	- 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용 - 여액을 100mL로 조절하고 10mL (검체 5g 해당량)를 취함.
감압 농축	- 40℃에서 약 2mL로 농축
SPE-C_{18}	- SPE-C_{18} (octadecylsilyl) 500mg 카트리지 - Isopropanol/물 (10/90) 10mL + 물 10mL (activation) → 버림 - 검체용액 + 물 10mL → 받음
감압 농축	- 40℃에서 약 2mL로 농축
Esterification	- Isopropanol/1% 황산수용액 (90/10) 5mL 첨가 - 질소 기류하에서 trimethylsilyldiazomethane 5mL 첨가 - 실온에서 5분간 반응
감압 농축	- 건고 후 잔류물을 isopropanol 2mL에 재용해
GLC/NPD (FPD)	

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
불꽃광도검출기 (FPD)
분리용 칼럼 : HP-INNOWAX 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 10 m, 1.5 μm)
칼럼온도 : 80℃에서 검체를 주입하고 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 온도를 상승시켜 250℃에서 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 270℃
검출기 온도 : 270℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정

주입량 : 1 μL, splitless
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

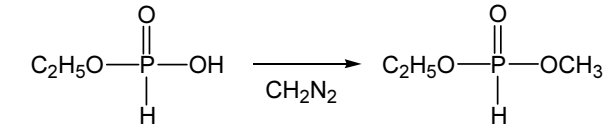
측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Fosetyl-aluminium은 유기인계 살균제로서 과수 및 채소류의 병해 방제에 오랜 기간 동안 널리 사용되고 있다. Fosetyl-aluminium은 ethyl hydrogen phosphonate (fosetyl)의 aluminium 염 형태로 잔류분 표시는 fosetyl을 기준으로 한다.

- Fosetyl은 물에 대한 용해도가 매우 높은 약산성의 극성 화합물이므로 GLC로 직접 분석하기 쉽지 않다. 또한 분자 내에 특이한 발색단이나 형광단을 함유하고 있지 않아 HPLC로도 분석하기 어렵다. 일반적인 분석법은 분자 내에 인이 함유되어 있다는 점에 착안, 화합물 중 해리기를 ester화함으로써 극성을 줄이고 휘발성을 높여 GLC로 분석하며 검출기로는 NPD나 FPD를 사용하는 방법이다.

- 추출은 대상성분이 수용성이므로 물을 사용한다. 여과 과정에서 여과보조제를 사용하여도 여과가 불가하거나 속도가 너무 느릴 때에는 원심분리한다. 여과액 또는 원심분리 상층액 중 일부를 취한 후 SPE-C_{18} (octadecylsilyl)에 통과시켜 비극성 간섭물질을 제거한다. C_{18} 충전제는 비극성 물질에 친화력이 있으므로 비극성 간섭물질은 포집되는 반면 수용성인 fosetyl은 그대로 통과하게 된다.



Fosetyl (ethyl phosphonic acid)

그림 1. Fosetyl의 methyl ester 형성 반응

- 정제액은 감압 농축 건고하고 그림 1에 나타낸 바와 같은 반응을 이용하여 ester 유도체를 형성한다. 반응시약인 trimethylsilyldiazomethane은 diazomethane precursor로서

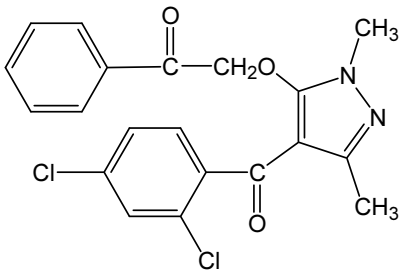
폭발의 위험성이 있는 diazomethane을 서서히 발생시키므로 취급이 용이하다. 단, 수분에 대하여 취약하므로 취급 및 보관에 유의하여야 한다.

- Ester 유도체는 여전히 극성이 높은 화합물이므로 GLC 분리에는 극성 column을 사용하여야 한다. 비극성 column을 사용할 경우 backward tailing 현상이 심하게 일어나거나 재현성이 불량하다. 검출기로는 NPD가 제시되어 있으나 다소 감도가 낮더라도 선택성 및 안정성 측면에서 FPD가 더 유리하다.

8.4.56 잔류농약 분석법 4.1.4.83

피라족시펜(Pyrazoxyfen)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : pyrazoxyfen
화학명 (IUPAC) : 2-[4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-dimethylpyrazol-5-yloxy] acetophenone
분자식 : $C_{20}H_{16}Cl_2N_2O_3$
평균분자량 : 403.3
질량분석 시의 M+질량 : 402.1
Log P_{ow} : 3.69
물에 대한 용해도 : 0.97 mg/L (20℃)
증기압 : 4.8×10^{-2} mPa (25℃)

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

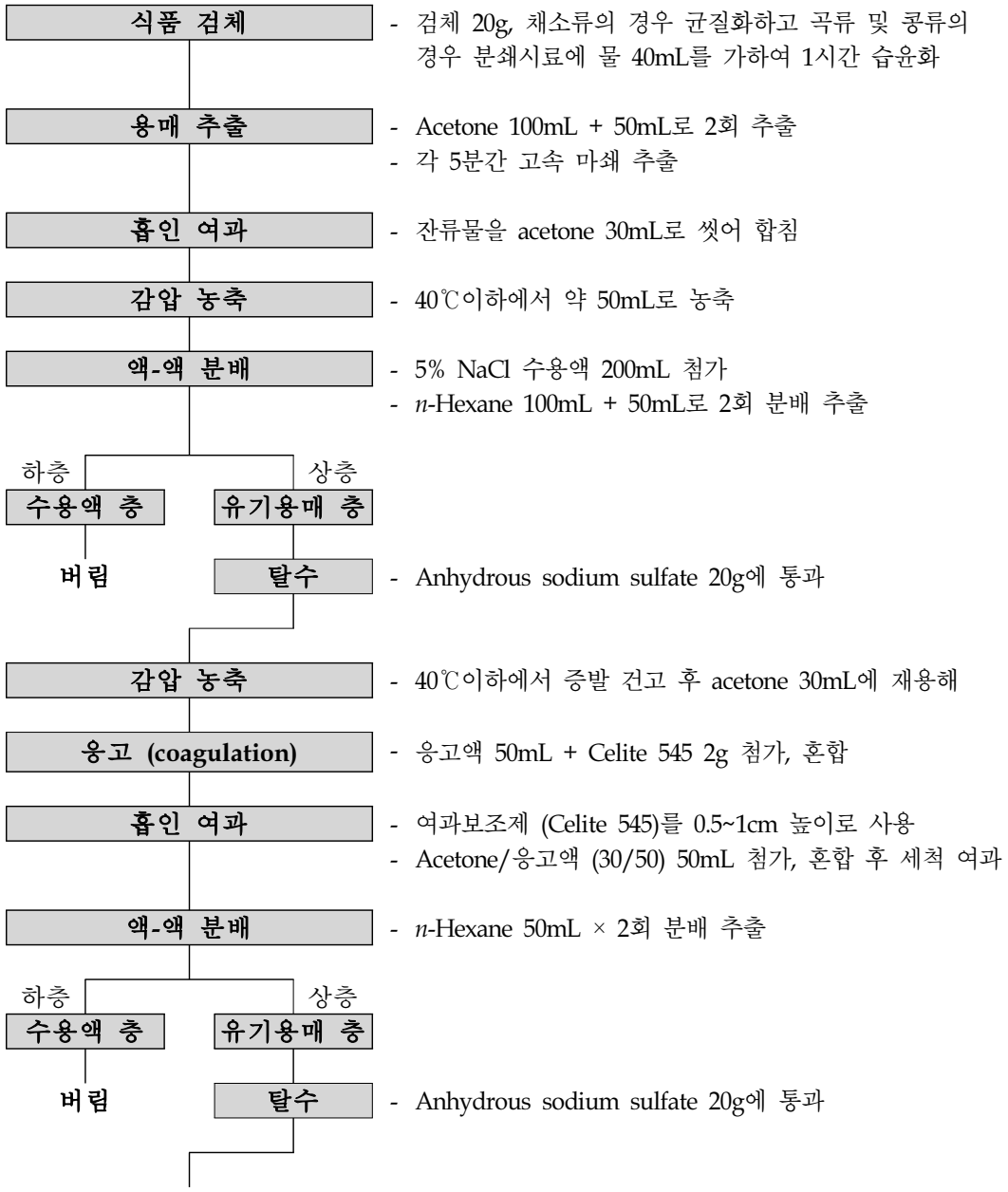
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Pyrazoxyfen	0.0015	0.05	-	-	-	-	-

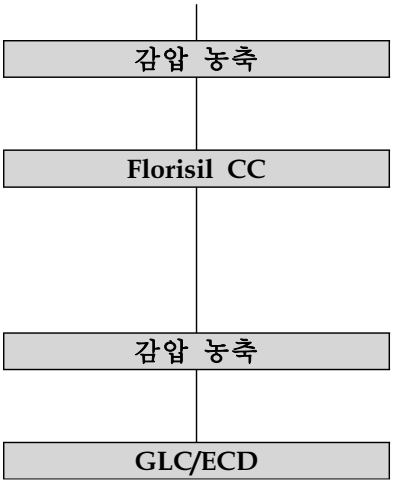
2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물의 균질 검체에 acetone을 가하고 진탕 추출한다. 추출물을 흡인 여과한 후 농축하고 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 *n*-hexane으로 분배 추출한다. Hexane 추출액을 감압농축하고 acetone과 coagulating 용액을 첨가하여 Celite bed상

에서 응고법으로 정제한 후 재차 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 Florisil 흡착크로마토그래피로 최종 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetone/*n*-hexane (5/95) 2mL에 재용해

- SPE-Florisil 1g 카트리지
- *n*-Hexane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 2mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (15/85) 12mL → 받음

- 40℃이하에서 증발 건고
- *n*-Hexane 5mL에 재용해

응고액 : NH_4Cl 2g 및 phosphoric acid 4mL를 물에 녹여 400mL로 함.

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.2~0.32 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 250℃에서 8분간 유지한 후 5℃/min의 비율로 280℃까지 온도를 상승시켜 6분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0~10.0 mL/min
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Pyrazoxyfen은 주로 수도 이앙 초기에 일년생 또는 다년생 잡초 방제에 사용되는 선택성의 침투성 약제로서 밭작물 재배 시에는 거의 사용되지 않는다. Benzoylpyrazole계 제초제로서 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Pyrazoxyfen은 log P_{ow}가 3.69인 비극성의 화합물이고 증기압이 0.048 mPa (25℃)로 어느 정도 있으며 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 염소 원자와 질소 원자를 각각 2개씩 함유하고 있으므로 ECD와 NPD 모두를 사용할 수 있는데 ECD에서 보다 높은 감도가 관찰된다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 비극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 일부 농축한 추출액을 분액여두에 옮겨 식염수를 첨가, *n*-hexane으로 분배 추출한다. Pyrazoxyfen은 비극성이므로 *n*-hexane으로도 충분한 분배 효율을 얻을 수 있다.

- 분배 추출액은 응고법에 의하여 추가 정제하는데 이는 곡류에 존재하는 유지 성분을 제거하기 위한 것으로 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 대체 사용하여도 무방하다. 대부분의 유지는 Celite bed에 응집, 제거되며 여액을 *n*-hexane으로 재차 분배 추출하여 대상 성분을 회수한다.

- 최종적으로 분배 추출액은 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한다. Pyrazoxyfen은 극성이 낮아 Florisil 상에서 용출 강도가 크지 않은 용매에서 비교적 용이하게 용출되며 세척을 위한 용출과정을 생략하여도 상당량의 간섭물질이 효과적으로 제거된다.

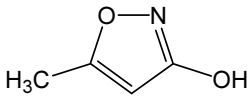
- GLC column은 화합물의 극성에 맞추어 비극성의 liquid phase를 사용, 머무름 시간을 상대적으로 길게 설정함으로써 간섭물질과의 분리 가능성을 높인다. 제시한 GLC 분석용 column은 0.25~0.32 mm 내경의 narrow/wide bore capillary column이므로 capillary inlet에 연결, splitless mode로 검체용액을 주입한다. 그러나 정량분석의 재현성을 확보하고자 할 경우에는 0.53 mm 내경의 capillary column을 채용, packed inlet에 시료용액 전량을 직접 주입하고 등온조건을 사용하는 것이 보다 유리하다.

- 검출기로는 ECD가 감도가 높고 안정성이 우수하나 검체 중 간섭물질과의 선택성은 NPD가 유리하다. 따라서 검체 중 간섭물질이 관찰될 경우에는 ECD 대신 NPD를 사용하는 것도 가능하다.

8.4.57 잔류농약 분석법 4.1.4.84

하이멕사졸(Hymexazol)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : hymexazol
화학명 (IUPAC) : 5-methylisoxazol-3-ol
분자식 : $C_4H_5NO_2$
평균분자량 : 99.1
질량분석 시의 M+질량 : 99.0
Log P_{ow} : 0.48
물에 대한 용해도 : 58200 (pH 3), 67800 (pH 9) mg/L (20℃)
증기압 : 182 mPa (25℃)
pKa : 5.91 (20℃)

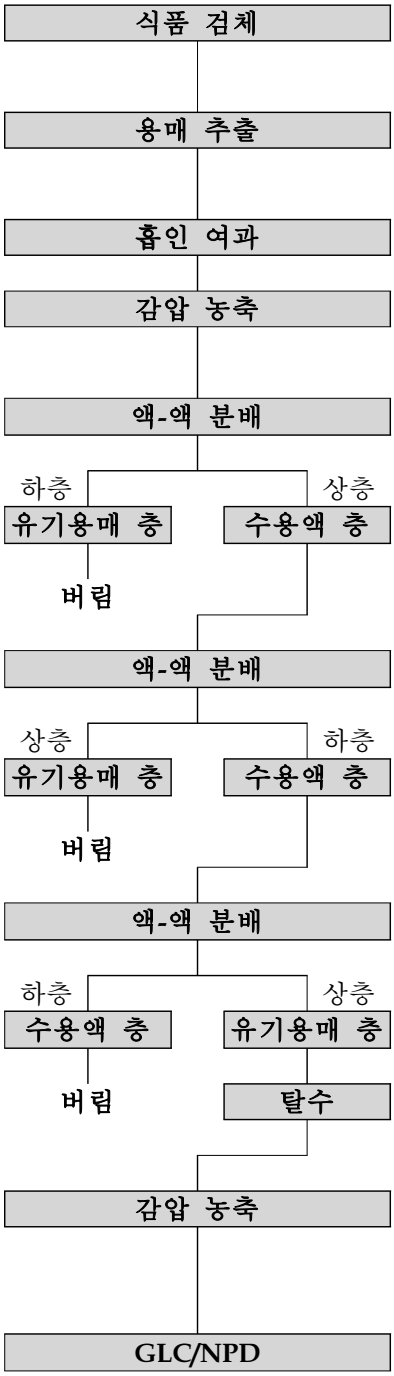
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Hymexazol	0.17	0.05	-	0.05	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과한 후 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 감압 농축한다. 농축액에 NaCl 수용액을 첨가하고 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 dichloromethane 및 ethyl ether로 각각 분배 추출하여 버린다. 수용액 층을 산성화하고 ethyl ether로 대상 성분을 분배 추출한 후 감압 농축하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 20g
- 분쇄 곡류 10g에 증류수 40mL를 가하여 2시간 방치

- Acetone 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출

- 25% K_2CO_3 수용액 1방울 첨가
- 30℃이하에서 약 20mL로 농축

- 증류수 20mL + NaCl 7g + $NaHCO_3$ 1g 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출하여 버림

- Ethyl ether 100mL × 2회 분배 추출하여 버림

- 2N HCl 수용액을 첨가하여 pH 2~3으로 조절
- Ethyl ether 100mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- Acetone에 녹인 2% diethylene glycol 1mL 첨가
- 30℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-WAX capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 10 m)
칼럼온도 : 150℃에서 2분간 유지한 후 10℃/min의 비율로 180℃까지 온도를 상승시켜 10분 이상 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 270℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Hymexazole은 토양 및 종자소독제로 사용되는 침투성 살균제로서 벼를 위시하여 채소류 등에 토양병원성 병해 특히 잘록병 방제를 위하여 많이 사용된다. 주로 토양 또는 육묘상에 관주법으로 처리되는데 작물 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Hymexazole은 분자량이 99에 불과하여 증기압이 182 mPa (25℃)로 상당히 높은 화합물이다. Log P_{ow}가 0.48인 극성 화합물이나 pKa가 5.91인 약산성 화합물로서 산도에 따라 유기용매 가용성/수용성이 변화되는 특성을 나타낸다. Hymexazole은 극성의 약산성 화합물이므로 GLC 분석이 최적 조건인 화합물은 아니나 휘발성이 높으므로 극성 liquid phase의 capillary column을 적절히 사용할 경우 직접 분석이 가능하다, 검출기로는 분자내에 질소 원자를 1개 보유하고 있으므로 NPD를 사용한다.

- 추출에는 수분을 다량 함유하고 있는 검체를 대상으로 acetone을 사용하는데 극성의 화합물임에도 불구하고 acetone에 대한 용해도가 730 g/L로 매우 높으며 해리성이 그다지 크지 않으므로 검체로부터 효율적인 추출이 가능하다. 추출물은 여과 후 감압 농축하여 대부분의 acetone 증발, 제거하는데 대상 성분의 휘발성이 높아 손실의 가능성이 있다. 따라서 수용액 중에서 비휘발성 염의 형태로 존재하도록 약알칼리성의 K_2CO_3를 첨가한다.

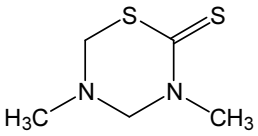
- 액-액 분배는 hymexazole의 해리성을 이용하여 ion-associated 분배법으로 수행하는데 간섭물질 제거 효율이 높아 대부분 추가의 정제 과정이 필요하지 않다. 즉, 산도를 약 알칼리성으로 조절하여 유기용매로 분배하여 버리면, hymexazole은 염의 형태로 수용액 층에 존재하므로 비극성 간섭물질이 제거된다. 이 후 수용액 층의 산도를 산성으로 조절하면 hymexazole의 이온화가 억압되어 유기용매 가용성이 되므로 유기용매 층으로 분배, 회수되고 수용성 간섭물질이 제거된다. 최종 분배 추출액은 감압 증발 건고하는데, 대상 성분의 손실을 방지하기 위하여 keeper로서 diethylene glycol을 첨가하며 가급적 낮은 온도에서 농축과정을 수행한다.

- 대상 성분의 휘발성이 높으므로 GLC 분리용 column에는 극성이 높은 liquid phase를 사용하여야 충분한 머무름 시간을 나타내므로 간섭물질과의 분리 가능성이 높아진다. 분석의 재현성을 위하여 0.53 mm 내경의 capillary column을 채용하고 검체용액 주입은 packed inlet에서 전량 주입하는 직접주입법을 사용한다.

8.4.58 잔류농약 분석법 4.1.4.86

다조멧(Dazomet)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : dazomet
화학명 (IUPAC) : 3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione; tetrahydro-3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazine-2-thione
분자식 : $C_5H_{10}N_2S_2$
평균분자량 : 162.3
질량분석 시 methylisothiocyanate (MITC)의 M+질량 : 73.0
Log P_{ow} : 0.63 (pH 7)
물에 대한 용해도 : 3500 mg/L (20℃)
증기압 : 0.58 mPa (20℃), 1.3 mPa (25℃)
pKa : -

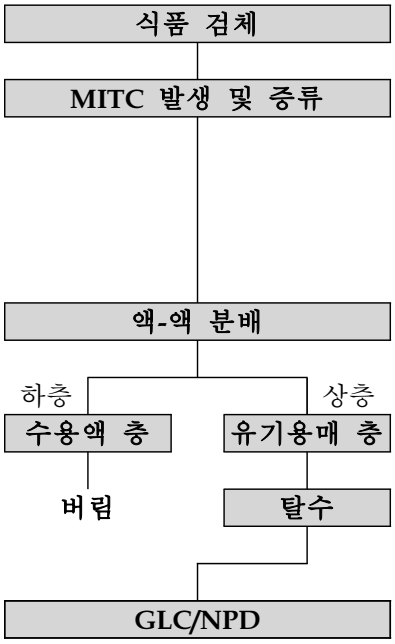
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Dazomet	0.015	-	-	0.1	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 또는 분쇄한 농산물 검체를 Dean-Stark 증류/포집 장치에 달아 넣고 증류수와 ethyl acetate를 가한 후 가열, dazomet으로부터 methylisothiocyanate (MITC)를 발생시키고 ethyl acetate/물과 함께 증류한다. MITC를 함유하고 있는 포집관 내의 ethyl acetate 층에 NaCl을 가하고 수용액 층을 분리하여 버린다. Ethyl acetate 층을 탈수하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 50g
- Dean-Stark 증류/포집 장치
- 증류수 200mL 및 ethyl acetate 10mL 첨가
- Silicone oil 2~3방울 및 비등석 2~3개 첨가
- 1시간 동안 가열, 증류
- Ethyl acetate/수용액 층이 담긴 포집관 분리
- NaCl 3g 첨가
- Anhydrous sodium sulfate 10g에 통과

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column (0.53 mm i.d. × 15 m) 및 HP-20M capillary column (0.25 mm i.d. × 50 m) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 60~140℃
주입부 온도 : 220~250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Dazomet는 식용작물의 식재 전에 토양 살균 및 살선충을 목적으로 사용하는 토양훈증제로서 methylisothiocyanate (MITC, H_3C-N=C=S) 전구물질 (前驅物質, precursor)이다. 즉, 살포 후 유효성분은 토양 수분에 의하여 MITC로 전환되며 이 MITC가 실제 유효성분이다.

- Dazomet은 고체로서 35℃이하로 건조한 상태에서 보관할 경우에는 안정하나 50℃이상의 고온과 수분에 취약하여 그림1에 나타낸 바와 같이 MITC를 방출하며 분해된다. 따라서 모화합물 상태로는 일상적 분석이 어려우므로 MITC로 전환하여 분석한다.

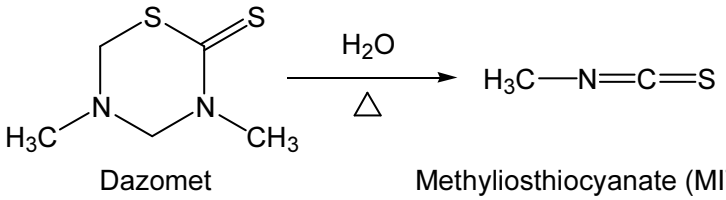


그림 1. Dazomet으로부터 methylisothiocyanate (MITC) 발생 반응

- 검체로부터 MITC의 발생 및 포집에는 Dean-Stark 증류/포집 장치를 사용한다. 검체를 증류플라스크에 달아 넣고 증류수와 ethyl acetate를 첨가한 후 비등을 방지하기 위하여 소량의 silicone oil과 비등석을 가한 후 distilling head 및 냉각관을 연결하고 가열한다.

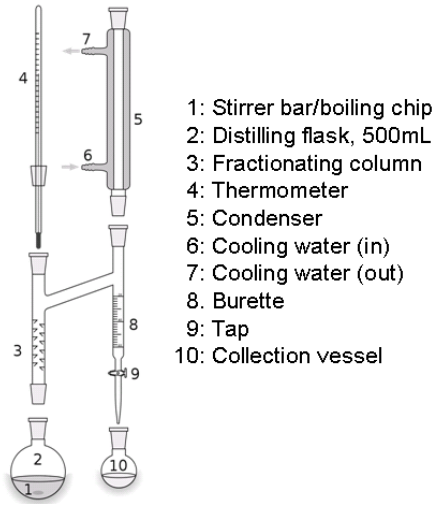


그림 2. Dean-Stark 증류/포집 장치의 각 세부 구성

- Dazomet은 고온의 수용액 조건에서 정량적으로 MITC를 방출한다. 발생한 MITC는 ethyl acetate에 용해되고 함께 증발하고 냉각관에서 응축, 포집관의 ethyl acetate에 존재하게 된다. 이 때 소량의 물이 함께 증발하므로 포집관내에서는 ethyl acetate/물의 두 층으로 분리된다.

- MITC는 log P_{ow}가 1.37인 화합물이므로 ethyl acetate 층으로의 확실한 분배를 위하여 수용액 층에 NaCl을 첨가하여 액-액 분배한다. MITC는 증기압이 2.13 kPa로 휘발성이 상당히 높으므로 농축하면 손실의 가능성이 크다. 따라서 농축과정 없이 소량의 ethyl acetate에 MITC를 전량 회수하는 것이 분석법의 관건이다.

- MITC 분자 내에는 질소와 황원자를 각각 1개씩 함유하고 있으므로 GLC 분석 시의 검출기로는 NPD와 FPD가 가능하다. FPD는 sulfur mode로 사용하는데 선택성 및 안정도는 NPD보다 우수하나 감도가 낮고 peak 면적이 주입량의 제곱에 비례하므로 정량과정이 다소 불편한 단점이 있다. GLC에서 검체 분석은 내경 0.53 mm의 capillary column을 권장하며 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용한다. 내경 0.25 mm의 capillary column을 사용할 경우 splitless 검체주입법/승온조건을 사용하여 분리능 및 감도를 향상시킨다. MITC는 반응성이 있는 극성 화합물이므로 실용적 범위에서 가급적 머무름 시간을 빠르게 조절하는 것이 분석의 재현성 확보에 보다 유리하다.

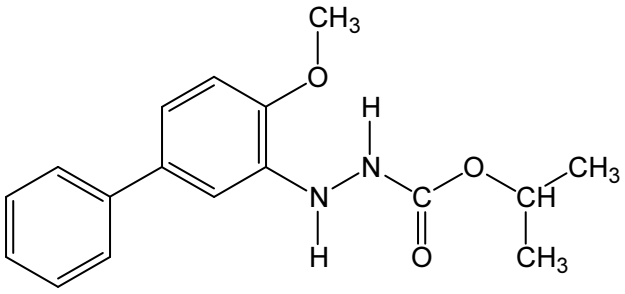
- 분석성분이 MITC이므로 MITC 표준품을 사용할 경우에는 dazomet와의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.

Dazomet 잔류량 (mg/kg) = MITC 잔류량 (mg/kg) × (dazomet 분자량 162.3) / (MITC 분자량 73.1)

8.4.59 잔류농약 분석법 4.1.4.87

비페나제이트(Bifenazate)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : bifenazate
화학명 (IUPAC) : isopropyl 3-(4-methoxybiphenyl-3-yl)carbazate
분자식 : $C_{17}H_{20}N_2O_3$
평균분자량 : 300.4
질량분석 시의 M+질량 : 300.2
Log P_{ow} : 3.4 (pH 7, 25℃)
물에 대한 용해도 : 2.06 mg/L (20℃)
증기압 : 3.8×10^{-4} mPa (25℃)
pKa : 12.94 (23℃)

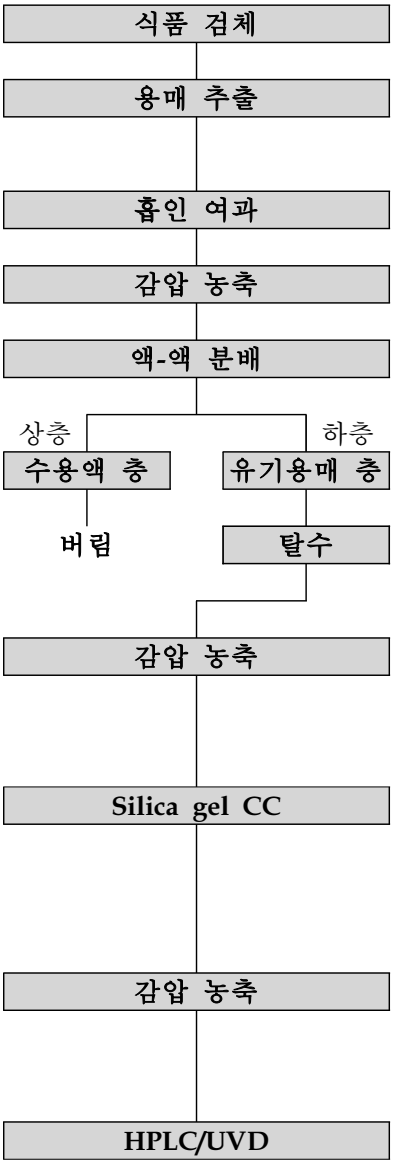
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bifenazate	0.01	-	0.1~1.0	0.1~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용성 농축액에 NaCl 수용액을 첨가하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 50g
- Acetone 100mL + 증류수 10mL 첨가
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- 35℃에서 acetone 증발
- 10% NaCl 수용액 50mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetonitrile에 녹인 5% ethylene glycol 1mL 첨가
- 35℃에서 증발 건고
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 3mL에 재용해
- SPE-silica 1g
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 3mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 20mL → 받음
- 35℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water/acetic acid (50/50/1, 0.1g ascorbic acid 함유) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)

분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물 (65/35, v/v)
검출기 파장 : UV 254 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Bifenazate는 주로 과수 및 채소류 재배 시에 발생하는 응애류를 방제하는데 사용하는 살응애제이다. 비침투성의 접촉제로서 성충뿐만 아니라 살란 작용도 나타내며 잔효력이 있다. 작물 중 잔류분 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 분해대사산물은 없으나 모화합물이 산화형태인 bifenazate-diazene과 상호 전환되므로 두 화합물을 통합하여 bifenazate 기준으로 표시한다.

- Bifenazate는 log P_{ow}가 3.4인 비극성 화합물이며 해리성은 무시할 정도이다. 휘발성은 3.8×10^{-4} mPa (25℃)로 낮고 분자 내에 hydrazine기 등을 갖고 있어 GLC 상 특성이 불량하므로 HPLC로 분석한다. 검체 중 bifenazate-diazene이 관찰될 경우 이를 환원하여 bifenazate로 전환, bifenazate 단일 화합물 형태로 분석한다.

- 검체 조제과정은 일반적 비극성 농약의 추출 및 정제과정을 준용하여 수행한다. 즉, 함수 검체를 acetone으로 추출하고 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용성 농축액에 NaCl 수용액을 첨가, 이온 강도를 높여 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액은 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하는데 세척 분획 없이 단일 용매로 용출시켜도 용출용매의 강도가 크지 않아 충분한 정제가 이루어진다.

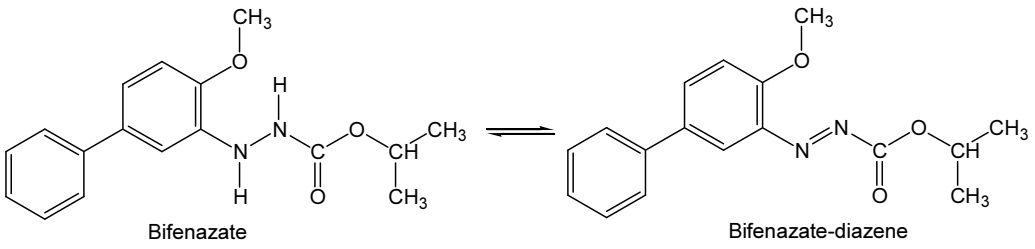


그림 1. Bifenazate의 산화-환원에 따른 상호전환

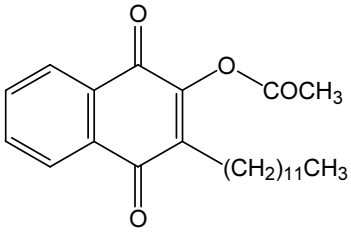
- Bifenazate는 그림 1에 나타낸 바와 같이 쉽게 산화되어 azo 형을 생성하며 모화합물 및 azo형은 상호 전환된다. 따라서 bifenazate의 단일 형태로 분석하기 위해서는 분석 과정 중 산화과정을 최대한 억제하여 신속하게 수행하여야 한다. 최종 용액은 산화를 방지하기 위하여 소량의 ascorbic acid를 첨가한 상태에서 보존하며 가급적 빠른 시간 내에 HPLC에 공시한다.

- 검체 조제과정 중 모화합물의 산화 형태인 bifenazate-diazene이 관찰될 경우에는 acetonitrile/0.2% ascorbic acid 수용액 (60/40, v/v)을 첨가하고 50℃에서 30분간 방치함으로써 azo형을 모화합물로 다시 환원시킬 수 있다.

8.4.60 잔류농약 분석법 4.1.4.88

아세퀴노실(Acequinocyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : acequinocyl
화학명 (IUPAC) : 3-dodecyl-1,4-dihydro-1,4-dioxo-2-naphthyl acetate
분자식 : $C_{24}H_{32}O_4$
평균분자량 : 384.5
질량분석 시의 M+질량 : 384.2
Log P_{ow} : 〉6.2 (25℃)
물에 대한 용해도 : 6.69×10^{-3} mg/L (20℃)
증기압 : 1.69×10^{-3} mPa (25℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

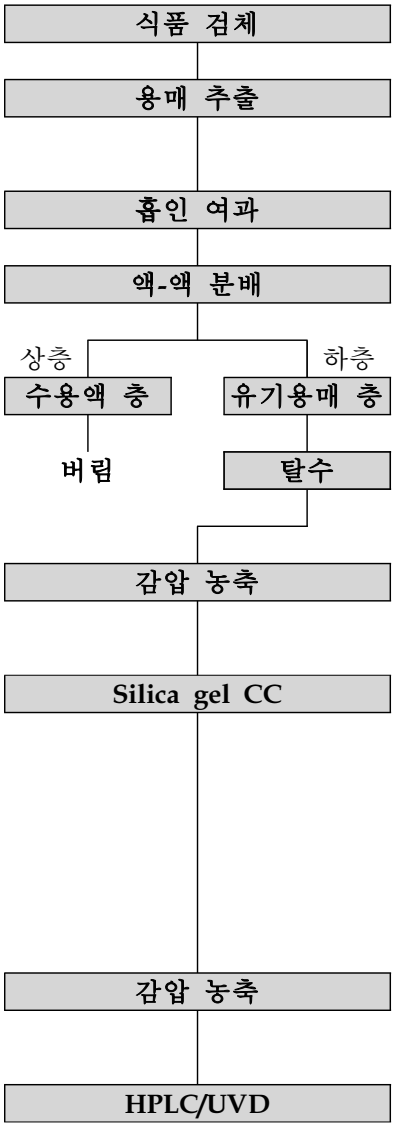
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Acequinocyl	0.027	-	0.2~2.0	0.1~1.0	-	-	-

* cRfd (US EPA, 2004).

2) 분석법 개요

세절한 검체를 산성화한 후 acetone으로 고속 마쇄, 추출하고 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 과량의 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- Acetone 100mL + acetic acid 0.5mL 첨가
- 5분간 고속 마쇄 추출
- Acetone 20mL로 잔류물을 씻어 합침
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 증발 건고
- *n*-Hexane 5mL에 재용해
- SPE-silica 1g
- *n*-Hexane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (10/90, 0.2% acetic acid 함유) 10mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (20/80, 0.2% acetic acid 함유) 15mL → 받음
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)

분리용 칼럼 : C_{18} (3.9 mm i.d. × 300 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물 (88/12, v/v, 0.1% phosphoric acid 함유)
이동상 유량 : 0.8 mL/min
검출기 파장 : UV 270 및 280 nm
주입량 : 20 µL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Acequinocyl은 주로 과수 및 채소류 재배 시에 발생하는 응애류를 방제하는데 사용하는 살응애제이다. 비침투성의 접촉제로서 호흡과정 중의 전자전달계를 저해하는데 성충뿐만 아니라 살란 작용도 나타내며 잔효력이 있다. 작물 중 잔류분 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 분해대사산물은 없어 모화합물에 한정된다.

- Acequinocyl은 quinone계 화합물로서 해리하지 않는 비극성의 화합물 ($\log P_{ow}$ 〉6.2)이나 휘발성이 낮고 열에 대한 안정성이 열등하여 보통 GLC로는 분석되지 않는다. 따라서 잔류분석법은 HPLC를 이용한다. Naphthoquinone의 긴 conjugation system이 내재하는 화학구조에서 예상되는 바와 같이 acequinocyl은 UV에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용하는 것이 최적이다.

- 추출은 검체를 산성화한 후 acetone을 사용, 마쇄 추출하는데 이때 산을 첨가하는 것은 추출과정 중 acequinocyl의 안정성을 확보하기 위한 것이다. 이와 같이 acequinocyl은 잔류분석 수준에서 광분해 등 그 안정성이 떨어져 분석 중에 분해되는 정도가 심하므로 각 과정마다 산을 첨가하여 안정화한다. 그럼에도 불구하고. 분석은 가급적 빠른 시간에 수행하여야 재현성 있는 분석 결과를 얻을 수 있다. 또한 분석실 환경 및 분석자의 숙련도에 따라 분석의 정밀도가 크게 영향을 받으므로 주기적으로 회수율을 검정하여 분석 결과의 신뢰성을 확보하여야 한다.

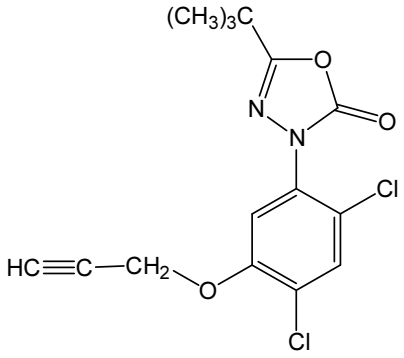
- 액-액 분배는 acetone 추출액에 다량의 NaCl 수용액을 첨가한 후 dichloromethane으로 2회 추출함으로써 acequinocyl이 충분히 회수된다. Chromatography에 의한 정제는 silica gel을 흡착제를 사용하여 정제하는데 acequinocyl은 비극성이므로 낮은 용출 강도에서도 용이하게 용출된다. 대부분의 불순물은 column에 존재하며 제거효과가 확실하게 나타난다.

- Acequinocyl의 UV에서의 최대흡광파장은 250 nm 부근과 270~280 nm 범위이다. HPLC에서의 측정파장은 270 및 280 nm로 제시되어 있으나 검체용액 중 간섭물질의 존재 유무에 따라 최적 파장을 선정하여 분석하는 것이 가능하다. Acequinocyl은 매우 비극성의 화합물이므로 이동상 중 acetonitrile의 높은 함량에도 머무름 시간은 길게 나타나 간섭물질과의 분리가 비교적 용이하다. 이동상에는 phosphoric acid나 acetic acid와 같은 산을 첨가, 산성을 유지하여야 peak의 모양이 대칭형으로 나타난다.

8.4.61 잔류농약 분석법 4.1.4.89

옥사디아길(Oxadiargyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : oxadiargyl
화학명 (IUPAC) : 5-*tert*-butyl-3-[2,4-dichloro-5-(prop-2-ynyloxy)phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-one
분자식 : $C_{15}H_{14}Cl_2N_2O_3$
평균분자량 : 341.2
질량분석 시의 M+질량 : 340.0
Log P_{ow} : 3.95
물에 대한 용해도 : 0.37 mg/L
증기압 : 2.5×10^{-3} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

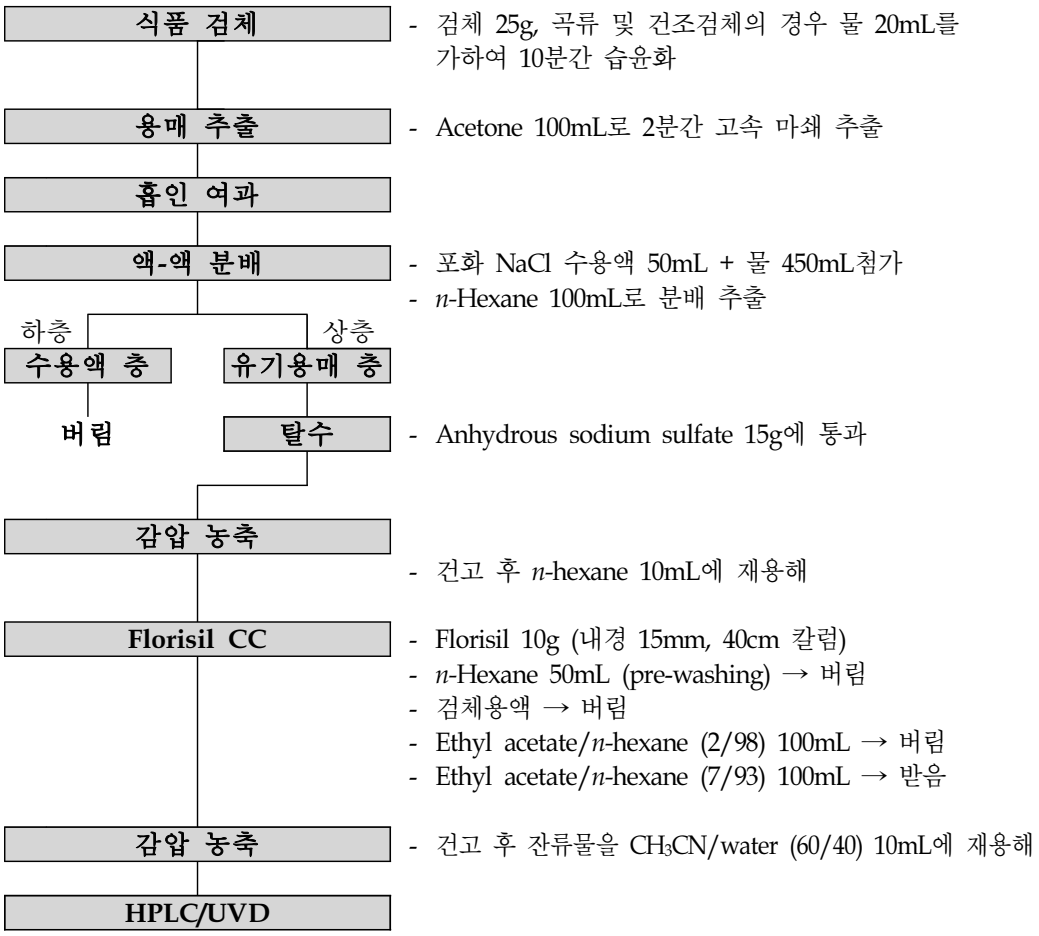
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Oxadiargyl	0.008	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체를 습윤화하고 acetone을 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인 여과한 후 포화식염수와 물을 가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)

분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (60/40, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : UV 220 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

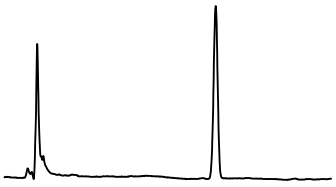


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
oxadiargyl (12.9분) 8 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (60/40, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
이온화 : APCI, positive-ion mode
주입량 : 10 μL
Capillary temperature : 275℃
Cone voltage : 78 V
분자량 범위 : 100~400

표 1. LC-MS APCI(+) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Oxadiargyl	13.5	340	341

6) 분석법 해설

- Oxadiargyl은 oxadiazole계 선택성 제초제로서 곡류를 위시하여 밭작물 및 채소류에 광범위하게 사용된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 4.0인 비극성의 비해리성 화합물이나 휘발성은 낮고 분자 내에 3중 결합 등 열에 취약한 작용기를 가지고 있어 GLC로는 분석이 어렵다. 따라서 기기분석법으로는 HPLC를 이용하며 비록 짧은 파장이나 220 nm에서의 흡광 특성이 우수하므로 HPLC/UVD로 분석하는 것이 최선의 방법이다.

- 추출 및 분배법은 중간~비극성 농약 잔류분석법에서 일상적으로 사용되는 방법이며 흡착 chromatography 방법에 의하여 충분히 정제된 추출액의 조제가 가능하다. 즉, 검체로부터 대상성분을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone 추출액을 물로 희석하고 NaCl를 첨가하여 *n*-hexane으로 분배한다 이 방법은 추출액을 농축하지 않아도 되므로 그 과정이 간편하며 oxadiargyl은 확실한 효율로 회수된다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액으로 구성된 세정 및 용출 용매체계에서 용출 분획에는 색소가 거의 함유되지 않아 정제 효과가 확실하다.

- Oxadiargyl은 흡광파장이 220 nm로 짧으므로 장파장을 측정파장으로 사용하였을 때에 비하여 간섭물질의 혼입 가능성이 크다. 따라서 머무름 시간을 가급적 길게 설정하여 충분한 분리가 이루어지도록 이동상을 조절한다. 또한 oxadiargyl 보다 늦게 용출되는 불순물들을 충분히 세정하여 간섭을 최소화함으로써 분석의 재현성을 확보한다.

표 2. 쌀 중 회수율 및 정량한계

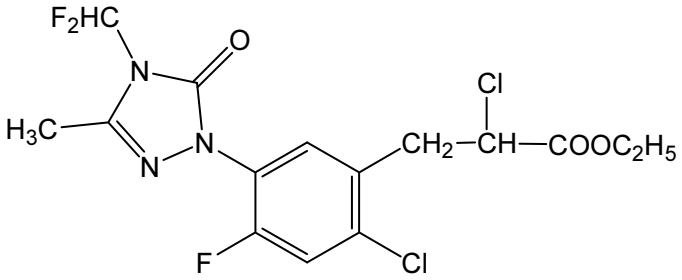
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Oxadiargyl	0.2	86.3±1.7	0.02
	1.0	85.1±2.8	

* 3반복 평균±표준편차.

8.4.62 잔류농약 분석법 4.1.4.90

카펜트라존-에칠(Carfentrazone-ethyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : carfentrazone-ethyl
화학명 (IUPAC) : ethyl (*RS*)-2-chloro-3-[2-chloro-5-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-4-fluorophenyl]propionate
분자식 : $C_{15}H_{14}Cl_2F_3N_3O_3$
평균분자량 : 412.2
질량분석 시 M+질량 : carfentrazone-ethyl 411.0, carfentrazone-methyl ester 397.0
Log P_{ow} : 3.36
물에 대한 용해도 : 0.012 mg/L (20℃), 0.022 mg/L (25℃), 0.023 mg/L (30℃)
증기압 : 1.6×10^{-2} mPa (25℃), 7.2×10^{-3} mPa (20℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Carfentrazone-ethyl	0.03	0.1	0.1	-	-	-	-

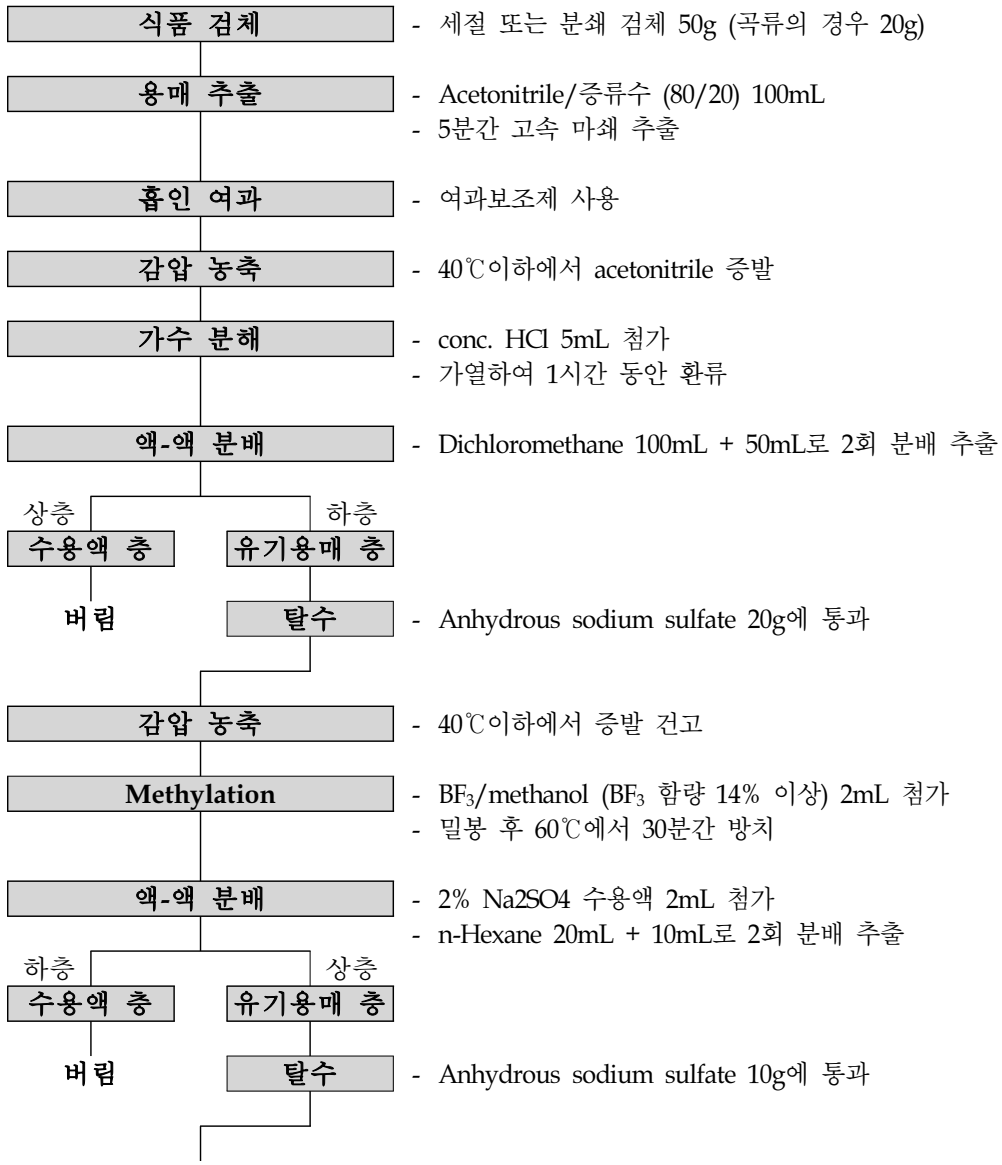
* EC (2003).

2) 분석법 개요

농산물 검체에 acetonitrile/증류수 혼합액을 가하고 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 흡

인여과 하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 산성조건에서 가열, acid체로 가수분해한다. 반응액에서 acid체를 dichloromethane으로 분배 추출한 후 methanol/BF3 시약을 사용하여 methylation한다. 반응액으로부터 methyl ester체를 *n*-hexane으로 분배 추출한 후 농축, 건고하고 ethyl acetate에 재용해하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 10 m)
칼럼온도 : 215~235℃
주입부 온도 : 250~270℃
검출기 온도 : 280~300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Carfentrazone-ethyl은 벼를 위시하여 곡류 재배 중 광엽 잡초를 방제하기 위하여 사용되는 제초제이다. 작용기작은 protoporphyrinogen oxidase를 저해하여 세포막을 파괴하여 살초작용을 나타내는데 잡초 발생 초기에 사용되는 접촉형 약제이다. Carfentrazone-ethyl은 살포 후 분자 내 propionate의 ethyl기가 빠른 속도로 분해되어 acid체를 생성하는데 이 acid체가 실제 활성성분이다. 따라서 잔류분은 모화합물과 acid체를 합한 총량으로 정의된다.

- 모화합물인 carfentrazone-ethyl은 log P_{ow} 3.36인 비극성 화합물로서 증기압이 1.6×10^{-2} mPa (25℃)로 어느 정도 휘발성도 있으므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 그러나 acid체는 carboxylic acid기의 극성으로 인하여 직접 GLC로 분석하는 것이 어렵다. 따라서 본 분석법에서는 검체로부터 모화합물과 acid체를 동시에 추출한 후, 그림 1에 나타낸 바와 같이 모화합물을 동일한 acid체를 가수분해하고 재차 methylation하여 carfentrazone-methyl ester 형태로 전환, 두 성분을 함께 분석한다.

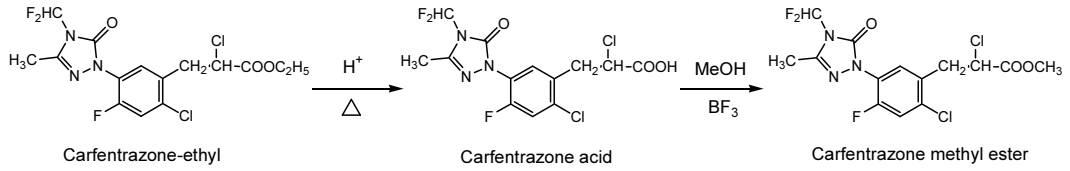


그림 1. Carfentrazone-ethyl의 산 가수분해 및 methylation 반응

- 검체 추출은 acetonitrile/증류수 혼합액을 사용하여 모화합물과 acid체를 동시에 추출하며 추출액을 농축하여 액-액 분배과정 없이 직접 가수분해 반응에 공시한다. 이는 모화합물과 acid체의 극성이 매우 상이하여 액-액 분배를 할 경우 각각 유기용매/수용액 층에 별개로 존재하기 때문이다. 두 성분을 모두 유기용매 층으로 분배시키기 위하여 산을 첨가하여 분배하는 방법이 가능하나 후속 가수분해과정 및 액-액 분배과정과 중복되므로 불순물 제거효과가 거의 없다.

- 가수분해는 농축 수용액에 강산을 직접 첨가하고 가열, 환류하여 수행한다. 분자 내 propionate의 ester 결합은 산 조건에서도 용이하게 가수분해되므로 격렬한 알칼리조건을 사용할 필요는 없으며 이 후 수행하는 액-액 분배과정이 편리한 장점도 있다. 액-액 분배는 이미 산이 존재하는 상태에서 carboxylic acid기의 이온화가 억압되어 있으므로 반응액을 직접 dichloromethane으로 추출하며 높은 효율로 acid체가 회수된다.

- Dichloromethane 추출액은 농축한 후 methylation하여 acid체를 methyl ester로 전환시킨다. 산촉매하에서 일어나는 전형적인 Fischer esterification의 변형으로 dry HCl나 H_2SO_4 대신 BF_3나 BCl_3 등의 Lewis 강산을 사용할 경우 탈수제로서의 작용을 동시에 수행하므로 신속히 반응이 완결되는 장점이 있다. BF_3나 BCl_3는 반응성이 큰 휘발성 화합물로 다루기가 까다로우나 다행히 methanol에 14% BF_3가 함유된 시약을 시판하고 있고 입수도 용이하다. 반응은 충분히 빠른 속도로 진행되며 매우 정량적이므로 반응 불량 등 오류의 가능성은 거의 없다. 반응 후 BF_3는 단순히 물만을 첨가하여도 쉽게 분해되는데 methyl ester의 *n*-hexane 분배 시 salting-out effect에 의한 분배효율을 증대시키기 위해서 Na_2SO_4 수용액을 첨가한다. Na_2SO_4는 중성의 염으로 그 작용은 NaCl 수용액 첨가와 완전 동일하나 2가 이온이므로 이온강도가 상대적으로 1.6배 높다.

- Carfentrazone-methyl ester는 분자 내에 3개의 질소, 2개의 염소 그리고 3개의 불소를 함유하고 있으므로 GLC 분석 시 검출기로는 NPD와 ECD 모두 사용이 가능하다. 감도 및 안정성은 ECD가 더 높으나 간섭물질에 대한 선택성은 NPD가 우수하다. 본 분석법

의 검체 조제과정에는 흡착크로마토그래피와 같은 추가 정제과정이 생략되어 있으므로 우선적으로 NPD를 제시하였으나 간섭정도에 따라 ECD도 충분히 사용 가능하다.

- Carfentrazone-ethyl은 분자내의 propionate 2번 탄소가 chiral성이므로 enantiomer가 존재하며 시판품은 enantiomer 쌍의 혼합물인데 일상적 GLC 조건에서는 서로 분리되지 않고 하나의 peak로 나타나게 된다.

- 제시된 GLC 조건은 분석의 재현성을 최우선으로 하여 0.53 mm 내경의 capillary column을 채용하고 검체용액 주입은 packed inlet에서 전량 주입하는 직접주입법을 사용한다. 또한 column 온도는 carfentrazone-methyl ester가 적절한 머무름 시간에 유출되도록 조절하되 등온조건을 사용한다.

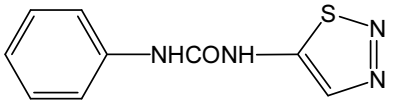
- 분석성분이 carfentrazone-methyl ester이므로 carfentrazone-methyl ester를 합성하여 표준품으로 사용할 경우에는 carfentrazone-ethyl과의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.

Carfentrazone-ethyl 잔류량 (mg/kg) = carfentrazone-methyl ester 잔류량 (mg/kg)
× (carfentrazone-ethyl 분자량 412.2) / (carfentrazone-methyl ester 분자량 398.2)

8.4.63 잔류농약 분석법 4.1.4.92

티디아주론(Thidiazuron)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : thidiazuron
화학명 (IUPAC) : 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea
분자식 : $C_9H_8N_4OS$
평균분자량 : 220.3
질량분석 시의 M+질량 : 220.0
Log P_{ow} : 1.77 (pH 7.3)
물에 대한 용해도 : 31 mg/L (pH 7, 25℃)
증기압 : 4×10^{-6} mPa (25℃)
pKa : 8.86

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

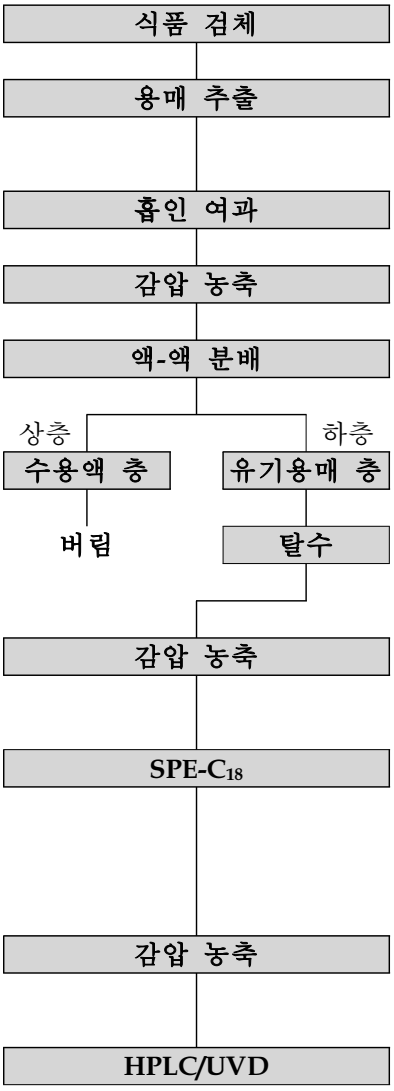
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Thidiazuron	0.0393	-	0.1~0.2	0.1	-	-	-

* cRfd (US EPA, 2005).

2) 분석법 개요

세절 또는 분쇄한 함수 검체를 acetone으로 고속 마쇄, 추출하고 흡인 여과한다. 여액을 농축하여 acetone을 날려 보내고 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 추출액을 탈수, 감압 농축하고 고상추출용 (SPE) C_{18} 카트리지를 이용한 분배크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 50g
- Acetone 100mL 첨가
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제 사용
- 40℃이하에서 acetone 증발
- 증류수 50mL + 포화 NaCl 수용액 10mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 증발 건고
- Ethyl acetate 5mL에 재용해
- SPE-C_{18} 1g
- Ethyl acetate 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 5mL → 받음
- Ethyl acetate 50mL → 받음
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것

이동상 : acetonitrile/물 (28/72, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 280 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Thiadiazuron은 식물호르몬인 cytokinin과 유사한 활성을 나타내는 식물생장조절제로서 목화의 수확성 향상을 위한 탈리 촉진, 포도 및 참외 등 과채류의 착립 증진 또는 과립 비대 촉진을 위하여 주로 사용된다. 작물 중 잔류분 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 분해대사산물은 없어 모화합물에 한정된다.

- Thiadiazuron은 phenylurea계 화합물로서 log P_{ow} 값이 1.77로 극성이 있으며 증기압이 4×10^{-6} mPa (25℃)으로 휘발성이 낮고 분자 내 urea기의 열분해성으로 인하여 GLC로는 분석하기 어렵다. 따라서 잔류분석법은 HPLC를 이용한다. Urea기와 thiadiazole ring이 내재하는 화학구조에서 예상되는 바와 같이 thiadiazuron은 UV에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용하는 것이 최적이다.

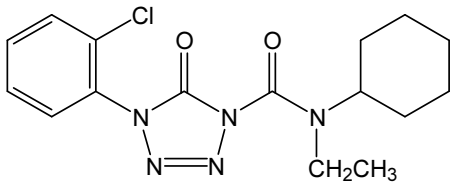
- 추출은 함수 검체를 acetone을 사용, 마쇄 추출하며 흡인 여과한 후 추출액을 감압 농축한다. Thiadiazuron은 극성이 상당히 있으므로 acetone을 제거하지 않을 경우 액-액 분배과정에서 dichloromethane으로의 분배 효율이 저하될 위험성이 있다. 액-액 분배는 농축된 추출액에 NaCl 수용액을 가하여 이온강도를 높이고 dichloromethane으로 2회 추출하는데 thiadiazuron의 pKa 8.9이므로 pH 7이하인 일상적 수용액 조건에서 해리에 따른 분배 효율의 저하 가능성은 거의 없다.

- HPLC에서 사용하는 이동상은 acetonitrile/deionized water 혼합액을 사용하는데 대상 성분이 극성이 있으므로 acetonitrile 함량을 낮추어 머무름 시간을 충분히 길게 설정, 간섭물질과의 분리 가능성을 높인다. 앞서 언급한 바와 같이 thiadiazuron의 pKa 8.9이며 pH 7이하인 일상적 수용액에서는 해리하지 않으므로 이온화를 억압할 필요는 없다. 그러나 peak가 넓어지는 등 이온화 현상이 관찰될 경우에는 deionized water 대신 20mM 정도의 phosphate buffer (pH 6~7)를 사용함으로써 간단히 해결할 수 있다. Thiadiazuron의 UV에서의 측정파장은 280nm로 비교적 장파장이므로 선택성이 높아 단파장 측정에 비하여 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성이 적다.

8.4.64 잔류농약 분석법 4.1.4.93

펜트라자마이드(Fentrazamide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fentrazamide
화학명 (IUPAC) : 4-(2-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-*N*-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazole-1-carboxamide
분자식 : $C_{16}H_{20}ClN_5O_2$
평균분자량 : 349.8
질량분석 시 M+질량 : fentrazamide 349.1, *N*-methyl-CPT 210.0
Log P_{ow} : 3.60 (20℃)
물에 대한 용해도 : 2.3 mg/L (20℃)
증기압 : 5×10^{-5} mPa (20℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

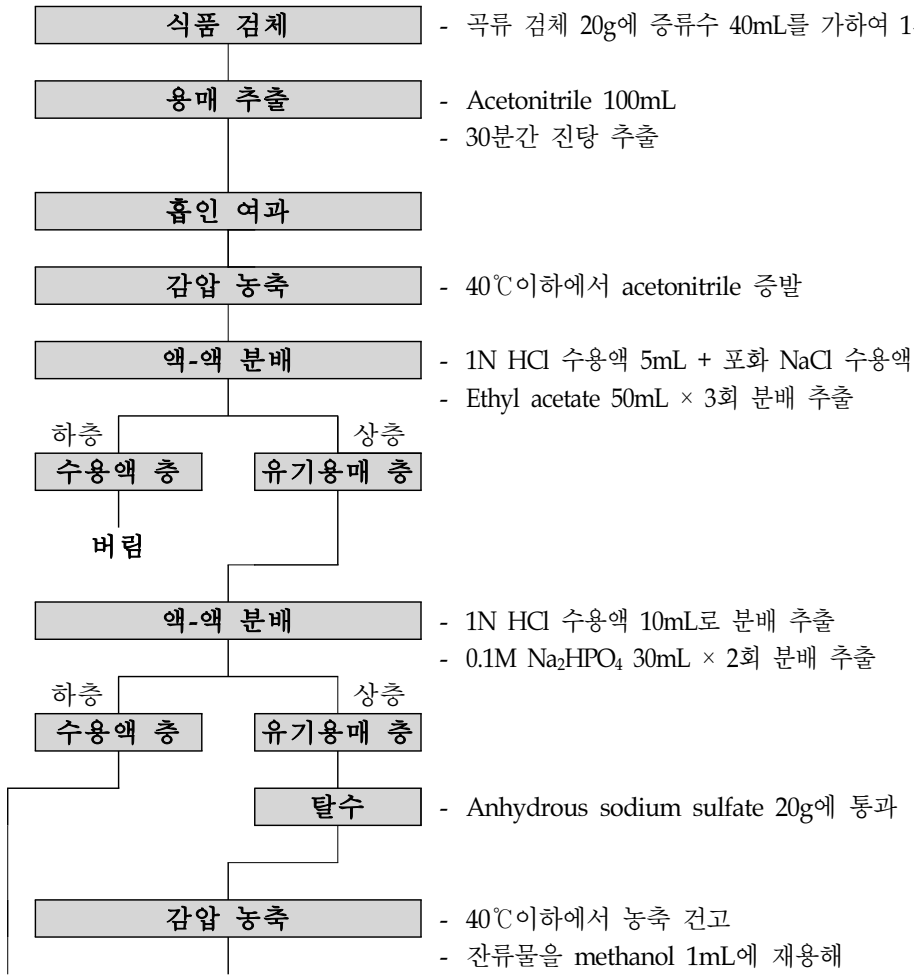
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fentrazamide	0.005	0.1	-	-	-	-	-

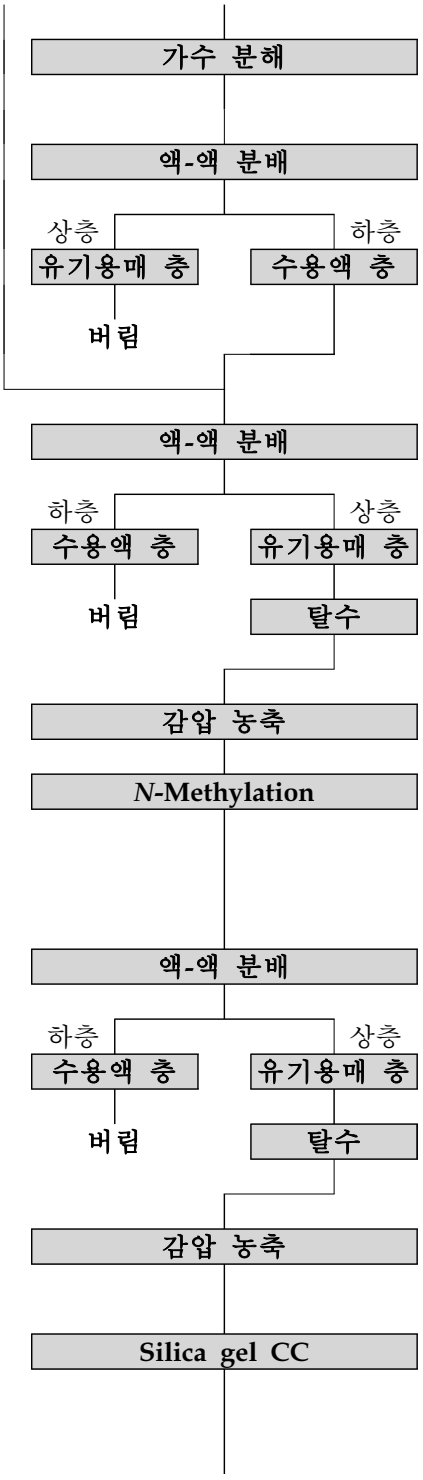
2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 농산물 검체에 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄하여 모화합물 fentrazamide와 대사산물 CPT를 동시에 추출한다. 추출물을 흡인여과 하고 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보낸다. 농축 수용액을 산성화한 후 NaCl 수용액을 첨가하고 ethyl acetate로 분배 추출하여 fentrazamide와 CPT 모두를 회수한다. Ethyl acetate 추출액을 산

성/약알칼리성 수용액으로 순차적으로 분배 추출하여 fentrazamide는 ethyl acetate 층, CPT는 수용액 층으로 각각 분배한다. Fentrazamide가 존재하는 ethyl acetate 층은 탈수한 후 감압 농축, 건고하고 NaOH 수용액으로 가수분해한다. 가수분해액을 *n*-hexane으로 분배 추출하여 버린 다음, 수용액 층을 CPT가 존재하는 수용액 층과 합한다. 수용액 층을 산성화하고 ethyl acetate로 분배 추출하여 CPT 전량을 회수한다. Ethyl acetate 층을 감압 농축, 건고하고 CH_3I/NaH/DMSO 시약을 가하여 *N*-methylation한다. 반응액을 ethyl acetate로 분배 추출하여 *N*-methyl-CPT를 회수한다. Ethyl acetate 분배액을 탈수하고 감압 농축, 건고한 후 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- 1N NaOH 10mL 첨가
- 30℃에서 1시간 진탕

- 증류수 20mL 첨가
- *n*-Hexane 30mL × 2회 분배 추출

- 1N HCl 수용액 20mL 첨가
- Ethyl acetate 50mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃이하에서 농축 건고

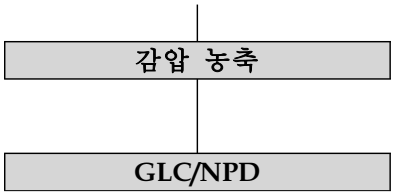
- *n*-Hexane 1mL + CH_3I 1mL + dimethyl sulfoxide 1mL + NaH 0.1g 첨가
- 1분간 교반 후 20분간 실온 방치
- 증류수 30mL로 씻어 분액여두에 옮김

- Ethyl acetate 30mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃이하에서 농축 건고
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/50) 5mL에 재용해

- SPE-silica 1g
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/50) 5mL → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/50) 20mL → 받음



- 40℃이하에서 농축 건고
- Acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.2~0.53 mm i.d. × 30 m)
칼럼온도 : 170℃
주입부 온도 : 210℃
검출기 온도 : 250℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 1.0~10.0 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 1 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Fentrazamide는 tetrazolinone계 제초제로서 주로 벼 재배 시 발생하는 피를 위시하여 1년생 잡초를 방제하는데 사용되는 잡초 발생전에 처리하는 약제이다. Fentrazamide는 작물 및 환경 중 amide기가 용이하게 가수 분해되어 주요 대사산물로서 CPT [1-(2-chlorophenyl)-4,5-dihydro-1*H*-tetrazol-5-one]를 생성하는데 독성학적 중요성이 인정되는 화합물이므로 분석대상 성분이 된다. 따라서 잔류분 정의는 모화합물과 CPT를 합한 총량으로 정의된다.

- 모화합물인 fentrazamide는 log P_{ow} 3.60인 비극성 화합물이나 증기압이 5×10^{-5} mPa (20℃)로 휘발성이 낮고 분자 내에 amide기 등 열분해 가능성이 있으므로 GLC로 분석하기 어렵다. 대사산물인 CPT는 융점이 121℃인 무색 결정으로 log P_{ow} -0.74 (pH 7.1, 20℃), 물에 대한 용해도 (g/L)가 <2.4 (pH 1~2), 2.4~4 (pH 2~4), 4~200 (pH 4~7), > 250 (pH >7)이며 pKa 4.6로 알려져 있는데 극성의 약산성 화합물이므로 이 또한 GLC를 이용하여 분석하기는 힘들다.

- 따라서 제시한 분석법은 모화합물인 fentrazamide와 대사산물인 CPT를 검체로부터 동시에 추출하고, fentrazamide의 가수분해성이 용이한 점을 이용하여 분석과정 중에 fentrazamide를 CPT로 전환, 총 CPT를 기준으로 분석하는 원리이다. CPT는 tetrazole ring의 질소 원자에 결합된 수소 원자가 해리성이므로 methyl iodide 시약으로 용이하게 methylation되며 *N*-methyl-CPT는 비해리성의 중성 화합물이므로 충분히 GLC로 분석이 가능하다.

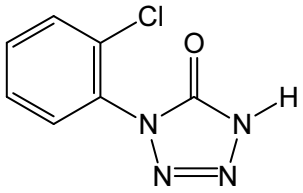


그림 1. 대사산물 CPT
[1-(2-chlorophenyl)-4,5-dihydro-1*H*-tetrazol-5-one]의 분자구조

- 추출은 습윤화한 검체에 acetonitrile을 가하여 진탕, fentrazamide와 CPT를 동시에 추출한다. Fentrazamide는 log P_{ow}가 3.60인 중성 화합물이므로 acetonitrile로 충분히 추출된다. CPT는 약산성이고 log P_{ow}가 -0.74 (pH 7.1)이나 곡류 검체 용액의 pH는 일상적으로 5~7이므로 추출 조건에서의 log P_{ow} 값은 -0.74 보다 크다. 또한 acetonitrile은 methomyl과 같이 log P_{ow} 값이 0.1인 극성 화합물도 충분히 추출하므로 추출 효율에 대한 문제는 없다. 추출액은 농축한 후 ethyl acetate로 fentrazamide와 CPT를 동시에 분배 추출하는데 CPT의 해리성을 억압, 분배율을 높이기 위하여 수용액 층의 산도를 산성조건으로 조절한다.

- Ethyl acetate 층에 함께 존재하는 Fentrazamide와 CPT는 일련의 액-액 분배과정을 거쳐 유기용매와 수용액 층에 각각 존재하도록 분리한다. 즉, ethyl acetate 층을 약알칼리성인 disodium phosphate 수용액으로 추출하면 CPT는 염의 형태로 수용액 층으로 분배되고 fentrazamide는 해리하지 않는 화합물이므로 ethyl acetate 층에 잔존한다.

- Fentrazamide를 함유하고 있는 ethyl acetate 층은 감압 농축, 건고한 후 강알칼리로 가수분해, CPT로 전환한다. 가수분해 반응액은 여전히 알칼리성이므로 *n*-hexane으로 추출하여 버림으로써 비극성의 간섭물질 대부분을 제거한다. 수용액 층은 CPT를 함유하고 있는 앞서의 수용액과 합치고 산성화한 후 ethyl acetate로 분배 추출함으로써 검체 중 fentrazamide와 CPT 잔류분을 총 CPT 형태로 회수할 수 있다.

- CPT의 유도체 생성 반응은 전형적인 친핵성 치환반응 (S_N 2)이다. 즉, tetrazole ring의 질소 원자에 결합된 수소는 약한 해리성을 나타내나 강염기인 NaH을 첨가하면 산-염기 반응에 의하여 쉽게 proton으로 이탈된다. 생성된 CPT 음이온은 강한 nucleophile이므로 methyl iodide를 공격, 친핵성 치환반응이 용이하게 일어나게 된다. 반응용매는 S_N 2 반응에 최적인 극성의 aprotic solvent로서 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용한다.

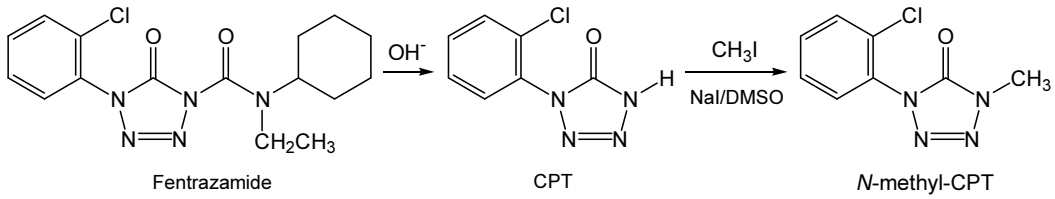


그림 2. Fentrazamide의 가수분해 및 CPT의 methylation 반응

- 액-액 분배에 의하여 검체로부터 함께 추출된 불순물이 상당량 제거되었으며 GLC 검출기인 NPD의 선택성이 높으므로 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정은 세척 분획 없이 단일 용매로 *N*-methyl-CPT를 용출시켜도 무방하다.

- *N*-methyl-CPT는 분자 내에 4개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 GLC 분석 시 검출기로는 NPD가 최적이다. 염소 원자는 1개만을 함유하고 있으므로 ECD에 대한 감도는 거의 없다. 제시된 GLC 조건 중 분석의 재현성을 최우선으로 하여 0.53 mm 내경의 capillary column을 채용하고 검체용액 주입은 packed inlet에서 전량 주입하는 직접주입법을 권장한다. 또한 column 온도는 *N*-methyl-CPT가 적절한 머무름 시간에 유출되도록 조절하되 등온조건을 사용한다.

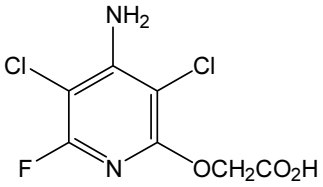
- 분석성분이 *N*-methyl-CPT이므로 CPT나 *N*-methyl-CPT를 표준품으로 사용할 경우에는 fentrazamide와의 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용하여 잔류량을 모화합물 기준으로 환산한다.

Fentrazamide 잔류량 (mg/kg) = CPT 잔류량 (mg/kg) × (fentrazamide 분자량 349.8) / (*N*-methyl-CPT 분자량 196.6)
Fentrazamide 잔류량 (mg/kg) = *N*-methyl-CPT 잔류량 (mg/kg) × (fentrazamide 분자량 349.8) / (*N*-methyl-CPT 분자량 210.6)

8.4.65 잔류농약 분석법 4.1.4.94

플러옥시피르(Fluroxypyr)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fluroxypyr
화학명 (IUPAC) : 4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyridyloxyacetic acid
분자식 : $C_7H_5Cl_2FN_2O_3$
평균분자량 : 255.0
질량분석 시 fluroxypyr-butyl ester의 M+질량 : 310.0
Log P_{ow} : -1.24
물에 대한 용해도 (mg/L) : 5,700 (pH 5.0), 7,300 (pH 9.2)
증기압 : 3.78×10^{-6} mPa (20℃)
pKa : 2.94, 약산성

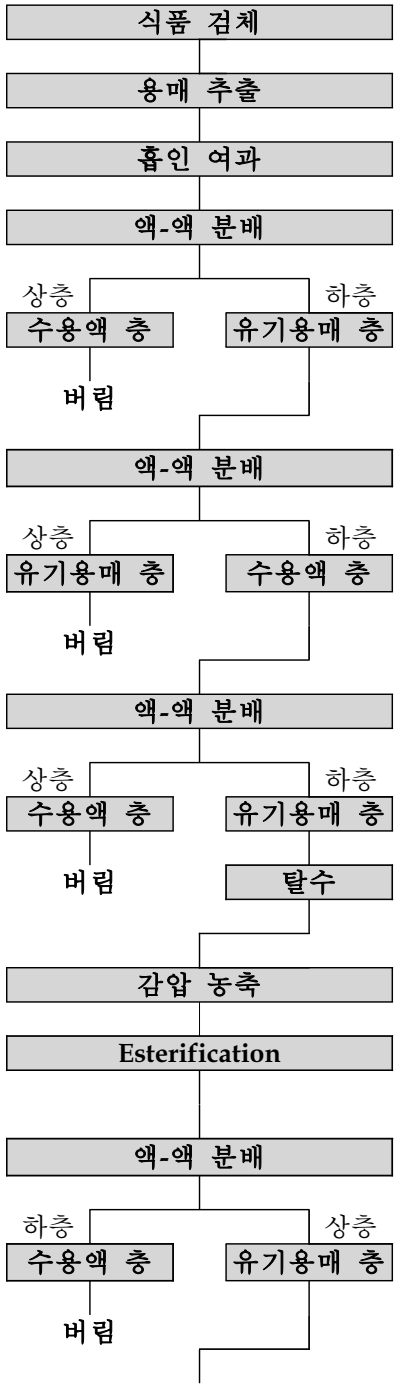
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fluroxypyr	0.8	-	0.1	-	-	-	-

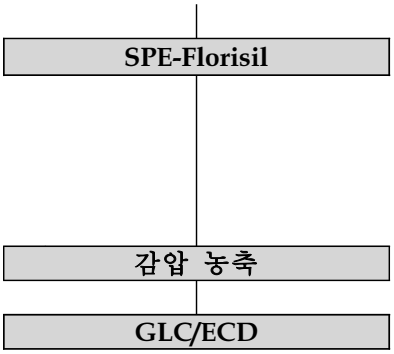
2) 분석법 개요

세절 검체에 NaOH 수용액을 가하여 알칼리화하고 methanol을 가하여 진탕 추출한다. 추출액을 ion-associated partition법으로 정제하고 분배 추출물을 산 존재 하에서 butylation한다. 생성된 ester를 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g
- 20% NaOH 수용액/methanol (10/90) 50mL
- 1시간 진탕 추출 후 8시간이상 방치
- 2N H_2SO_4 50mL + 물 100mL 첨가
- pH 2이하가 되도록 조절
- Dichloromethane 50mL × 3회 분배 추출
- 0.5M $NaHCO_3$ 수용액 50mL로 분배 추출
- 2N H_2SO_4 50mL 첨가
- pH 2 이하가 되도록 조절
- Dichloromethane 20mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 감압 농축, 건고
- 잔류물을 butanol/H_2SO_4 (98/2) 1mL에 재용해
- 100℃에서 30분간 반응
- 물 27mL 첨가
- *n*-Hexane 5mL × 2회 분배 추출



- SPE-Florisil 1000mg 카트리지
- *n*-Hexane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Dichloromethane/*n*-hexane (15/85) 5mL → 버림
- CH_3CN/dichloromethane/*n*-hexane (1/49/50) 10mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 220℃
주입부 온도 : 240℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Fluroxypyr는 pyridinecarboxylic acid계 제초제로 auxin 유사활성의 광엽 잡초 방제시에 잡초발생후 처리제로 주로 사용된다. Fluroxypyr는 2-butoxy-1-methylethyl 또는 1-meptyl과 같은 ester 형태의 중성 화합물 형태로 제조, 전면 살포되나 사용 후 환경이나 생체 중에서 빠른 속도로 가수분해되어 acid 형태로 전환되며, 이러한 acid 형태

가 실제 유효성분으로 알려져 있다. 따라서 모화합물과 더불어 acid 형태의 대사산물이 대상 분석성분에 포함되어야 한다.

- Fluroxypyr의 잔류분은 ester와 acid를 합하여 총량을 acid 기준으로 표시한다. 물리화학적 특성은 ester와 acid 간에 대조적인 특성을 보여 ester는 비극성 화합물인 반면 acid는 약하게 해리하는 약산성 화합물이다. 따라서 이들 화합물들을 동시에 분석할 수 있는 분석기기는 현재 없으므로 검체 조제과정 중 ester와 acid를 분리, 화합물 군별로 개별 분석하거나, ester를 acid로 전환하여 acid 총량 기준으로 분석하는 접근법이 이용된다.

- 본 분석법에서는 두 가지 이상의 ester와 acid를 모두 포함하기 위하여 후자의 방법으로 총 acid 잔류분을 정량한다. Fluroxypyr는 분자 내에 존재하는 carboxylic acid기로 인하여 GLC로 직접 분석하기는 힘들다. 또한 자외 영역의 흡수파장이 짧으며 형광특성도 없으므로 통상적 HPLC법으로도 분석이 어렵다. 따라서 주로 사용되는 분석법은 분자 내에 2개의 염소 원자가 있다는 점에 착안하여 carboxylic acid를 ester화, 휘발성을 높여 GLC/ECD로 분석하는 것이 보편적이다.

- 분석 대상이 ester와 acid 모두이므로 검체를 알칼리성으로 조절하여 ester를 acid로 전환한 후 methanol로 추출한다. 분배 과정은 phenoxyalkanoic acid나 graminicide 분석 시와 유사한 ion-associated partition법을 사용하며 정제 효과가 우수하다. 즉, fluroxypyr의 pKa가 2.9이므로 pH 1 이하에서는 이온화가 억압되어 유기용매 가용성이 되는 반면, 알칼리성에서는 해리되어 수용성 이온이 되는 점을 이용하여 분배 시에 세정과정을 수행함으로써 유지를 비롯한 비극성 간섭물질을 효과적으로 제거한다.

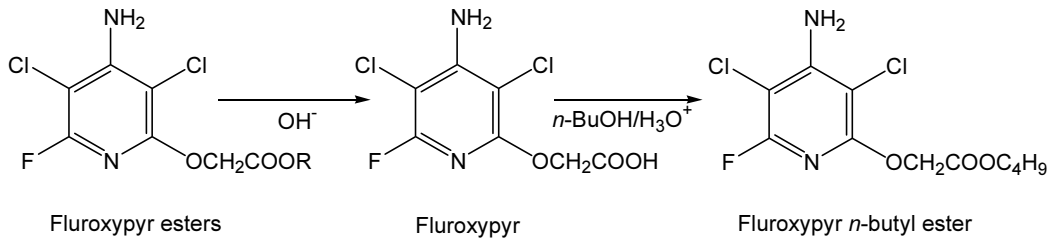


그림 1. Fluroxypyr 분석에서 추출 시 가수분해 및 ester 형성 반응

- Fluroxypyr 분석 과정에서 검체 추출 시의 가수분해 및 ester 형성 반응을 그림 1에 나타내었다. Ester 형성은 일반적 Fischer esterification 반응을 이용, 산 존재 하에서

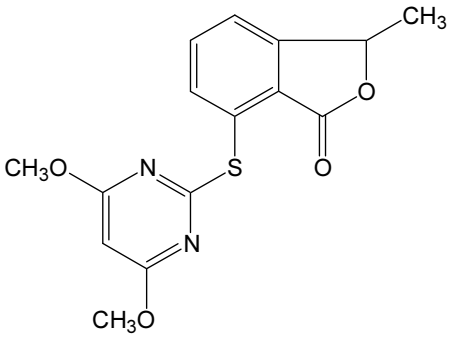
n-butanol을 반응시켜 butyl ester화 한다. 반응 시약은 제시한 *n*-butanol/sulfuric acid (98/2) 대신 시판되는 14% BF_3/*n*-butanol을 사용하여도 무방하며 이때 ester 반응은 보다 빠르게 진행된다. 또한 GLC에서 충분한 분리가 가능할 경우 haloxyfop 분석법과 유사하게 butylation 대신 BF_3/methanol을 사용하여도 무방하나 SPE-Florisil의 용출 용매체계는 methyl ester 화합물에 최적화하여 조절하여야 한다.

- Fluroxypyr는 분자 내에 2개의 염소 원자를 함유하고 있어 단순 ester화를 하여도 ECD에 대한 감도는 높으므로 haloalcohol을 사용하여 분자 내에 추가로 halogen을 도입할 필요는 없다.

8.4.66 잔류농약 분석법 4.1.4.96

피리프탈리드(Pyriftalid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : pyriftalid
화학명 (IUPAC) : (*RS*)-7-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylthio)-3-methyl-2-benzofuran-1(3*H*)-one
분자식 : $C_{15}H_{14}N_2O_4S$
평균분자량 : 318.4
질량분석 시의 M+질량 : 318.1
Log P_{ow} : 2.6
물에 대한 용해도 : 1.8 mg/L (25℃)
증기압 : 2.2×10^{-5} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

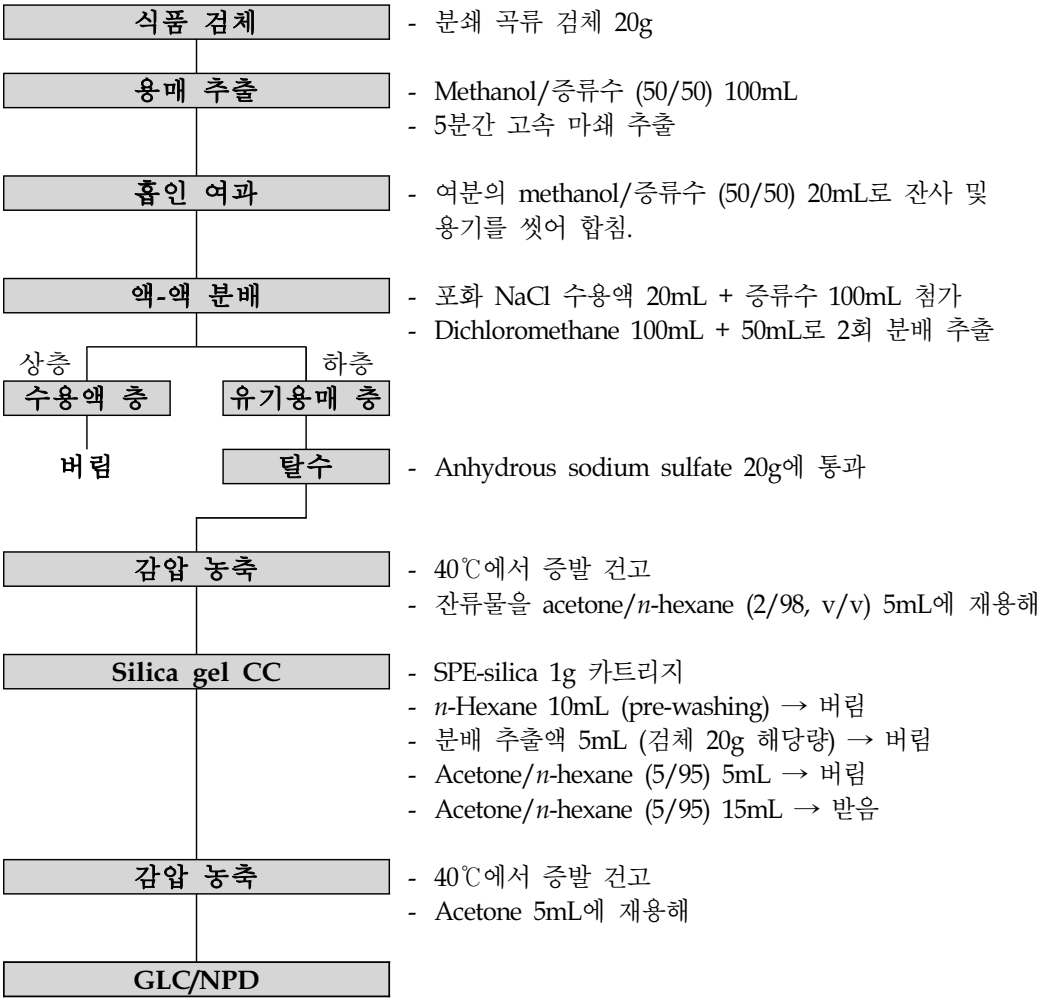
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Pyriftalid	0.0056	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

분쇄 검체에 methanol/증류수 혼합액 (50/50, v/v)을 가하여 고속 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액 및 증류수를 가하여 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 250℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 10.0 mL/min
주입량 : 2 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Pyriftalid는 식물의 필수 아미노산인 valine 및 isoleucine 등의 생합성에 관여하는 acetolacetate synthase (ALS)나 acetohydroxyacid synthase (AHAS)를 저해함으로써 고활성의 제초작용을 나타내는 선택성 제초제이다. 잡초 발아후 처리용 제초제로서 주로 벼 재배 시에 발생하는 다양한 잡초를 방제하기 위하여 단제 또는 합제의 한 성분으로 전면 살포 또는 토양처리로 사용된다. 잔류분의 정의는 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow} 2.6인 중간~비극성 범위내의 비해리성 화합물이며 어느 정도의 휘발성이 있고 분자 내에 2개의 질소 원자를 함유하고 있으므로 NPD 검출기가 부착된 GLC법으로 분석한다.

- 검체 조제과정은 중간 극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, methanol을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 methanol/물 혼합액을 사용, 습윤화 과정을 동시에 수행함으로써 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시킨다. 분배과정은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 간편한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 추출용매가 methanol/물 혼합액 (50/50)이므로 유지 등 비극성 불순물의 추출량이 그다지 많지 않다. 따라서

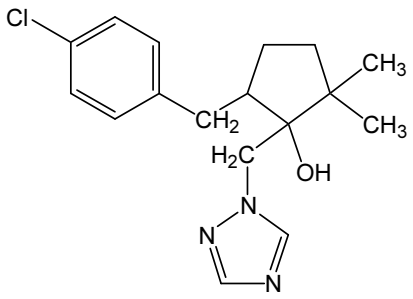
n-hexane- acetonitrile 분배과정 없이 silica gel 흡착크로마토그래피만으로도 충분한 정제가 가능하다.

- GLC 분석에서 pyriftalid는 휘발성이 비교적 낮아 높은 column 온도에서 분석하게 되며 대부분의 간섭물질은 pyriftalid 보다 짧은 머무름 시간에서 용출된다. Column efficiency는 다소 떨어지더라도 분석의 재현성을 높이기 위하여 내경 0.53 mm의 모세관 column에 검체 용액을 직접 주입하며 등온조건으로 분석한다. Pyriftalid는 분자량에 비하여 질소 원자 2개만을 함유하고 있으므로 NPD 감도는 그다지 높지 않아 최종용액이 검체량의 4배 농축액임에도 불구하고 정량한계는 0.05 mg/kg 수준이다.

8.4.67 잔류농약 분석법 4.1.4.97

메트코나졸(Metconazole)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metconazole
화학명 (IUPAC) : (1*RS*,5*RS*;1*RS*,5*SR*)-5-(4-chlorobenzyl)-2,2-dimethyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol
분자식 : $C_{17}H_{22}ClN_3O$
평균분자량 : 319.8
질량분석 시의 M+질량 : 319.2
Log P_{ow} : 3.85
물에 대한 용해도 : 30.4 mg/L (20℃)
증기압 : 2.1×10^{-5} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

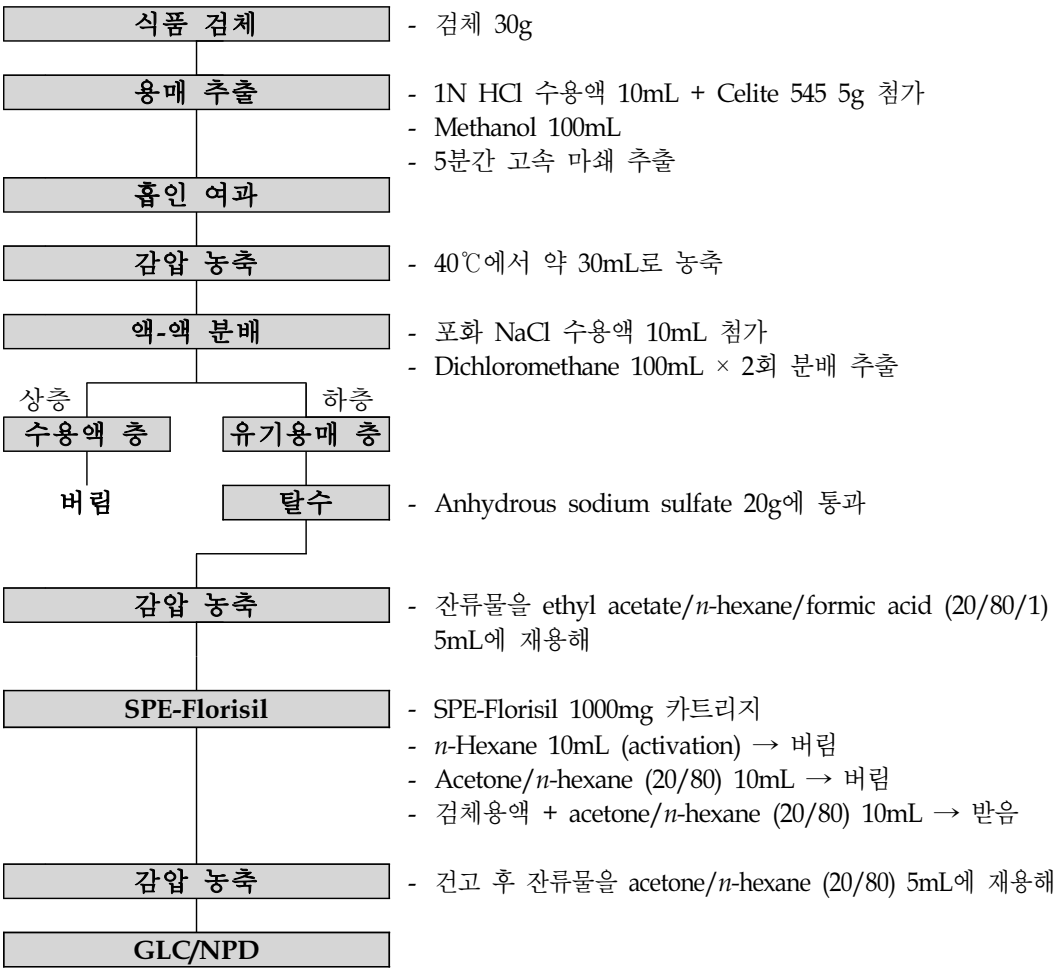
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metconazole	0.01	0.05	0.3~2.0	0.05~1.0	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 methanol을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을

감압 농축하여 methanol을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축한 후 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)

분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 245℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 4 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Metconazole은 전형적인 EBI계 살균제이다. 대상성분은 휘발성이 2.1×10^{-5} mPa로 낮음에도 불구하고 기기분석법으로는 GLC가 가능하다. 대상 농약성분은 cyclopentanol ring 내 1번과 5번 탄소가 키랄성이므로 diastereoisomer가 존재하여 물리적 특성이 상이하므로 고분리능 GLC에서는 2개의 peak로 나타난다. 분자구조 내에 3개의 질소원자를 함유하고 있으므로 검출기로는 NPD를 사용한다.

- 추출에는 비해리 화합물에 보편적으로 사용하는 acetone, acetonitrile 및 methanol 중 methanol을 사용한다. 대상화합물은 중간 극성이나 가장 극성이 큰 methanol을 사용하여도 우수한 추출 효율을 나타내며 함께 추출되는 비극성 간섭물질의 양이 acetone이나 acetonitrile에 비하여 적어 정제과정이 간편해지는 장점이 있다.

- 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. 즉, 추출액을 농축하여 methanol을 제거하고 포화 NaCl 수용액을 첨가하여 dichloromethane으로 분배하면 metconazole은 우수한 효율로 회수된다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이

높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하다.

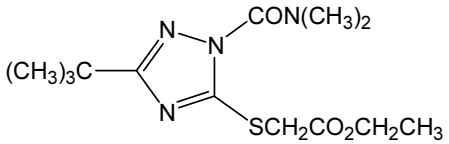
- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Metconazole은 분자 중에 3개의 질소 원자를 함유하고 있어 NPD에 대한 감도가 상당하고 머무름 시간이 긴 편이어서 간섭물질과의 겹침 가능성이 적기 때문에 SPE-Florisil을 사용하여 크로마토그래피 정제 과정을 간편하게 하더라도 선택성이나 분석 감도상의 큰 문제는 없다.

- 대상 화합물은 diasteroisomer 존재로 인하여 분리능이 높은 column에서는 인접한 2개의 peak로 나타나는데 이를 column 분리능의 평가 척도로 사용할 수 있다. 즉, 오염되지 않은 column에서의 분리능과 비교하여 10% 이상의 분리능 저하가 관찰될 경우 column을 교체하거나 선단의 일부를 절단한 후 다시 conditioning하는 시기로 판단할 수 있다.

8.4.68 잔류농약 분석법 4.1.4.98

트리아자메이트(Triazamate)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : triazamate
화학명 (IUPAC) : ethyl (3-*tert*-butyl-1-dimethylcarbamoyl-1*H*-1,2,4-triazol-5-ylthio)acetate
분자식 : $C_{13}H_{22}N_4O_3S$
평균분자량 : 314.4
질량분석 시의 M+질량 : 314.1
Log P_{ow} : 2.15 (pH 7, 25℃)
물에 대한 용해도 : 399 mg/L (pH 7, 25℃)
증기압 : 0.13 mPa (25℃)
pKa : -

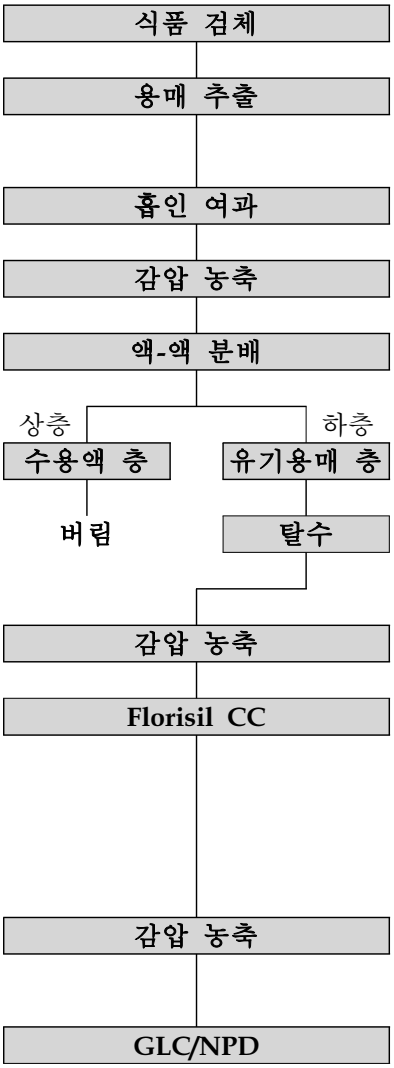
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Triazamate	0.0015	-	0.1	0.05	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용성 농축액에 다량의 NaCl 수용액을 첨가하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 또는 분쇄 검체 20g
- Acetone 100mL 첨가
- 5분간 고속 마쇄 추출
- Acetone 50mL로 잔류물을 씻어 합침
- 40℃이하에서 acetone 증발
- 증류수 500mL + 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 약 2mL로 농축
- SPE-Florisil 1g
- Dichloromethane 10mL (activation) → 버림
- 검체용액 2mL → 버림
- Acetonitrile/dichloromethane/*n*-hexane (1/60/40) 12mL → 받음
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m)

칼럼온도 : 220℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 5 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Triazamate는 다양한 채소 및 과실류 재배 중 발생하는 진딧물을 방제하기 위해서 주로 사용되는 살충제이다. *N,N*-dimethylcarbamate계 화합물로서 접촉/식독제로 작용하며 반침투성 (quasi-systemic)이 있는 약제이다. 작물 및 환경 중에서 가수분해 및 carbamoyl기 이탈반응이 신속하게 일어나는 편이며 독성 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Triazamate는 log P_{ow}가 2.15인 중간 극성의 화합물이고 증기압이 0.13 mPa (25℃)로 어느 정도 있으며 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 질소 원자를 4개 함유하고 있으므로 NPD를 사용하여 높은 감도로 분석할 수 있어 검체 추출액의 정제 과정을 간편하게 수행할 수 있다.

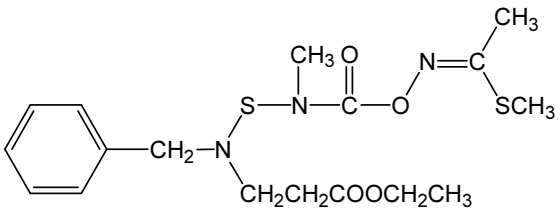
- 검체의 추출 및 분배는 일상적 중간 극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 농축하여 수용성 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가, dichloromethane으로 분배 추출한다. Triazamate는 중간 극성이므로 dichloromethane 층으로의 분배 효율을 높이기 위하여 추출액 중 acetone을 증발, 제거한다. 최종적으로 분배 추출액은 florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제하는데 세척 분획 없이 단일 용매로 용출하는 단순한 과정으로 구성되어 있다.

- Triazamate 분자 내에는 질소와 황 원자를 각각 4개 및 1개 함유하고 있으므로 GLC 분석 시의 검출기로는 NPD와 FPD가 가능하나 질소 원자의 수가 많으므로 NPD에서의 감도가 단연 우수하다. GLC에서 검체 분석은 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용하여 정량 분석의 재현성을 확보한다.

8.4.69 잔류농약 분석법 4.1.4.99

알라니카브(Alanycarb)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : alanycarb
화학명 (IUPAC) : ethyl (*Z*)-*N*-benzyl-*N*-[[methyl(1-methylthioethylideneamino-oxycarbonyl)amino]thio]-*β*-alaninate
분자식 : $C_{17}H_{25}N_3O_4S_2$
평균분자량 : 399.5
질량분석 시의 M+질량 : 399.1
Log P_{ow} : 3.57
물에 대한 용해도 : 27.7 mg/L (20℃)
증기압 : 〈4.7×10^{-3} mPa (20℃)
pKa : -

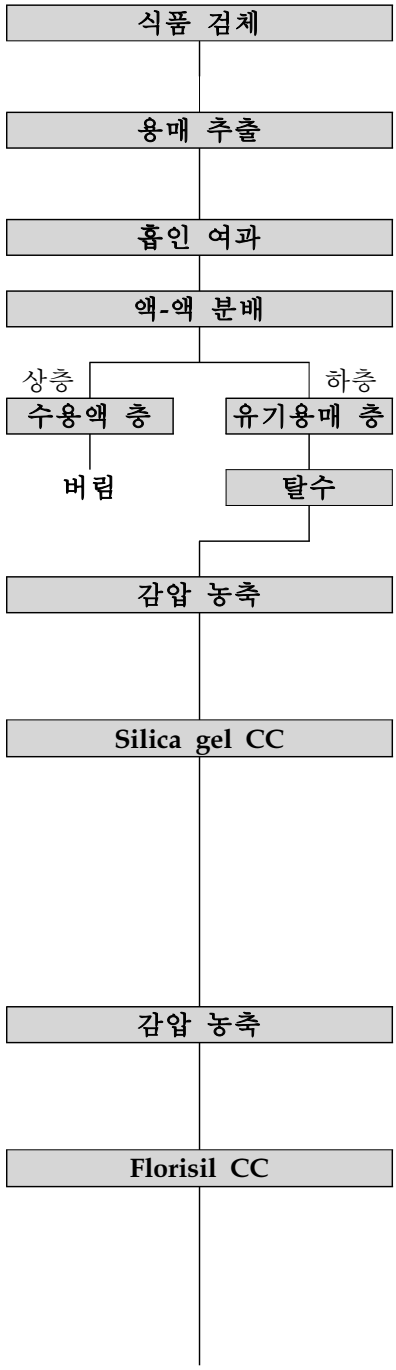
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Alanycarb	0.011	-	0.5	0.1	-	-	-

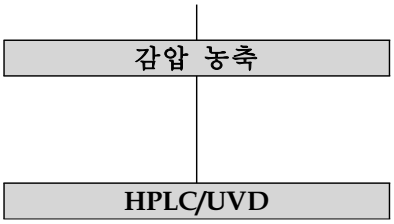
2) 분석법 개요

함수 농산물 검체에 인산완충용액을 가하여 약알칼리성으로 조절한 후 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인여과하고 다량의 NaCl 수용액을 첨가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 silica gel 및 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 순차적으로 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 50g + 1/15M phosphate buffer (pH 8.0) 50mL 첨가 후 균질화하여 50g (검체 25g 해당량)
- Acetone 100mL + 여과보조제 Celite 545 5g
- 3분간 고속 마쇄 추출
- Acetone 20mL로 잔류물을 씻어 합침
- 증류수 450mL + 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetone에 녹인 1% ethylene glycol 용액 0.1mL 첨가
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 dichloromethane 5mL에 재용해
- Silica gel 60 (5% 수분 함유) 5g (내경 10mm)
- n-Hexane 50mL로 습식 충전 → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Acetonitrile/dichloromethane/*n*-hexane (1.5/50/48.5) 100mL → 버림
- Acetonitrile/dichloromethane/*n*-hexane (5/50/45) 20mL → 받음
- Acetone에 녹인 1% ethylene glycol 용액 0.1mL 첨가
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 n-hexane 5mL에 재용해
- Florisil (activated) 5g (내경 10mm)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (50/50) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (80/20) 60mL → 받음



- Acetone에 녹인 1% ethylene glycol 용액 0.1mL 첨가
- 40℃이하에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물 (85/15, v/v)
이동상 유량 : 0.5 mL/min
검출기 파장 : UV 230 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Alanycarb는 methomyl의 취급 및 살포작업 시 강한 급성 독성으로 인한 위해성을 개선하기 위해 aminothio 유도체로서 개발된 살충제이다. Alanycarb의 쥐에 대한 경구 급성 독성 (LD_{50})은 440 mg/kg으로 methomyl의 30~34 mg/kg에 비하여 매우 낮아 안전하게 취급할 수 있는 약제이다. 따라서 methomyl과는 달리 안전하게 경엽살포용으로 광범위한 작물에 사용된다. 이러한 prosthetic pesticide (일명 propesticide)는 약제 살포 후에는 기존 농약성분이 방출되도록 분자 설계되어 있다. 즉, alanycarb는 살포 후 작물 및 환경 중에서 분해되어 methomyl을 방출한다. 본 분석법에서는 모화합물인 alanycarb만을 분석 대상으로 하며 methomyl 잔류분에 대해서는 4.1.3.15 분석법을 준용한다.

- Alanycarb는 각각 log P_{ow}가 3.57인 비극성의 비해리성 화합물이나 증기압이 〈4.7×10^{-3} mPa (20℃)로 휘발성이 낮고 분자 내에 oxime기를 함유하고 있어 열분해되므로 직접 GLC로 분석 하는 것이 어렵다. 따라서 기기분석에는 HPLC를 이용하며 분자 내에 UV 230 nm를 흡수하는 발색단을 함유하고 있으므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

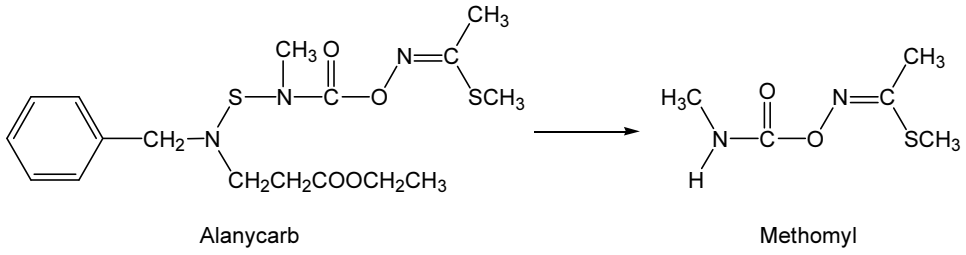


그림 1. Alanycarb 분해에 따른 methomyl 방출

- Alanycarb는 산 조건에서 쉽게 가수분해되어 불안정하고 중성 및 약알칼리성에는 비교적 안정하므로 검체 추출 전에 pH 8의 인산완충용액을 첨가, 검체 중 산성성분에 의한 분해를 방지한다. 검체의 추출 및 분배는 일상적 비극성~중간 극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 추출액의 조정제가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 농축과정 없이 추출액을 분액여두에 옮겨 다량의 NaCl 수용액을 첨가, dichloromethane으로 분배 추출한다.

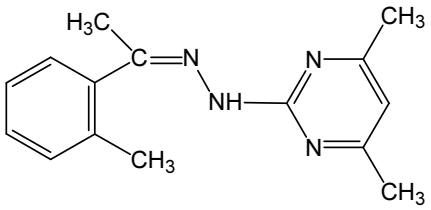
- 최종 정제는 silica gel 및 Florisil 흡착크로마토그래피를 순차적으로 적용한다. Alanycarb의 HPLC 분석 시 측정 파장은 230 nm로 비교적 짧으므로 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성이 높다. 따라서 2종의 흡착제를 세척/용출 분획으로 구분, 세밀하게 간섭물질을 제거한다. HPLC 상 머무름 시간도 가급적 길게 설정하여 간섭의 가능성을 최소화하는 것이 필요하다.

- 각 감압 농축과정에서 keeper solution으로 ethylene glycol을 첨가하는 것으로 제시되어 있는데 alanycarb의 휘발성이 낮으므로 대부분의 경우 이를 생략하여도 무방하다.

8.4.70 잔류농약 분석법 4.1.4.100

페림존(Ferimzone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : ferimzone
화학명 (IUPAC) : (*Z*)-2′-methylacetophenone 4,6-dimethylpyrimidin-2-ylhydrazone
분자식 : $C_{15}H_{18}N_4$
평균분자량 : 254.3
질량분석 시의 M+질량 : 254.2
Log P_{ow} : 2.89 (25℃)
물에 대한 용해도 : 162 mg/L (30℃)
증기압 : 4.11×10^{-3} mPa (20℃)
pKa : -

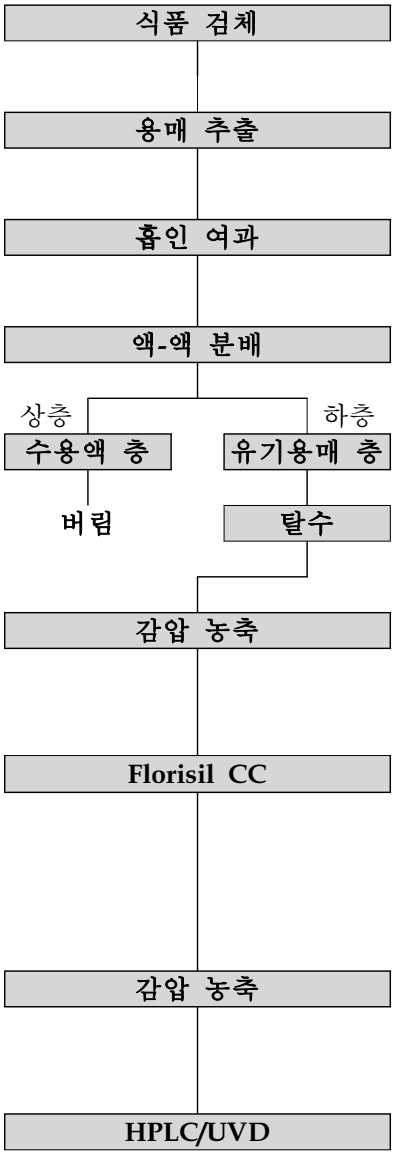
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Alanycarb	0.0064	0.7	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 methanol을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 NaCl 수용액을 첨가한 후 chloroform으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 및 분쇄 검체 20g
  곡류는 증류수 20mL 첨가 후 30분간 방치하여 습윤화
- Methanol 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제 사용
- Methanol 20mL로 잔류물을 씻어 합침
- 증류수 100mL + 포화 NaCl 수용액 20mL 첨가
- Chloroform 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- Acetone에 녹인 1% ethylene glycol 용액 0.1mL 첨가
- 35℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해
- Florisil (activated) 5g (내경 10mm)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 50mL → 받음
- Acetone에 녹인 1% ethylene glycol 용액 0.1mL 첨가
- 35℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)

분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/0.02% acetic acid 수용액 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 273 nm
주입량 : 20 µL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Ferimzone은 주로 벼 재배 시에 발생하는 도열병을 위시한 병해를 방제하는데 사용되는 살균제이다. 병원균의 호흡대사 중 산화적 인산화단계에서 탈공력제로 작용하며 침투성이 있는 지효성 약제이다. 잔류분 정의는 작물 및 환경 중 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 모화합물에 한정된다.

- Ferimzone 분자 내에는 C=N 이중결합에 따른 cis-trans isomerism에 따라 *E*- 및 *Z*-이성질체가 존재하는데 원제는 *Z*-이성질체이다. 그러나 *Z*-이성질체는 수분 존재 하에서 다음과 같이 *E*-이성질체와 상호 전환되면서 상존한다. 따라서 분석대상에 *E*- 및 *Z*-이성질체 모두를 포함하여야 한다.

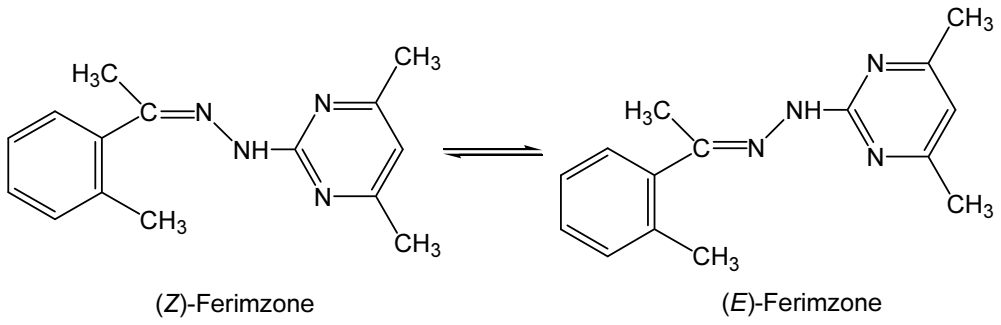


그림 1. Ferimzone의 *E,Z*-이성질체 간 상호전환

- Ferimzone은 log P_{ow}가 2.89인 비극성~중간 극성의 화합물이나 증기압이 4.11×10^{-3} mPa (20℃)로 휘발성이 낮고 분자 내에 열분해에 취약한 hydrozone기 등을 함유하고 있어 기기분석은 HPLC를 이용한다. 분자 내에 UV 270 nm 인근을 강하게 흡수하는 발색단을 함유하고 있으므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

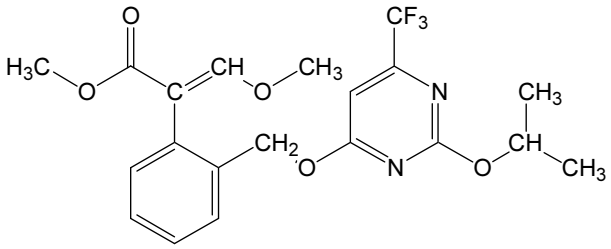
- 검체의 추출 및 분배는 일상적 중간 극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 methanol로 추출하고 추출액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가, chloroform으로 분배 추출한다. 최종적으로 분배 추출액은 Florisil 흡착크로마토그래피에 의하여 정제하는데 세척분획을 설정하여 충분한 간섭물질 제거가 이루어지도록 구성되어있다. 액-액 분배과정에서 위해성 chloroform 대신 dichloromethane을 사용하여도 무방하나 사용 전에 분배효율을 확인하여야 한다.

- Ferimzone의 HPLC 분석 시 측정 파장은 273 nm로 비교적 장파장이므로 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성은 적다. 그러나 HPLC 상 머무름 시간은 실용상 길게 설정하여 간섭의 가능성을 최소화하는 것이 필요하다. Ferimzone의 *E*- 및 *Z*-이성질체는 부분입체이성질체 (diastereoisomer)이므로 물리적 특성이 상이하여 서로 분리된다. 따라서 검체 중 잔류량은 두 peak 면적의 합을 기준으로 하여 산출한다.

8.4.71 잔류농약 분석법 4.1.4.101

플루아크리피림(Fluacrypyrim)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fluacrypyrim
화학명 (IUPAC) : methyl (*E*)-2-{α-[2-isopropoxy-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-yloxy]-*o*-tolyl}-3-methoxyacrylate
분자식 : $C_{20}H_{21}F_3N_2O_5$
평균분자량 : 426.4
질량분석 시의 M+질량 : 426.1
Log P_{ow} : 4.51 (pH 6.8, 25℃)
물에 대한 용해도 : 3.44×10^{-1} mg/L (pH 6.8, 20℃)
증기압 : 2.69×10^{-3} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

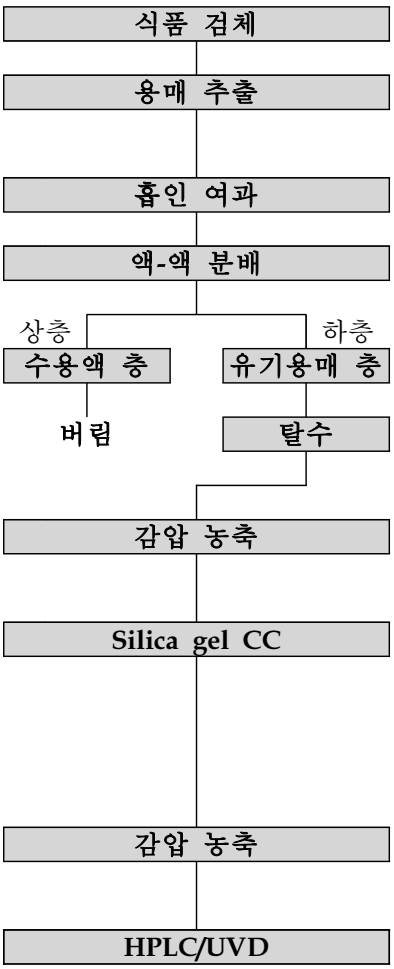
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fluacrypyrim	0.059	-	0.5~1.0	0.5~3.0	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 마쇄 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액 및 다량의 증류수를 가하여 희석한 후

dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 또는 세절 검체 30g
- Acetone 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetone 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 5mL에 재용해
- Silica gel (70~230mesh), 5g
- *n*-Hexane 60mL로 습식 충전 후 용출 → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 30g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 60mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 50mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)

분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)
이동상 : acetonitrile/0.05% acetic acid (55/45, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 246 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Fluacrypyrim은 과실 및 채소 재배 시에 발생하는 응애류를 방제하기 위하여 사용되는 살응애제이다. 작용기작은 호흡과정 중 미토콘드리아 전자전달계를 저해하는데 접촉 혹은 식독제로서 전면살포용으로 사용된다. 살응애제의 특성상 지효성이 있고 과실 및 채소류의 소비 형태가 주로 생식인 점을 감안할 때 수확물 중 잔류 수준의 평가가 중요하다. 잔류분의 정의는 모화합물로 한정된다.

- Fluacrypyrim은 log P_{ow} 4.5인 비극성의 비해리성 화합물이므로 유사한 특성의 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용하여 비교적 용이하게 분석할 수 있다. 즉, 검체 조제과정은 acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (**組精製**), 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

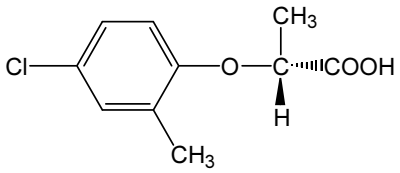
- 검체 추출용매는 대상성분의 비극성 정도가 크므로 acetonitrile 보다는 acetone을 사용한다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 간편한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 대상 검체가 비유지 작물인 과실 및 채소류로 한정되므로 n-hexane-acetonitrile 분배와 같은 유지 제거과정은 불필요하다. Silica gel 흡착크로마토그래피에서는 색소 등 검체 중 간섭물질에 의한 overloading을 최소화하기 위하여 충분한 양의 흡착제 (10 g)를 사용한다.

- 기기분석은 fluacrypyrim 분자 내 이중결합의 열에 대한 취약성을 감안, GLC 보다는 자외흡광검출기가 부착된 HPLC를 이용하는데, 검체에 따라 최종 용액 중에 일부 색소가 불순물로 포함되므로 fluacrypyrim의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화한다.

8.4.72 잔류농약 분석법 4.1.4.102

메코프로프-피(Mecoprop-P)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : mecoprop-P
화학명 (IUPAC) : (*R*)-2-(4-chloro-*o*-tolyloxy)propionic acid
분자식 : $C_{10}H_{11}ClO_3$
평균분자량 : 214.7
질량분석 시의 M+질량 : 214.0
Log P_{ow} : 1.43 (pH 5), 0.02 (pH 7), -0.18 (pH 9) (20℃)
물에 대한 용해도 : 860 mg/L (pH 7, 20℃)
증기압 : 0.23 mPa (20℃)
pKa : 3.68 (20℃)

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

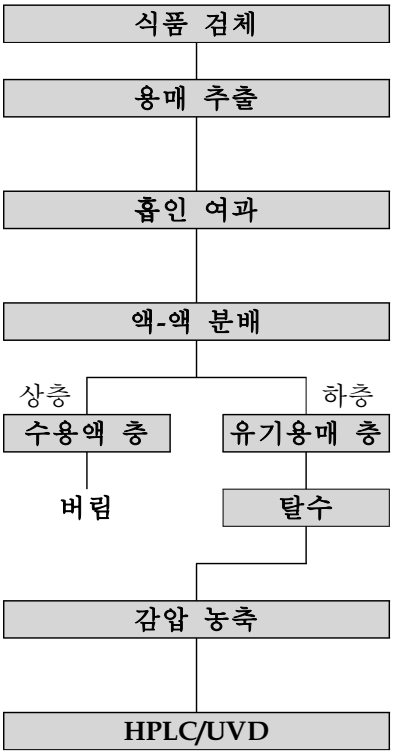
대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Mecoprop-P	0.01	0.01	-	-	-	-	-

* cRfd (US EPA, 2007).

2) 분석법 개요

세절 또는 분쇄 농산물 검체에 2% 초산이 함유된 methanol/증류수 (50/50) 혼합액을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 pH 1~2 범위가 되도록 산성화한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 methanol에 재용해하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 및 분쇄 검체 30g
- Methanol/증류수/초산 (49/49/2) 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제 사용
- Methanol/증류수/초산 (49/49/2) 20mL로 씻어 합침
- conc. HCl로 pH 1~2 범위로 조절
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 methanol 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : methanol/0.05M phosphoric acid (pH 2.5) 수용액 (20/80, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 229 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Mecoprop-P는 식물호르몬 auxin 활성을 나타내는 phenoxyalkanoic acid계 제초제이다. 선택성이 있는 침투성 약제로 주로 곡류 재배 시에 발생하는 광엽 잡초를 방제하는데 사용된다. Mecoprop-P는 mecoprop 분자 내 propionic acid 2번 탄소의 chiral성으로 인한 enantiomer 쌍 중 *R*-isomer만을 상업화한 것으로 mecoprop에 비하여 활성이 강하여 투하량을 경감시킬 수 있다는 장점이 있다. 잔류분 정의는 작물 및 환경 중 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 모화합물에 한정된다.

- Mecoprop-P는 분자 내에 carboxylic acid기를 함유하고 있는 pKa 3.68 (20℃)인 약산성 화합물이다. 따라서 GLC로 직접 분석하는 것은 매우 어려우므로 HPLC를 이용하여 분석한다. Mecoprop-P는 비록 단파장이기는 하나 UV 229 nm를 강하게 흡수하므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 검체의 추출은 대상 성분이 약산성 화합물이므로 이온억압을 위하여 2% 초산을 첨가하여 산성화하고 극성의 methanol/물 (1:1) 혼합액으로 마쇄, 추출한다. 추출액은 흡인 여과하는데 검체에 따라 여과속도가 상당히 느리므로 Celite 545 (Hyflo SuperCel) 등 여과보조제를 사용한다.

- 액-액 분배는 여과액을 산성화하여 dichloromethane으로 추출하는데 유기용매에 대한 가용성을 높여 분배효율을 확보하는 데에는 mecoprop의 이온억압이 필수적이다. Mecoprop-P의 pKa는 3.38이므로 pH를 2 이하로 조절하면 최소한 95% 이상 이온화가 억압된다.

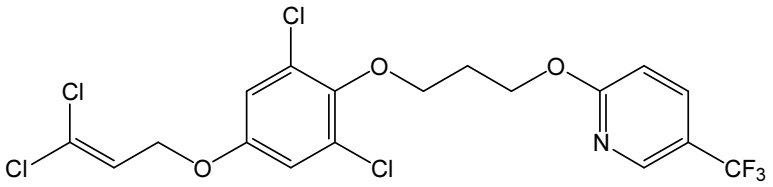
- Mecoprop-P의 HPLC 분석 시 측정 파장은 229 nm로 비교적 짧으므로 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성이 높다. 따라서 HPLC 상 머무름 시간을 가급적 길게 설정하여 간섭의 가능성을 최소화하는 것이 필요하다.

- 본 분석법에는 약이온성 화합물의 시료 정제 시에 간섭물질을 제거하기 위하여 효과적으로 사용되는 ion-associated partition이나 크로마토그래피법 등이 생략되어 있다. 따라서 검체 용액의 기기분석 시 간섭물질이 관찰되거나 불순물의 양이 과다할 경우에는 4.1.3.13의 phenoxyalkanoic acids, 4.1.3.24의 MCPB 및 triclopyr, 4.1.4.63의 haloxyfop, 4.1.4.69의 dichlorprop 분석법 등 유사한 약산성 농약의 정제과정을 참고하여 추가할 수 있다.

8.4.73 잔류농약 분석법 4.1.4.103

피리다릴(Pyridalyl)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : pyridalyl
화학명 (IUPAC) : 2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroallyloxy)phenyl 3-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]propylether
분자식 : $C_{18}H_{14}Cl_4F_3NO_3$
평균분자량 : 491.1
질량분석 시의 M+질량 : 489.0
Log P_{ow} : 8.1 (pH 7, 20℃)
물에 대한 용해도 : 1.5×10^{-4} mg/L (20℃)
증기압 : 6.24×10^{-5} mPa (20℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Pyridalyl	0.034	-	1.0~2.0	0.2~5.0	-	-	-

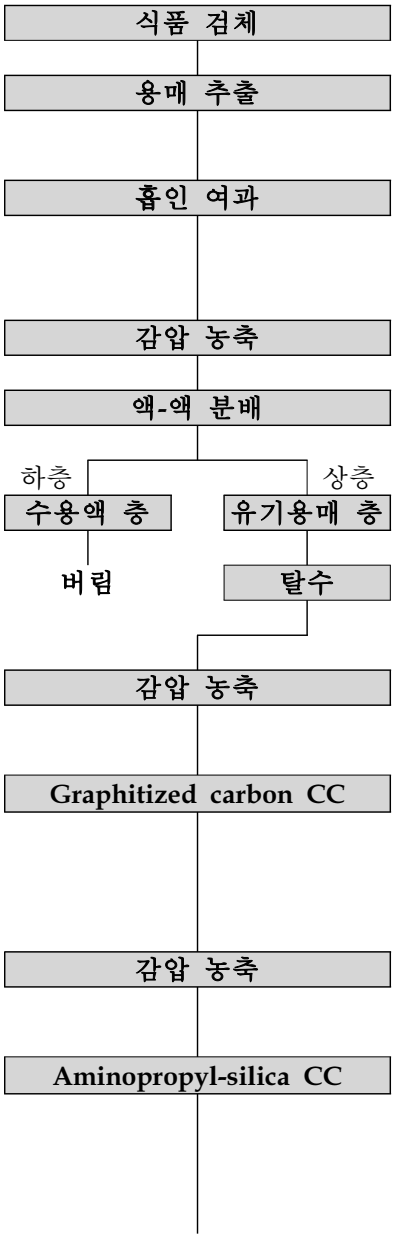
* cRfd (US EPA, 2008).

2) 분석법 개요

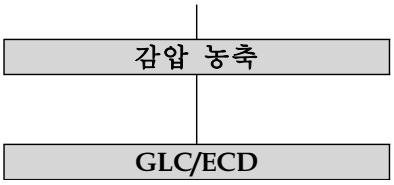
함수 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용성 농축액에 다량의 NaCl 수용액을 첨가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 고상추출용 (SPE) graphitized

carbon 및 aminopropyl cartridge를 이용한 크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 및 분쇄 검체 50g
- Acetone 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출
- Acetone 50mL로 잔류물을 씻어 합침
- Acetone을 가하여 여액의 총 부피를 200mL로 조절하고 이 중 100mL을 취함
- 40℃이하에서 약 15mL로 농축
- 10% NaCl 수용액 200mL 첨가
- *n*-Hexane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetone/toluene (80/20) 5mL에 재용해
- Graphitized carbon 250mg, SPE용 3mL tube 사용
- Acetone/toluene (80/20) 10mL로 습식 충전 → 버림
- 검체용액 5mL → 받음
- Acetone/toluene (80/20) 15mL → 받음
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해
- Aminopropyl-silica 360mg, SPE용 3mL tube 사용
- *n*-Hexane 10mL로 습식 충전 → 버림
- 검체용액 5mL → 받음
- *n*-Hexane 10mL → 받음



- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 15 m)
칼럼온도 : 250℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 4 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

6) 분석법 해설

- Pyridalyl은 다양한 채소 및 과실류 재배 중 발생하는 해충을 방제하기 위해서 사용되는 살충제이다. 해충의 미토콘드리아에서 일어나는 호흡과정의 저해제로서 접촉/식독제이다. 작물 및 환경 중에서 독성 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- Pyridalyl은 log P_{ow}가 8.1인 매우 비극성의 화합물이고 증기압은 6.24×10^{-5} mPa (20℃)로 낮으나 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 염소 및 불소 원자를 각각 4개 및 3개 함유하고 있으므로 ECD를 사용하여 높은 감도로 분석할 수 있다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 비극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 농축하여 수용성 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가, *n*-hexane으로 분배 추출한다. Pyridalyl은 매우 비극성이므로 *n*-hexane으로 전량 회수된다.

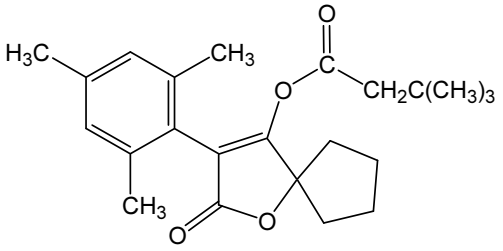
- 최종적으로 분배 추출액은 활성탄 및 aminopropyl-silica 크로마토그래피에 의하여 정제하는데 세척 분획 없이 단일 용매로 용출하는 단순한 과정으로 구성되어 있다. 활성탄은 고상추출법 (solid-phase extraction, SPE)에서 일반적으로 사용되는 graphitized carbon을 사용하는데, 제시한 분석법에서는 수용성 매질로부터 비극성물질을 역상 추출하는 용도가 아니라 색소 및 비극성 불순물을 제거할 목적으로 사용된다. Aminopropyl-silica는 silica 표면의 hydroxyl기를 aminopropylation하여 약음이온 크로마토그래피용으로 사용되는데 중성의 유기용매로 용출할 경우 검체 용액 중 약산성 간섭물질을 포집, 제거한다.

- Pyridalyl 분자 내에는 염소와 불소 원자를 각각 4개 및 3개 함유하고 있으므로 GLC 분석 시의 검출기로는 ECD가 최적이다. 감도가 매우 높게 나타나므로 적은 양의 검체를 공시하여도 정량한계 확보 상의 문제는 없다. 분리용 column은 비극성 liquid phase를 사용하여 비극성인 대상 화합물의 머무름 시간을 상대적으로 길게 나오도록 설정함으로써 간섭물질과의 분리 가능성을 최대화한다. 또한 화합물의 휘발성이 낮아 높은 column 온도조건에서 분석을 수행하여야 하므로 최고사용온도가 높은 liquid phase를 선택한다. GLC에서 검체 분석은 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용하여 정량 분석의 재현성을 확보한다.

8.4.74 잔류농약 분석법 4.1.4.104

스피로메시펜(Spiromesifen)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : spiromesifen
화학명 (IUPAC) : 3-mesityl-2-oxo-1-oxaspiro[4,4]non-3-en-4-yl 3,3-dimethylbutyrate
분자식 : $C_{23}H_{30}O_4$
평균분자량 : 370.5
질량분석 시 M+질량 : spiromesifen 370.2, spiromesifen-enol 272.1
Log P_{ow} : 4.55
물에 대한 용해도 : 0.13 mg/L (pH 4~9, 20℃)
증기압 : 7×10^{-3} mPa (20℃)
pKa : -

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Spiromesifen	0.03	-	0.2~2.0	0.2~3.0	-	-	-

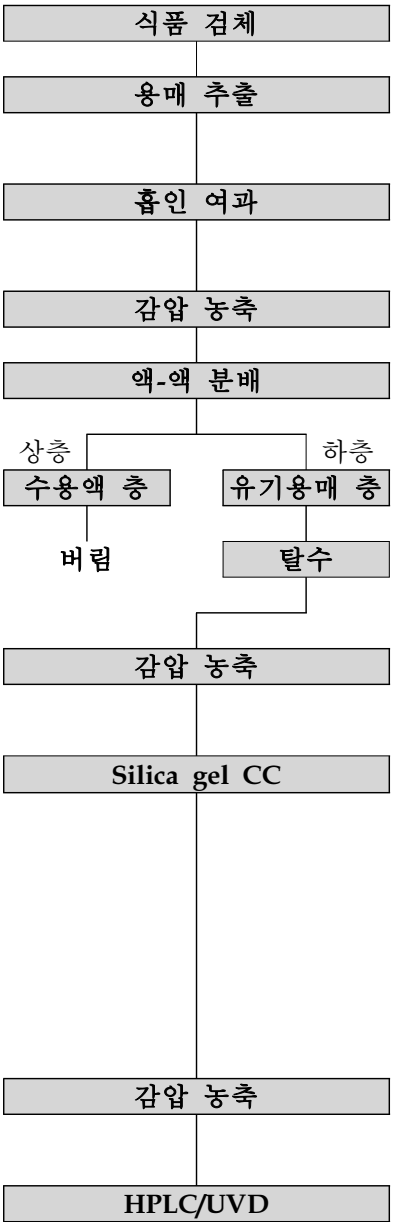
* EC (2007).

2) 분석법 개요

함수 농산물 검체에 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄, 모화합물 spiromesifen과 대사체 spiromesifen-enol를 동시에 추출한다. 추출물을 흡인여과하고 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보낸 후 수용성 농축액을 산성화하고 NaCl 수용액을 첨가하여 dichloromethane

으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 및 분쇄 검체 50g

- Acetonitrile 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출

- 여과보조제 사용
- Acetonitrile 50mL로 잔류물을 씻어 합침

- 40℃이하에서 acetonitrile 증발

- 증류수 50mL + 포화 NaCl 수용액 50mL + 2N HCl 수용액 2mL 첨가
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (1/99) 10mL에 재용해

- Silica gel 60 (70~230mesh) 5g (내경 10mm)
- *n*-Hexane 50mL로 습식 충전 → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (1/99) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 100mL → 받음
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 100mL → 받음
  2개 용출분액을 합침

- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (90/10) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/0.05% phosphoric acid 수용액 (80/20, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 230 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Spiromesifen은 다양한 채소 및 과실류 재배 중 발생하는 응애류 및 온실가루이 등 을 방제하기 위해서 사용되는 살응애/살충제로서 응애류에 대해서는 살란 효과도 나타낸다. 해충의 지질 생합성 저해제로서 비침투성의 접촉독제이다. 작물 및 환경 중에서 ester 기가 이탈, spiromesifen-enol을 주요 대사산물로 생성되므로 분석 대상성분은 모화합물과 함께 spiromesifen-enol이 포함된다.

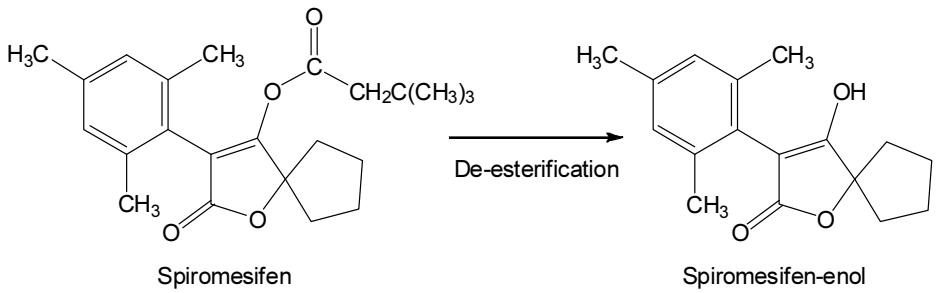


그림 1. 식물체 중 spiromesifen의 초기 대사반응

- Spiromesifen은 log P_{ow}가 4.55인 비극성의 화합물이고 증기압은 7×10^{-3} mPa (20℃)로 휘발성이 낮다. 주요 대사산물인 spiromesifen-enol은 자세한 물리화학적 특성이 알려져 있지 않으나 분자 내에 enol기의 존재에 따라 spiromesifen에 비하여 보다 극성이 크고 휘발성은 여전히 낮으며 열분해의 가능성이 예상되므로 GLC로 분석하기 힘들다. 따라서 두 성분을 동시에 분석하기 위해서는 HPLC로 분석하며 UV 230 nm를 강하게 흡수하므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 비극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하는데 spiromesifen-enol의 해리성을 고려, 다소 변개하여 수행한다. 즉, 함수 검체에 acetonitrile을 가하고 마쇄, 두 성분을 동시에 추출한다. Spiromesifen-enol은 비극성~ 중간 극성의 화합물이며 약간의 해리성은 있으나 acetonitrile에 의하여 충분한 효율로 추출된다. 추출액은 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 수용성 농축액을 분액여두에 옮겨 산성화한 후 NaCl 수용액을 첨가, dichloromethane으로 분배 추출한다. Spiromesifen은 약산 조건에서 안정하고 spiromesifen-enol은 hydroxyl기의 해리성이 억압되므로 dichloromethane 추출에 의하여 전량 회수된다.

- 최종적으로 분배 추출액은 silica gel 흡착크로마토그래피에 의하여 정제하는데 세척 및 용출 분획을 최적화하여 추출액의 정제도를 높인다. 즉, spiromesifen과 spiromesifen-enol이 용출되는 용매의 용출강도 차이가 크므로 각 성분에 대하여 세척 및 용출용매를 별도로 설정, 간섭물질을 최대한 제거한 후 각 성분의 용출분획을 합하여 동시에 분석한다.

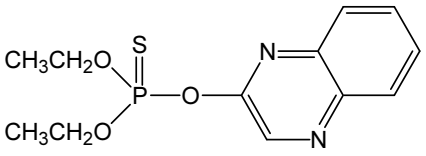
- HPLC 분석 시 spiromesifen-enol의 이온억압을 위하여 약산의 수용액을 함유한 이동상을 사용한다. 측정 파장이 230 nm로 비교적 짧으므로 검체 중 불순물에 의한 간섭의 가능성이 높다. 따라서 HPLC 상 머무름 시간을 가급적 길게 설정하여 간섭의 가능성을 최소화하는 것이 필요하다. 정량은 spiromesifen과 spiromesifen-enol을 개별적으로 정량하고 spiromesifen-enol의 잔류량을 다음 식에 의하여 spiromesifen 잔류량으로 환산, 총합을 spiromesifen 잔류량으로 표시한다.

  Spiromesifen 잔류량 (mg/kg) = spiromesifen-enol 잔류량 (mg/kg) × (spiromesifen 분자량 370.5) / (spiromesifen-enol 분자량 272.3)

8.4.75 잔류농약 분석법 4.1.4.105

퀴날포스(Quinalphos)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : quinalphos
화학명 (IUPAC) : *O,O*-diethyl *O*-quinoxalin-2-yl phosphorothioate
분자식 : $C_{12}H_{15}N_2O_3PS$
평균분자량 : 298.3
질량분석 시의 M+질량 : 298.1
Log P_{ow} : 4.44
물에 대한 용해도 : 17.8 mg/L
증기압 : 0.346 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

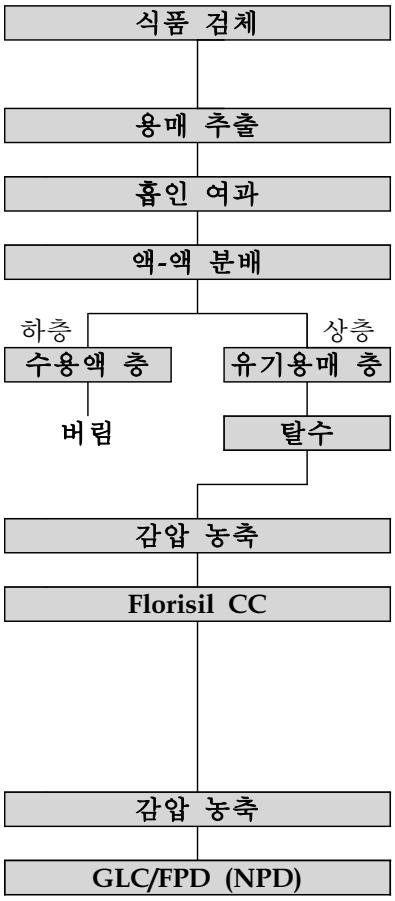
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Quinalphos	0.00011	0.01	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액와 물로 희석한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 건조검체의 경우 물 20mL를 가하여 10분간 습윤화
- Acetone 100mL로 2분간 고속 마쇄 추출
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 450mL첨가
- *n*-Hexane 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (2/98) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 인용 간섭필터, 파장 526 nm
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 180℃
주입부 온도 : 240℃
검출기 온도 : 240℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정

주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

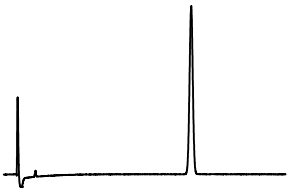


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램 (DB-5)
quinalphos (6.7분) 2 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 mm, 0.25 μm)
칼럼온도 : 200℃
주입부 온도 : 260℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1 mL/min
주입량 : 1 μL, split (1:10)
분자량 범위 : 100~350

표 1. GC-MS EI SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Quinalphos	9.2	298	298, 157, 146

6) 분석법 해설

- 분석 대상 농약인 quinalphos는 전형적인 유기인계 살충제로서 물에 대한 용해도가 낮고 log P_{ow} 값이 4.4인 비극성 화합물이므로 일반적 유기인계 농약의 잔류분석법의 원리를 적용할 수 있다.

- 추출 용매로는 비극성 농약에 있어 표준적 용매로서 널리 사용되고 있는 acetone 사용하여 대상농약을 추출한다. 액-액 분배는 acetone 추출액을 물로 희석하고 이온 강도를 증가시키기 위해서 NaCl를 첨가하여 *n*-hexane으로 분배한다 이 방법은 추출액을 농축하지 않아도 되므로 그 과정이 간편하며 비극성인 quinalphos는 1회 분배로도 확실한 효율로 회수된다.

- 흡착크로마토그래피법의 흡착제는 보편적인 Florisil을 사용한다. 용출체계에서 quinalphos 용출분획에는 거의 색소 등이 포함되지 않으며 정제 효과가 뚜렷하다.

- 대상 화합물의 분자구조 내에 인과 질소 원자를 함유하고 있으므로 GLC 분석 시에 검출기로는 FPD (P)와 NPD 모두가 사용가능하다. NPD에서의 감도가 FPD에 비하여 다소 높게 나타나나 검출기의 선택성 및 안정성을 고려할 때 FPD(P)를 채용하는 것이 더 유리하다. 검체 최종용액은 정제정도가 뛰어나며 FPD를 검출기로 하여 분석할 경우 매우 깨끗한 크로마토그램으로 관찰되고 검체 용액의 연속 주입이 가능하다.

표 2. 쌀 중 회수율 및 정량한계

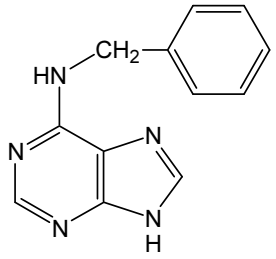
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Quinalphos	0.1	85.8±1.6	0.01
	1.0	85.8±3.4	

* 3반복 평균±표준편차

8.4.76 잔류농약 분석법 4.1.4.106

6-벤질 아미노퓨린(6-Benzyl aminopurine)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : 6-benzylaminopurine
화학명 (IUPAC) : 6-benzyladenine
분자식 : $C_{12}H_{11}N_5$
평균분자량 : 225.3
질량분석 시 M+질량 : 6-benzylaminopurine, 225.1,
6-benzylamino-*N*-methylpurine 239.1
Log P_{ow} : 2.19 (pH 7), 2.13 (pH 5) (20℃)
물에 대한 용해도 : 62.2 mg/L (20℃)
증기압 : 〈0.148 mPa (20℃)
pKa : 3.86, 9.89 (22℃)

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

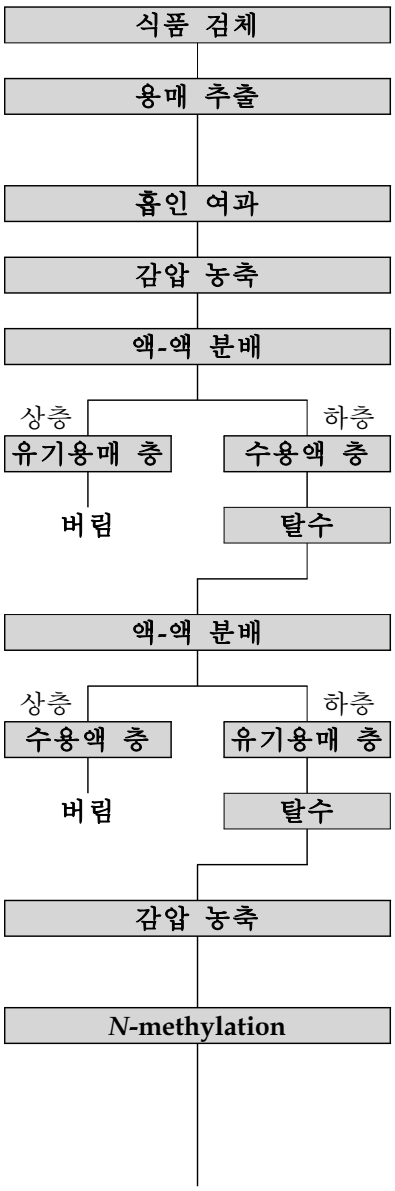
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
6-benzyl aminopurine	0.05	-	0.1~0.2	-	-	-	-

2) 분석법 개요

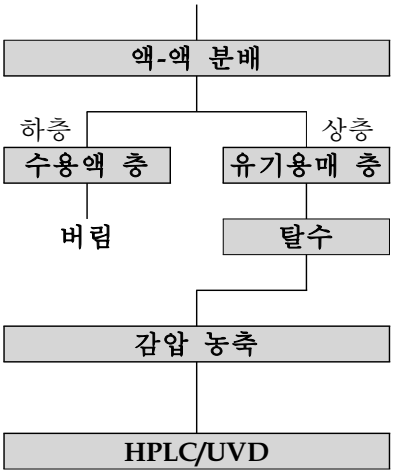
함수 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 흡인여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용성 농축액을 산성화하고 NaCl 수용액을 첨가하

여 *n*-hexane으로 분배 추출하여 버린다. 수용액의 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 *N*-methylation한 후 반응액을 ethyl acetate로 분배 추출하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 및 분쇄 검체 25g
- Acetone 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- Acetone 50mL로 잔류물을 씻어 합침
- 40℃이하에서 acetonitrile 증발
- 0.04N HCl 수용액 60mL + 포화 NaCl 수용액 5mL 첨가
- n-Hexane 50mL로 분배 추출
- 5N 및 1N NaOH 수용액을 첨가하여 pH 8.0±0.2로 조절
  수용액 2mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 benzene 2mL에 재용해
- CH_3I 2mL + dimethyl sulfoxide 2mL + NaH 0.2g 첨가
- 밀봉 후 30℃에서 20분간 방치
- 증류수 10mL를 점적 첨가하여 반응 종료
- 증류수 30mL로 씻어 분액여두에 옮김



- Ethyl acetate 30mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소・인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-608 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 230℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 15 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- 6-Benzylaminopurine은 식물호르몬인 cytokinin 활성을 나타내는 합성 cytokinin의 일종으로 과실 및 채소류의 세포분열 촉진, 화아형성 촉진, 비대촉진 등의 목적으로 사용되는 식물생장조절제이다. 작물 및 환경 중에서 독성 대사산물이 없으므로 잔류분 정의는 모화합물에 한정된다.

- 6-Benzylaminopurine은 log P_{ow}가 2.1~2.2 정도의 중간 극성이며 pKa가 3.86 및 9.89인

약염기성 화합물이다. 증기압은 〈0.148 mPa (20℃)로 명확하지 않다. 분자량이 비교적 작아 극성 column을 사용하여 직접 분석할 수도 있으나 열분해 및 흡착 등으로 재현성이 불량하다. 따라서 purine ring의 -NH기를 methylation하여 휘발성과 극성을 개선하여 GLC로 분석한다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 중간 극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하는데 대상 화합물의 해리성을 감안하여 ion-associated partition 과정을 삽입함으로써 추출액의 정제도를 높인다. 즉, 함수 검체에 acetone을 가하고 마쇄하여 추출한다. 6-Benzylaminopurine은 중간 극성의 화합물이며 약간의 해리성은 있으나 acetone에 의하여 충분한 효율로 추출되며 이는 다른 농약의 분석법에서도 일상적으로 보고되어 있다. 추출액은 농축하여 acetone을 날려 보내고 수용성 농축액을 분액여두에 옮겨 산성화한 후 NaCl 수용액을 첨가, *n*-hexane으로 분배 추출하여 버린다. 6-Benzylaminopurine은 약염기성 화합물이므로 산성조건에서는 해리, 수용성이 되므로 hexane 층으로 분배되지 않으며 이 과정에서 비극성 불순물의 대부분이 제거된다. 수용액의 산도를 약알칼리성으로 다시 조절하면 6-benzylaminopurine의 이온화가 억압, 유기용매 가용성이 되므로 dichloromethane으로 분배 추출하여 회수한다. 6-Benzylaminopurine 분자 내에는 해리하는 -NH기가 2개 있는데 짝산의 pKa가 3.86 및 9.89이다. 수용액의 산도를 pH 8로 조절하면 하나는 해리, 나머지는 비해리 상태가 되는데 가수분해 가능성을 고려할 때 2개 모두를 억압하기 위하여 강알칼리성으로 조절할 수는 없다. 6-Benzylaminopurine의 pH 5~7 범위에서의 log P_{ow}가 2.1~2.2인 점을 감안할 때, pH 8로 조절하면 dichloromethane으로도 전량 회수할 수 있다.

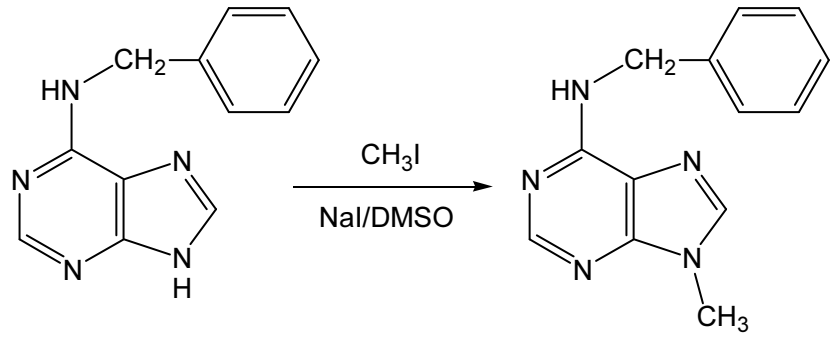


그림 1. 6-Benzylaminopurine의 methylation 반응

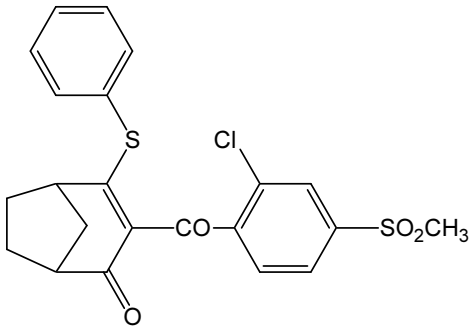
- 6-Benzylaminopurine의 유도체 생성 반응은 전형적인 친핵성 치환반응이다. 즉, purine ring의 질소 원자에 결합된 수소는 약한 해리성을 나타내나 강염기인 NaH을 첨가하면 산-염기 반응에 의하여 쉽게 proton으로 이탈된다. 생성된 음이온은 강한 nucleophile이므로 methyl iodide를 공격, 친핵성 치환반응이 용이하게 일어나게 된다. 반응용매는 친핵성 치환반응에서 많이 사용하는 극성의 aprotic solvent로서 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용한다.

- 6-Benzylaminopurine은 분자 내에 질소 원자를 5개 함유하고 있으므로 GLC 분석 시의 검출기로는 NPD가 최적이다. 감도가 매우 높게 나타나므로 적은 양의 검체를 공시하여도 정량한계 확보 상의 문제는 없다. 유도체를 형성하여도 분석 성분은 중간 극성이며 하나의 -NH기를 함유하고 있으므로 분리용 column은 중간 극성~극성 liquid phase를 사용하는 것이 peak의 tailing 및 항상성 측면에서 유리하다. GLC에서 검체 분석은 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용하여 정량 분석의 재현성을 확보한다.

8.4.77 잔류농약 분석법 4.1.4.107

벤조비싸이클론(Benzobicyclon)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : benzobicyclon
화학명 (IUPAC) : 3-(2-chloro-4-mesylbenzoyl)-2-phenylthiobicyclo[3.2.1.]oct-2-en-4-one
분자식 : $C_{22}H_{19}ClO_4S_2$
평균분자량 : 447.0
질량분석 시의 M+질량 : 446.0
Log P_{ow} : 3.1
물에 대한 용해도 : 0.052 mg/L
증기압 : $<5.6\times10^{-2}$ mPa (20℃)
pKa : 비해리성

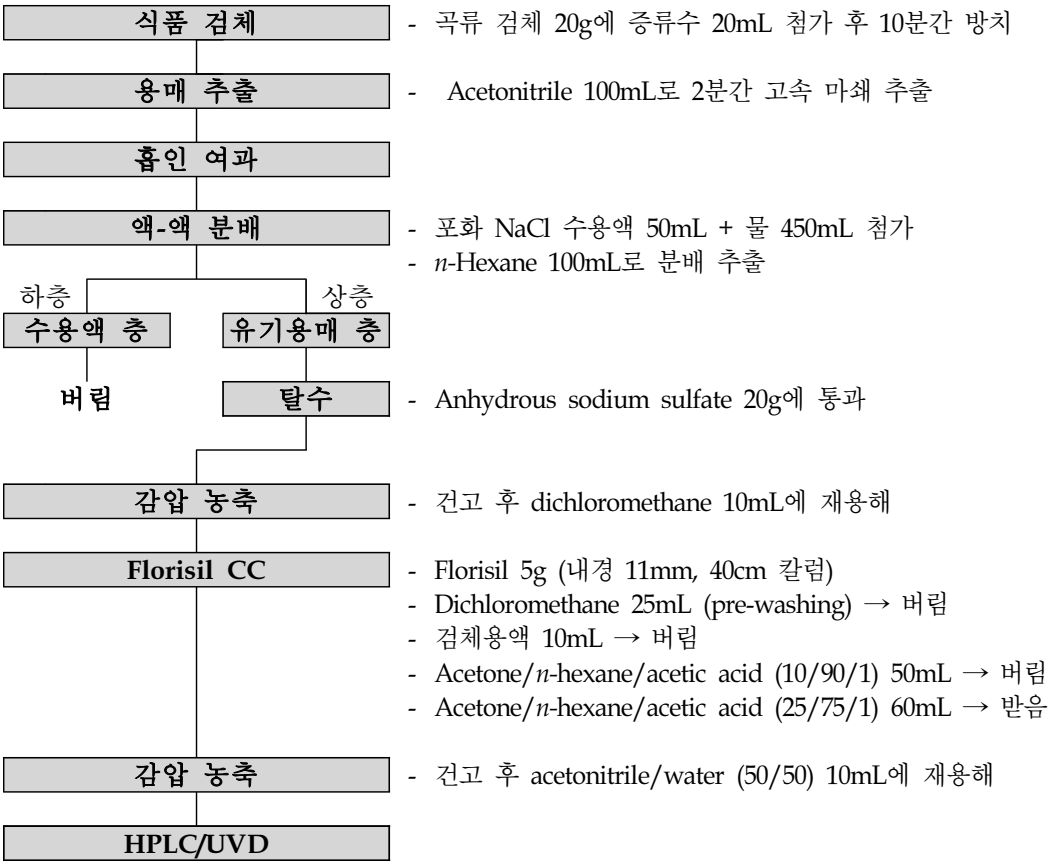
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Benzobicyclon	-	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 세절 검체에 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물을 가하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 농축하고 Florisil column chromatography로 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)

검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : UV 324 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS

6) 분석법 해설

- Benzobicyclon은 수도에서 주로 사용되는 선택성 제초제로서 중간 극성의 화합물이다. 중성의 화합물이나 휘발성은 낮아 GLC로 분석하기는 힘들다. Benzobicyclon은 장파장인 324 nm를 강하게 흡수하는 등 흡광특성이 우수하므로 HPLC/UVD로 분석이 용이하다.

- 추출 및 분배법은 중간~비극성 농약 잔류분석법에서 일상적으로 사용되는 분배 및 정제방법을 사용하여 비교적 용이하게 분석용 검체를 조제할 수 있다. 즉, 추출에는 검체를 습윤화한 후 acetonitrile를 사용한다. 추출액에 포화식염수/물을 다량 첨가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 이 방법은 추출액의 농축과정을 생략할 수 있어 간편하며 benzobicyclon은 우수한 효율로 회수된다.

- 본 분석법에서는 제시하지 않았으나 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄일 필요가 있다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이다. 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용하되 SPE가 아닌 5 g을 일반 유리제 column (내경 11 mm)에 충전하여 사용한다. 이는 현미 등 곡류 검체에 유지성분이 2~4% 가량 함유되어 있으므로 충분한 흡착제를 사용, 유지 성분을 가급적 많이 제거하기 위한 것이다. 또한

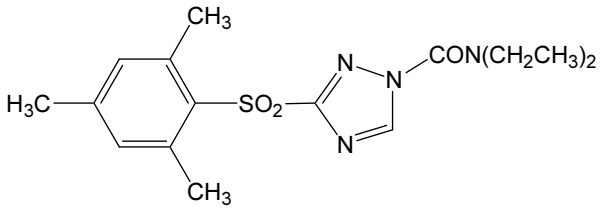
Florisil의 활성화 과정을 정확히 수행할 경우 그 재현성이 SPE에 비하여 우수하다. 용출용매는 acetone/*n*-hexane/acetic acid 혼합액을 사용하는데 이는 대사산물을 함께 분석할 경우에 사용되는 용출체계로서 acetone의 함량을 조절할 경우 acetic acid를 사용하지 않아도 무방하다.

- Benzobicyclon은 324 nm의 장파장을 흡수하므로 기기분석의 선택성이 우수하다. 또한 흡광계수도 높아 UVD 상 LOQ가 2 ng 정도이므로 비교적 용이하게 분석할 수 있는 화합물이다.

8.4.78 잔류농약 분석법 4.1.4.108

카펜스트롤(Cafenstrole)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : cafenstrole
화학명 (IUPAC) : *N,N*-diethyl-3-mesitylsulfonyl-1*H*-1,2,4-triazole-1-carboxamide
분자식 : $C_{16}H_{22}N_4O_3S$
평균분자량 : 350.4
질량분석 시의 M+질량 : 350.1
Log P_{ow} : 3.21
물에 대한 용해도 : 2.5 mg/L (20℃)
증기압 : 5.3×10^{-5} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

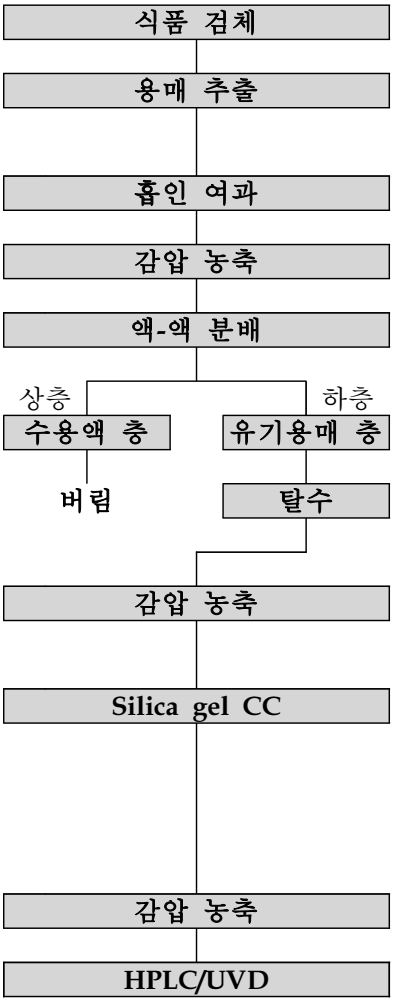
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cafenstrole	0.003	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

분쇄 검체에 acetonitrile/증류수 혼합액 (80/20, v/v)을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 곡류 검체 20g
- Acetonitrile/증류수 (80/20) 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetonitrile 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 40℃에서 acetonitrile을 날려 보냄.
- 5% NaCl 수용액 200mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 10mL에 재용해
- Silica gel (70~230mesh), 6g (내경 15 mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 20g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 70mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile 2mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)

이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 242 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Cafenstrole은 잡초 발아 후 처리제로서 벼농사 본답 초기에 주로 사용하는 세포분열 저해기작의 제초제이다. 잔류분의 정의는 생체 및 환경 중에서 독성 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다. Cafenstrole은 비극성의 비해리성 화합물이나 휘발성이 낮고 분자 내에 GLC 분석에 불리한 amide, sulfonyltriazole기 등을 함유하고 있어 HPLC로 분석한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetonitrile을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

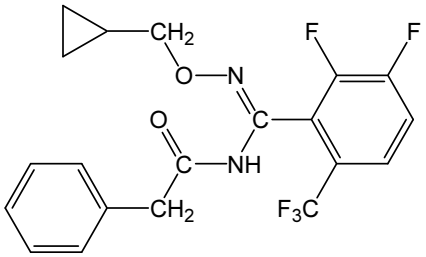
- 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 acetonitrile/물 혼합액을 사용, 습윤화 과정을 동시에 수행함으로써 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시킨다. 분배과정은 검체 농축액을 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 2회 분배하는데 대상성분의 95% 이상이 회수된다. 추출용매가 acetonitrile/물 혼합액 (80/20)이므로 유지 등 비극성 불순물의 추출량이 acetone에 비하여 상대적으로 적어 silica gel 흡착크로마토그래피만으로도 충분한 정제가 가능하다. 그러나 유지 등의 비극성 불순물에 의한 간섭이 관찰될 경우에는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. 즉, dichloromethane 분배 추출액을 증발, 건고한 후 잔류물을 30 mL의 *n*-hexane (미리 acetonitrile로 포화시킴.)에 재용해하고 분액여두에 옮겨 *n*-hexane으로 미리 포화시킨 acetonitrile 30 mL 씩으로 2회 분배 추출한다. 대상성분의 분배 효율은 90% 이상이며 유지 등 비극성 불순물의 제거효율은 60% 이상이다.

- HPLC 분석 시에 cafenstrole의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화한다. 최종용액은 100% acetonitrile이 아닌 이동상 acetonitrile/물 (70/30, v/v)에 재용해 것이 대상성분의 peak sharpness를 위하여 유리하나, 장기간 보존이 어려우므로 가급적 빠른 시간 내에 분석한다.

8.4.79 잔류농약 분석법 4.1.4.109

사이플루페나미드(Cyflufenamid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : cyflufenamid
화학명 (IUPAC) : (*Z*)-*N*-[α-(cyclopropylmethoxyimino)-2,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)benzyl]-2-phenylacetamide
분자식 : $C_{20}H_{17}F_5N_2O_2$
평균분자량 : 412.4
질량분석 시의 M+질량 : 412.1
Log P_{ow} : 4.70
물에 대한 용해도 : 0.52 mg/L
증기압 : 3.54×10^{-2} mPa (20℃)
pKa : 12.08

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

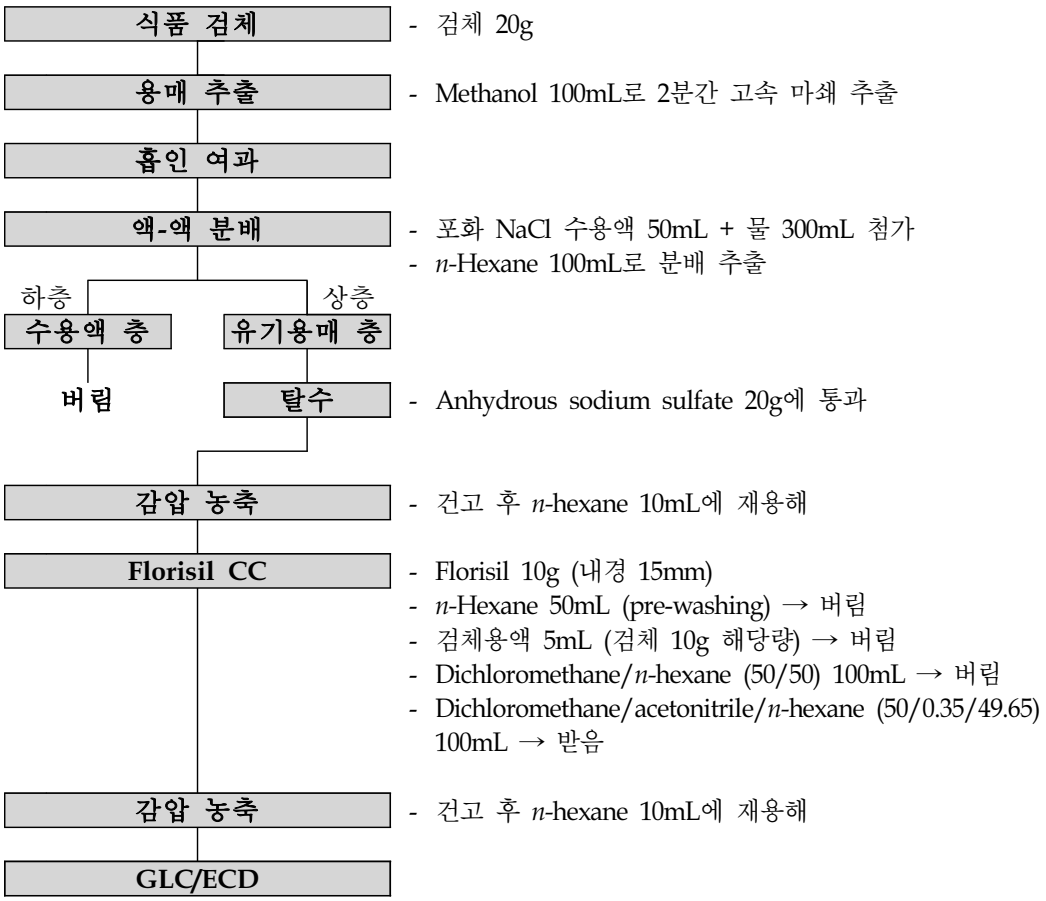
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cyflufenamid	0.041	-	0.05~0.5	0.2~0.5	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 농산물 검체에 methanol을 가하고 고속 마쇄, 추출한 후 흡인 여과한다.

Methanol 추출액을 분액여두에 옮겨 포화식염수/물로 희석하고 *n*-hexane으로 분배 추출한다. *n*-Hexane 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)

칼럼온도 : 205℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.01 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Cyflufenamid는 과실 및 채소류에서 병해 방제를 위하여 주로 보호용으로 사용되는 살균제이다. 잔류허용기준은 0.05~0.5 mg/kg 이므로 정량한계는 최소 0.02 mg/kg 이하이어야 한다.

- Cyflufenamid는 pKa가 12로 알려져 있는 바와 같이 거의 해리하지 않는 비극성 화합물이다. 증기압이 0.035 mPa으로 상당하며 열에 대한 안정성이 있어 GLC 상에서 비교적 용이하게 분석할 수 있는 화합물이다. 분자 내에 5개의 불소 원자를 함유하고 있고 conjugated system도 포함하고 있어 검출기 ECD에 대한 감도가 매우 높게 관찰되므로 최소한의 검체 정제 과정으로도 높은 감도로 분석이 가능하다.

- Cyflufenamid는 log P_{ow}가 4.7로 알려진 비극성 화합물이므로 추출 및 분배법은 중간~비극성 농약 잔류분석법에서 일상적으로 사용되는 방법을 그대로 사용할 수 있다. 즉, 추출에는 검체를 습윤화한 후 methanol을 사용한다. 추출액에 포화식염수/물을 다량 첨가한 후 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 이 방법은 추출액의 농축과정을 생략할 수 있어 간편하며 cyflufenamid는 1회 분배로도 우수한 효율로 회수된다.

- 흡착 chromatography에서 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용하되 SPE가 아니라 활성화한 Florisil 10 g을 일반 유리제 column (내경 15 mm)에 충전하여 사용한다. 이는 검체 중 간섭 성분을 충분한 양의 흡착제를 사용, 가급적 많이 제거하기 위한 것이며 곡류 등 일부 유지 검체에 대해서도 *n*-hexane- acetonitrile 분배과정을 생략하는 것이 가능하기 때문이다. 또한 Florisil의

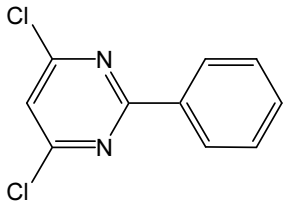
활성화 과정을 정확히 수행할 경우 그 재현성이 SPE에 비하여 우수하다. 세정 및 용출용매는 국제적으로도 표준적인 dichloromethane/acetonitrile/*n*-hexane 혼합액을 사용하는데 각각의 비율이 50/0.35/49.65인 용출 분획에서는 색소가 거의 용출되지 않으므로 매우 확실한 정제 효과를 얻을 수 있다.

- Cyflufenamid는 ECD에 대한 감도가 극히 우수하여 LOQ는 0.01 ng 혹은 그 이하 수준이다. 따라서 잔류허용기준에 합당한 분석 감도를 얻는 것이 매우 용이하다. 간섭물질이 많은 검체에 대해서는 추출액 중 일부만을 취함으로써 검체 조제과정을 최소화하면서도 분석목적에 부합하는 감도를 용이하게 달성할 수 있다.

8.4.80 잔류농약 분석법 4.1.4.110

펜클로림(Fenclorim)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fenclorim
화학명 (IUPAC) : 4,6-dichloro-2-phenylpyrimidine
분자식 : $C_{10}H_6Cl_2N_2$
평균분자량 : 225.1
질량분석 시의 M+질량 : 224.0
Log P_{ow} : 4.17
물에 대한 용해도 : 2.5 mg/L (20℃)
증기압 : 12 mPa (20℃)
pKa : -

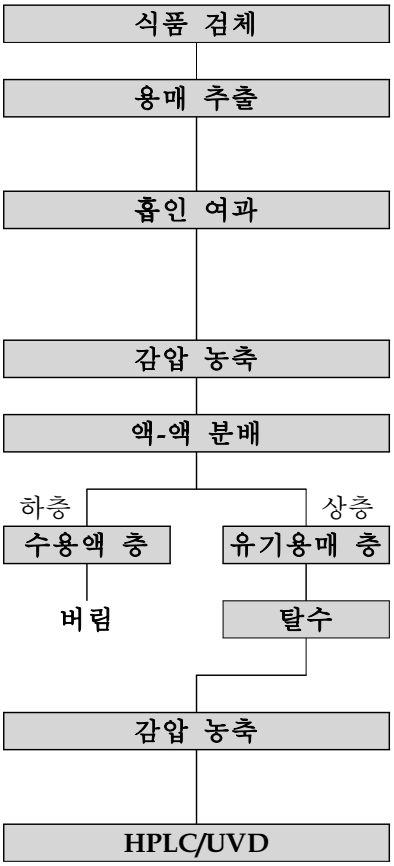
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fenclorim	0.075	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 농산물 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄, 추출한다. 추출물을 흡인여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 수용성 농축액에 다량의 NaCl 수용액을 첨가하여 *n*-hexane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수한 후 감압 농축, 건고하고 잔류물을 n-hexane에 재용해하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 곡류 검체 10g에 증류수 20mL를 첨가하여 10분간 방치
- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- Acetone/증류수 (80/20) 50mL로 잔류물을 씻어 합침
- Acetone을 가하여 여액의 총 부피를 200mL로 조절하고 이 중 100mL을 취함
- 40℃이하에서 약 20mL로 농축
- 증류수 100mL + 포화 NaCl 수용액 30mL 첨가
- n-Hexane 50mL × 3회 분배 추출
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 2mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : HP-1 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 2.5 μm)
칼럼온도 : 220℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 260℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 15 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정

주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Fenclorim은 주로 벼 재배 시에 사용되는 제초제 pretilachlor의 약해를 경감시킬 목적으로 사용되는 제초제 약해경감제 (herbicide safener)이다. 경감 작용은 벼 체내로 침투한 pretilachlor를 무독화시키는 glutathion conjugation 작용을 강화시키는 것으로 알려져 있다. 잔류분 정의는 작물 및 환경 중에서 독성 대사산물이 없으므로 모화합물에 한정된다.

- Fenclorim은 log P_{ow}가 4.7인 비극성의 비해리성 화합물이고 증기압은 12 mPa (20℃)로 휘발성이 있으며 열분해에 대하여 비교적 안정하므로 GLC로 충분히 분석이 가능하다. 검출기로는 분자 내에 염소 및 질소 원자를 각각 2개씩 함유하고 있으므로 NPD나 ECD를 사용하는 것이 가능하다.

- 검체의 추출 및 분배는 일상적 비극성 농약의 잔류분석 과정을 준용하며 충분한 회수율과 간섭물질의 제거가 이루어진다. 즉, 검체를 acetone으로 추출하고 농축하여 수용성 농축액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가, *n*-hexane으로 분배 추출한다. Fenclorim은 비극성이므로 *n*-hexane으로 전량 회수된다.

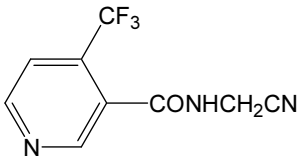
- Fenclorim 분자 내에는 염소와 질소 원자를 각각 2개씩 함유하고 있으므로 GLC 분석 시의 검출기로는 NPD와 ECD가 가능한데 감도 및 안정성 측면에서는 ECD, 선택성 측면에서는 NPD가 유리하다. 제시한 검체 조제과정이 간략하여 불순물에 의한 간섭 가능성이 있으므로 선택성을 우선하여 NPD를 사용한다. 분리용 column은 비극성 liquid phase를 사용하여 비극성인 대상 화합물의 머무름 시간을 상대적으로 길게 나오도록 설정함으로써 간섭물질과의 분리 가능성을 최대화한다. 또한 GLC에서 검체 분석은 내경 0.53 mm의 capillary column을 packed inlet에 장착, 검체용액 전량을 주입하는 직접주입법을 사용하여 정량 분석의 재현성을 확보한다.

- 본 분석법에는 곡류 검체 정제 시에 유지 등 비극성 간섭물질을 제거하기 위하여 효과적으로 사용되는 *n*-hexane-acetonitrile partition법, 그리고 최종 정제과정으로 사용하는 흡착크로마토그래피법 등이 생략되어 있다. 따라서 검체 용액의 기기분석 시 간섭물질이 관찰되거나 불순물의 양이 과다할 경우에는 다른 비극성 농약의 경우를 참조하여 추가 정제과정을 수행하여야 한다.

8.4.81 잔류농약 분석법 4.1.4.111

플로니카미드(Flonicamid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : flonicamid
화학명 (IUPAC) : *N*-cyanomethyl-4-(trifluoromethyl)nicotinamide
분자식 : $C_9H_6F_3N_3O$
평균분자량 : 229.2
질량분석 시의 M+질량 : 229.1
Log P_{ow} : 0.3
물에 대한 용해도 : 5200 mg/L (20℃)
증기압 : 9.43×10^{-4} mPa (20℃)
pKa : 11.6

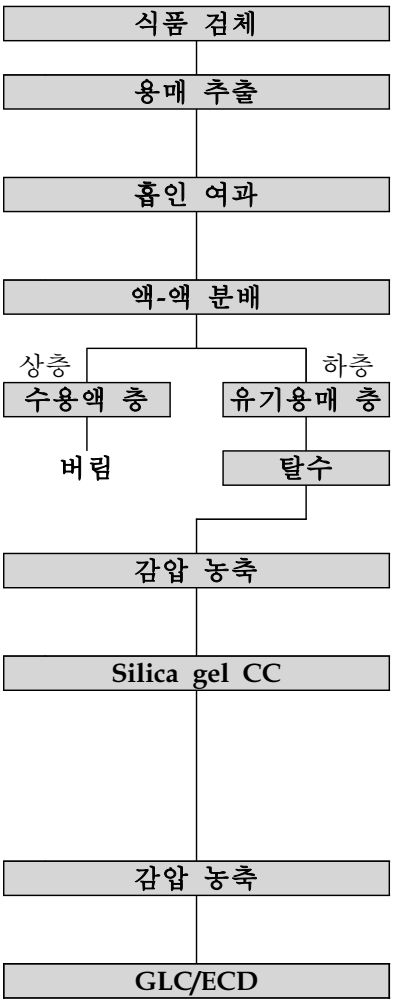
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Flonicamid	0.036	-	0.3~2.0	0.5~2.0	-	-	0.3

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetonitrile을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축하고 추출물을 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 20g
- Acetonitrile 70mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 acetonitrile 30mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 70mL × 3회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해
- Silica gel (70~230mesh), 5g (내경 15 mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 30mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 20g 해당량) → 버림
- Acetone/*n*-hexane (30/70) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (50/50) 50mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetone/*n*-hexane (20/80) 2mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : HP-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 10 m, 2.5 μm)
칼럼온도 : 180℃
주입부 온도 : 280℃

검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접 주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Flonicamid는 pymetrozine과 유사하게 해충에 대하여 feeding blocker로서 작용, 먹이 섭취를 중단시켜 치사에 이르게 하는 살충기작을 나타내는 침투성 살충제이다. 주로 채소, 과실 및 서류 재배 시에 발생하는 진딧물을 방제하기 위하여 전면 살포용으로 사용된다. 생체 및 환경 중에서 이행성이 있으나 잔류기간은 비교적 짧으며 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 모화합물에 한정된다.

- Flonicamid는 log P_{ow}가 0.3인 극성 화합물이므로 GLC 보다는 HPLC가 분석에 유리하나 자외 영역의 흡광도가 약하고 형광성이나 산화/환원 특성이 없으므로 적절한 검출기가 없다. 따라서 휘발성이 어느 정도 있고 분자 내에 fluorine 원자를 3개 함유하고 있다는 점에 착안하여 GLC/ECD로 분석한다.

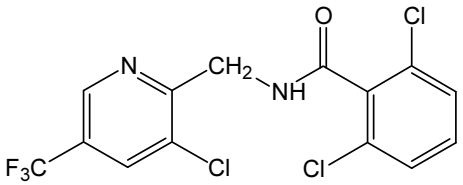
- 검체 추출은 acetonitrile을 이용하여 직접 추출한다. 대상 검체는 과실, 채소 및 서류 등 함수검체이므로 건조 곡류검체의 경우에서와 같은 습윤화 과정은 불필요하다. 추출용매는 대상 화합물의 극성이 높으므로 acetone 보다는 acetonitrile이 유리하다. 추출물을 흡인 여과할 때 여과보조제를 사용하지 않아도 실용적으로 충분한 여과 속도를 나타낸다. 분배는 추출액을 농축하지 않고 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 후 직접 dichloromethane으로 3회 분배 추출하는 간편한 과정으로 수행하며 분배 효율은 95% 이상으로 우수하다. Flonicamid는 *n*-hexane에 대한 용해도가 낮으므로 분배 추출액의 건고물을 재용해할 때 충분한 교반에 의하여 여러 차례 녹여야 정량적으로 옮길 수 있다. Silica gel 흡착크로마토그래피에서 flonicamid는 용출강도가 큰 분획에서 비로소 용출되므로 상당한 색소 등 불순물이 세정 분획에서 미리 용출, 확실한 불순물 정제 효과를 관찰할 수 있다.

- Flonicamid는 극성 화합물이므로 GLC 상 크로마토그래피 특성이 이상적이지 않다. 따라서 화합물의 극성에 맞는 극성의 분리 column을 사용하되 가급적 짧은 column을 사용하여 머무름 시간을 단축, 분석하는 것이 좋다. 분석의 재현성을 위하여 column efficiency는 다소 떨어지더라도 내경 0.53 mm의 모세관 column에 검체 용액을 직접 주입하며 등온조건으로 분석한다.

8.4.82 잔류농약 분석법 4.1.4.112

플루오피콜라이드(Fluopicolide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : fluopicolide
화학명 (IUPAC) : 2,6-dichloro-*N*-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridylmethyl] benzamide
분자식 : $C_{14}H_8Cl_3F_3N_2O$
평균분자량 : 383.6
질량분석 시의 M+질량 : 382.0
Log P_{ow} : 2.9
물에 대한 용해도 : 2.8 mg/L
증기압 : 3.03×10^{-4} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

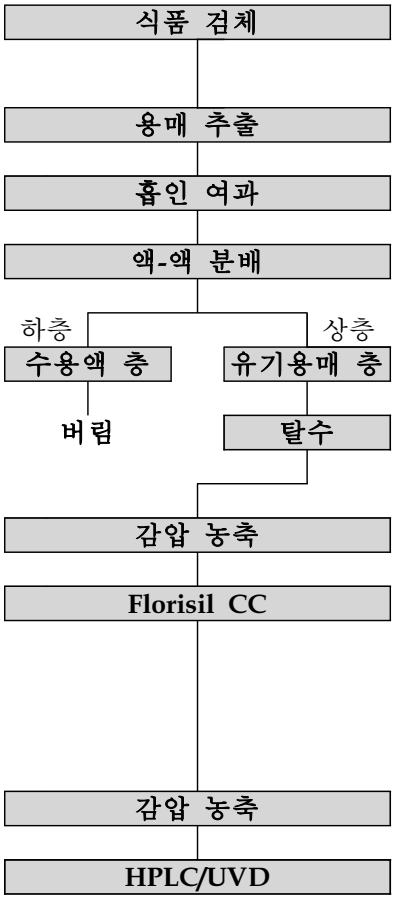
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Fluopicolide	0.079	-	0.7	0.2~1.0	-	-	0.1

2) 분석법 개요

습윤화한 세절 검체에 methanol을 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인 여과한 후 포화식염수와 물을 가하고 dichloromethane/*n*-hexane 혼합액 (20/80, v/v)으로 분배 추출한다. 분배액을 감압 농축하고 Florisil column chromatigraphy로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 건조검체의 경우 물 20mL를 가하여 10분간 습윤화
- Methanol 100mL로 2분간 고속 마쇄 추출
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 300mL첨가
- Dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 100mL로 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (7/93) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 CH_3CN/water (50/50) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : UV 269 nm
주입량 : 50 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

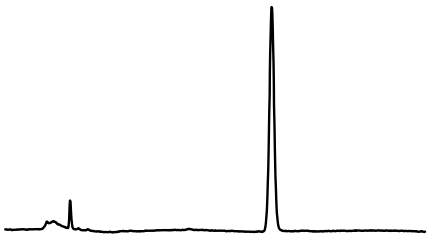


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
fluopicolide (12.7분) 50 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
이온화 : ESI, positive-ion mode
주입량 : 10 μL
Capillary temperature : 330℃
Cone voltage : 78 V
분자량 범위 : 100~500

표 1. LC-MS ESI(+) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Fluopicolide	7.3	382	383

6) 분석법 해설

- Fluopicolide는 보호용 살균제로서 log P_{ow}가 2.9인 중간~비극성 범위의 비해리성 중성 화합물이나 휘발성이 낮고 분자구조 내에 열에 취약한 amide기를 함유하고 있어 GLC로는 분석이 곤란하다. 반면에 비교적 장파장인 269 nm를 흡수하는 등 자외 흡광 특성이 우수하므로 HPLC/UVD로 분석하는 것이 최선의 방법이다.

- 추출 및 분배법은 중간~비극성 농약 잔류분석법에서 일상적으로 사용되는 방법이며 흡착 chromatography 방법에 의하여 충분히 정제된 추출액의 조제가 가능하다. 즉, 농산물 검체로부터 대상성분을 추출하기 위한 용매로는 methanol을 사용한다. 대상 화합물은 중간 극성이나 극성이 큰 methanol을 사용하여도 우수한 추출 효율을 나타내며 함께 추출되는 비극성 간섭물질의 양이 acetone이나 acetonitrile에 비하여 적어 정제과정이 간편해지는 장점이 있다. Methanol 추출액을 물로 희석하고 이온강도를 증가시키기 위하여 NaCl 등을 첨가한 후 dichloromethane/*n*-hexane 혼합액으로 분배한다 이 방법은 추출액을 농축하지 않아도 되므로 그 과정이 간편하며 fluopicolide는 1회 분배로도 확실한 효율로 회수된다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액으로 구성된 세정 및 용출 용매체계에서 용출 분획에는 다소의 색소가 함유되나 기기분석상의 큰 지장은 없다.

- Fluopicolide는 최대흡광파장이 269 nm로 HPLC 분석 시에 비교적 장파장에서 측정하므로 선택성은 우수하나 흡광계수가 다소 낮아 검체 주입량이 많은 편이며 이에 따라 간섭물질의 혼입 가능성이 있다. 따라서 머무름 시간을 가급적 길게 설정하여 충분한 분리가 이루어지도록 이동상을 조절한다.

표 2. 토마토 중 회수율 및 정량한계

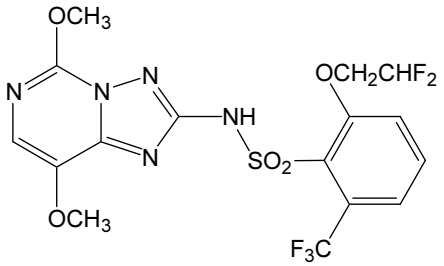
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Fluopicolide	0.2	92.5±8.2	0.02
	1.0	85.4±2.3	

* 3반복 평균±표준편차

8.4.83 잔류농약 분석법 4.1.4.114

페녹슐람(Penoxsulam)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : penoxsulam
화학명 (IUPAC) : 3-(2,2-difluoroethoxy)-*N*-(5,8-dimethoxy[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-2-yl)-α,α,α-trifluorotoluene-2-sulfonamide
분자식 : $C_{16}H_{14}F_5N_5O_5S$
평균분자량 : 483.4
질량분석 시의 M+질량 : 483.1
Log P_{ow} : -0.354 (19℃)
물에 대한 용해도 (mg/L, 19° C) : 5.66 (pH 5), 408 (pH 7), 1460 (pH 9)
증기압 : 9.55×10^{-11} mPa (25℃)
pKa : 5.1

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

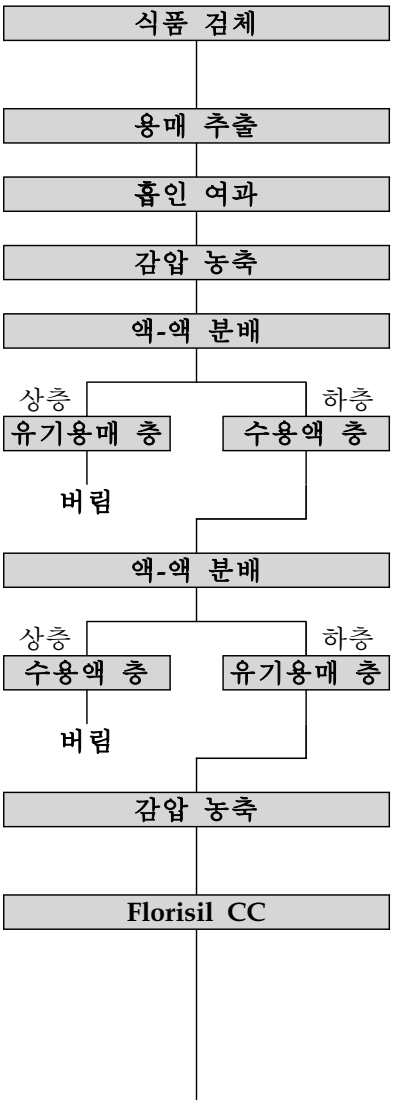
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Penoxsulam	0.14	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

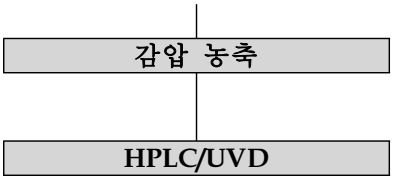
분쇄 검체를 약산성조건으로 습윤화하고 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여

과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액의 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 분액여두에 옮겨 *n*-hexane으로 분배, 세정한다. 수용액 층의 산도를 산성으로 조절한 후 penoxsulam을 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 추출물을 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 곡류 검체 25g
- 0.2M NH_4Cl 수용액 (pH 3.0) 20mL 첨가, 10분간 방치
- Acetone 100mL, 2시간 진탕 추출
- 여분의 acetone 30mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 40℃에서 acetone을 날려 보냄.
- 2% K_2HPO_4 수용액 40mL를 첨가, pH 8.0~8.2로 조절
- *n*-Hexane 50mL 분배 세정
- 6N HCl 수용액을 첨가, pH 2.8~3.0으로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 dichloromethane 10mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 5g (내경 15 mm 유리관 사용)
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Acetone/dichloromethane (50/50) 50mL → 버림
- Acetone 50mL → 받음



- 40℃에서 증발 건고
- CH_3CN/water/acetic acid (45/55/0.2) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
이동상 : acetonitrile/물/acetic acid (45/55/0.2, v/v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 285 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 분석법 해설

- Penoxsulam은 triazolopyrimidine계 제초제로서 식물의 필수 아미노산인 valine 및 isoleucine 등의 생합성에 관여하는 acetolacetate synthase (ALS)나 acetohydroxyacid synthase (AHAS)를 저해함으로써 제초작용을 나타내는 선택성 제초제이다. 잡초 발아 후 처리용 제초제로서 주로 벼 재배 시에 발생하는 다양한 잡초를 방제하기 위하여 단제 또는 합제의 한 성분으로 전면 살포 또는 토양처리로 사용된다. 잔류분의 정의는 모화합물로 한정된다.

- Penoxsulam은 분자 내의 sulfonamide기 (R_1-NH-SO_2-R_2)의 proton이 해리 가능한 약산성 화합물로서 log P_{ow} -0.354인 극성 화합물이며 휘발성이 9.55×10^{-11} mPa로 매우 낮으므로 GLC로 분석하기는 어렵다. 따라서 자외영역의 강한 흡광성에 착안하여 HPLC/UVD로 분석한다.

- 검체 추출은 먼저 검체를 약산성화하여 penoxsulam의 이온화를 억압, 유기용매 가용성 형태를 유지시키면서 acetone으로 마쇄 추출한다. Penoxsulam의 pKa는 5.1이므로 pH를 3.1이하로 조절하면 99% 이상 이온화가 억압된다. 산성화 및 건조 곡류의 습윤화를 위한 NH_4Cl 용액은 소량의 고농도 용액보다는 다량의 묽은 용액을 첨가하여 급

격한 pH 변화를 최소화한다.

- 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위하여 액-액 분배법을 수행하는데 penoxsulam의 해리 특성을 이용하여 효과적인 불순물 세정과 분배 추출을 위한 ion-associated partition법을 사용한다. 즉, penoxsulam은 약산성의 해리가능 화합물이므로 알칼리조건에서는 수용성, 산성에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 검체 추출액의 산도를 약알칼리조건 (pH 7.1 이상)으로 조절하고 *n*-hexane과 같은 비극성 유기용매로 분배하여 버리면 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거 할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 약산성으로 조절하면 대상성분들은 유용성의 비해리 형태가 되므로 ionic strength를 보다 증대시킨 조건에서 dichloromethane으로 2회 분배, 우수한 효율로 대상성분을 회수할 수 있다. 대상성분의 분해 가능성을 최소화하고 해리성 불순물의 제거 효율을 높이기 위하여 pH는 약산과 약알칼리 범위 내에서 조절한다.

- Dichloromethane 분배 추출액은 penoxsulam이 약산성 화합물이므로 탈수과정 중 일부 약알칼리 액성의 anhydrous sodium sulfate에 포집되는 것을 방지하기 위하여 탈수제 사용 없이 플라스크에 받는다. 따라서 dichloromethane 층이 깨끗하게 분리되도록 충분히 정치하고 수분이 혼입되지 않도록 주의한다.

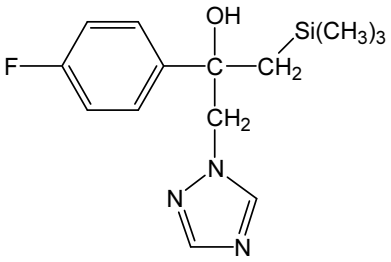
- 분배 추출액의 정제도를 높이기 위해서 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용하여 추가 정제한다. Penoxsulam은 극성과 해리성으로 인하여 Florisil column에서 매우 늦게 용출되므로 대부분의 불순물들이 세정 분획에서 제거되어 최종 분석용액은 색깔이 거의 없는 매우 잘 정제된 상태로 조제된다.

- HPLC 분석에서 이동상은 penoxsulam의 이온 억압을 위하여 0.2%의 acetic acid가 함유된 acetonitrile/물 혼합액 (약 pH 3)을 사용하며 penoxsulam은 sharp한 peak로 나타난다. 검체의 정제도가 높고 검출 파장이 285 nm로 장파장이므로 간섭이 거의 없는 깨끗한 크로마토그램을 얻을 수 있다. 정량한계는 최종용액을 20 μL 주입하였을 때 0.05 mg/kg 이하이다.

8.4.84 잔류농약 분석법 4.1.4.115

시메코나졸(Simeconazole)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : simeconazole
화학명 (IUPAC) : (*RS*)-2-(4-fluorophenyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-3-(trimethylsilyl) propan-2-ol
분자식 : $C_{14}H_{20}FN_3OSi$
평균분자량 : 293.4
질량분석 시의 M+질량 : 293.1
Log P_{ow} : 3.2
물에 대한 용해도 : 57.5 mg/L
증기압 : 5.4×10^{-2} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

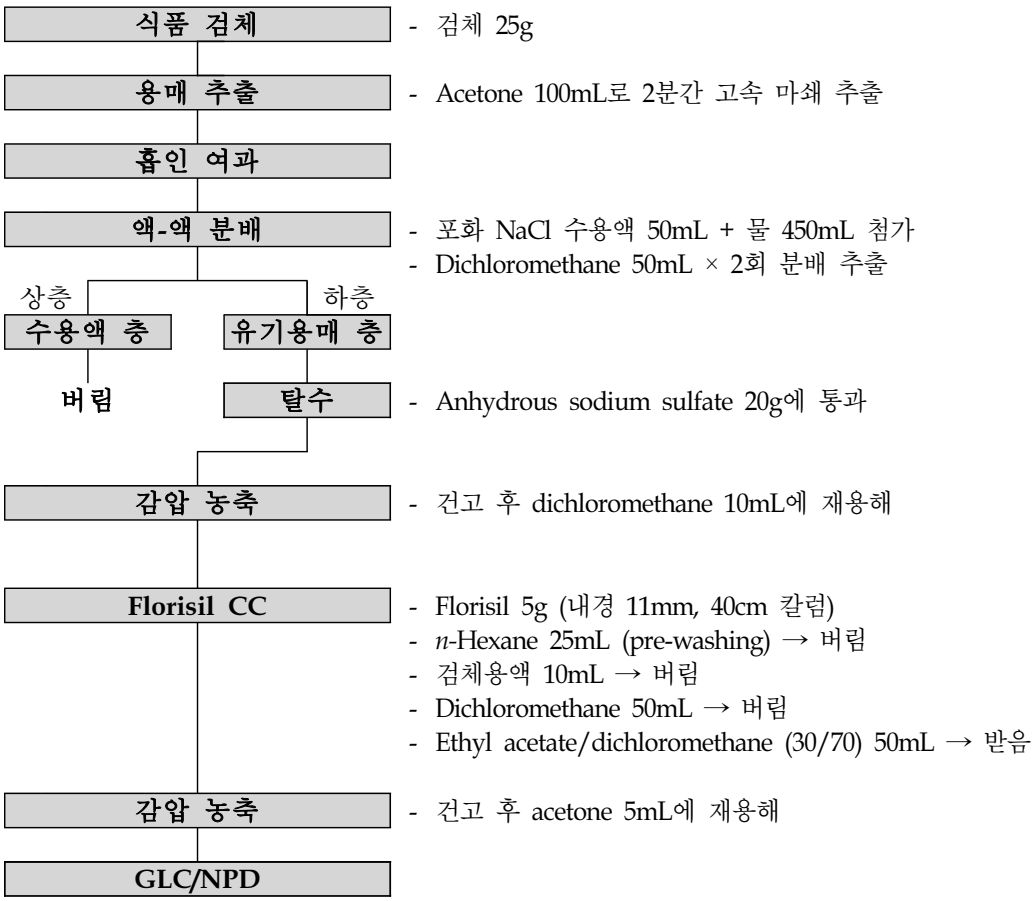
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Simeconazole	0.0085	-	0.2~2.0	0.05~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액으로 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다.

Dichloromethane 추출액을 탈수, 감압 농축한 후 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-608 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 170℃

주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 15 mL/min
연료가스 : hydrogen 및 air의 유량을 검출기 최적 조건으로 조정
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS

6) 분석법 해설

- Simeconazole은 전형적인 EBI계 살균제이다. 분자구조는 aryl-aryl의 bridge구조를 가지고 있으며 bridge 내 1개 탄소는 키랄성이므로 enantiomer가 존재하나 광학활성을 제외한 물리적 특성이 동일하므로 일상적 크로마토그래피에서는 분리되지 않는다. Simeconazole은 log P_{ow}가 3.2로 알려진 해리하지 않는 중성의 화합물로서 휘발성이 0.054 mPa로 알려져 있으므로 기기분석법으로는 GLC가 가능하다. 대상 화합물의 분자구조 내에 3개의 질소를 함유하고 있으므로 검출기는 NPD를 채용한다.

- 농산물 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위하여 액-액 분배법을 사용하는데 acetone 추출액을 물로 희석하고 NaCl 등을 첨가하여 dichloromethane으로 분배한다 이 방법은 추출액을 농축하지 않아도 되므로 그 과정이 간편하며 simeconazole은 확실한 효율로 회수된다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하다. Simeconazole은 과실 및 채소류에만 등록 사용되고 있어 *n*-hexane-acetonitrile 분배법이 필요 없으나 향후 유지 작물에 사용될 경우에는 이 분배법의 추가 채용이 필수적이다.

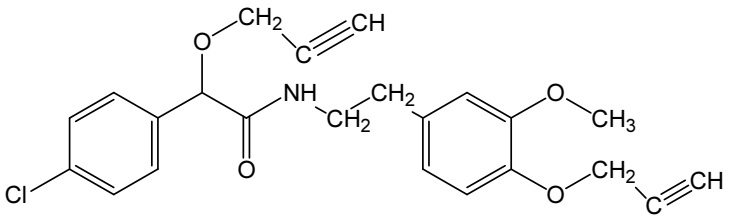
- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/dichloromethane 혼합액으로 구성된 세정 및 용출 용매체계는 두 용매가 비슷한 극성이면서도 흡착제에 대한 용출강도가 서로 다른 특성을 최대한 이용한 것이다. 기기분석을 위한 최종용액은 그 정제정도가 우수하여 연속적인 검체 주입이 가능하다.

- Simeconazole은 분자 중에 3개의 질소 원자를 함유하고 있어 NPD에 대한 감도가 상당하고 간섭물질과의 겹침 가능성이 적기 때문에 선택성이나 분석 감도상의 큰 문제가 없이 비교적 용이하게 분석이 가능하다.

8.4.85 잔류농약 분석법 4.1.4.116

만디프로파미드(Mandipropamid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : mandipropamid
화학명 (IUPAC) : 2-(4-chlorophenyl)-*N*-[3-methoxy-4-(prop-2-ynyloxy)phenethyl]-2-(prop-2-ynyloxy)acetamide
분자식 : $C_{23}H_{22}ClNO_4$
평균분자량 : 411.9
질량분석 시의 M+질량 : 411.1
Log P_{ow} : 3.2
물에 대한 용해도 : 4.2mg/L
증기압 : 〈9.4×10^{-4} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

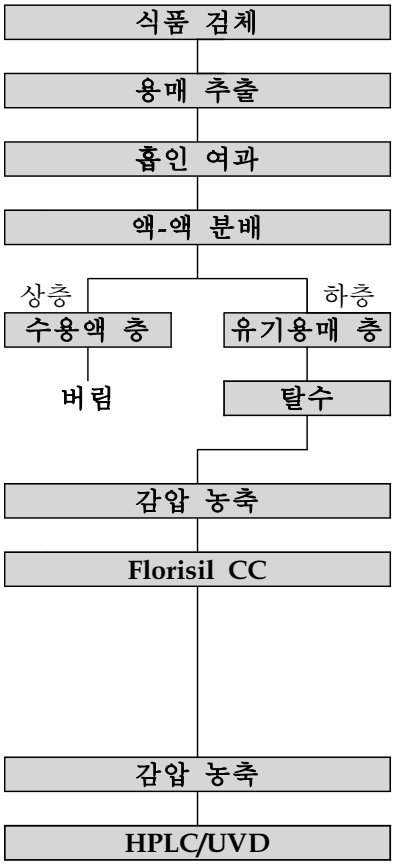
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Mandipropamid	0.05	-	5.0	0.05~5.0	-	-	0.1

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 세절 검체에 methanol을 가하여 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인 여과한 후 포화식염수와 물을 가하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatigraphy로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g
- Methanol 100mL로 2분간 고속 마쇄 추출
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 물 300mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (50/50) 100mL → 받음
- 건고 후 acetonitrile/water (50/50) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : UV 226 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.04 mg/kg

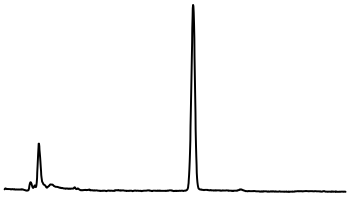


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
mandipropamid (11.0분) 10 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
이온화 : ESI, positive-ion mode
주입량 : 5 μL
Capillary temperature : 330℃
Cone voltage : 14 V
분자량 범위 : 100~500

표 1. LC-MS ESI(+) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Mandipropamid	6.3	411	412

6) 분석법 해설

- Mandipropamid는 mandelamide계의 보호용 살균제로 주로 채소류의 병해 방제에 사용된다. 잔류허용기준은 0.05~5.0 mg/kg이므로 최소 0.05 mg/kg 이하의 분석 감도가 요구된다.

- Mandipropamid는 log P_{ow}가 3.2로 알려진 비극성의 중성 화합물이나 휘발성이 〈9.4×

10^{-4} mPa로 매우 낮고 분자 내에 3중 결합을 포함하고 있어 GLC로 분석하기는 어려운 화합물이다. 그러나 자외 흡광 특성이 비교적 우수하므로 HPLC/UVD로 분석 가능하다.

- 추출 및 분배법은 중간~비극성 농약 잔류분석법에서 일상적으로 사용되는 방법이며 흡착 chromatography 방법에 의하여 충분히 정제된 추출액의 조제가 가능하다. 즉, 농산물 검체로부터 대상성분을 추출하기 위한 용매로는 methanol을 사용한다. 대상화합물은 중간 극성이나 극성이 큰 methanol을 사용하여도 우수한 추출 효율을 나타내며 함께 추출되는 비극성 간섭물질의 양이 acetone이나 acetonitrile에 비하여 적어 정제과정이 간편해지는 장점이 있다. Methanol 추출액을 물로 희석하고 NaCl 등을 첨가하여 dichloromethane으로 분배한다. 이 방법은 추출액을 농축하지 않아도 되므로 그 과정이 간편하며 mandipropamid는 확실한 효율로 회수된다.

- 흡착크로마토그래피법은 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. Ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액으로 구성된 세정 및 용출 용매체계에서 용출 분획에는 다소의 색소가 함유되나 기기분석 상의 큰 지장은 없다.

- Mandipropamid는 흡광파장이 226 nm로 짧으므로 장파장을 측정파장으로 사용하였을 때에 비하여 간섭물질의 혼입 가능성이 크다. 따라서 머무름 시간을 가급적 길게 설정하여 충분한 분리가 이루어지도록 이동상을 조절한다. 또한 mandipropamid 보다 늦게 용출되는 불순물들을 충분히 세정하여 간섭을 최소화함으로써 분석의 재현성을 확보한다.

표 2. 고추 중 회수율 및 정량한계

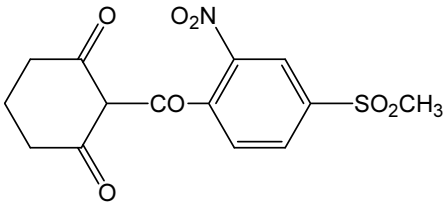
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Mandipropamid	0.4	98.5±2.0	0.04
	2.0	98.9±2.8	

* 3반복 평균±표준편차

8.4.86 잔류농약 분석법 4.1.4.117

메소트리온(Mesotrione)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : mesotrione
화학명 (IUPAC) : 2-(4-mesyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione
분자식 : $C_{14}H_{13}NO_7S$
평균분자량 : 339.3
질량분석 시의 M+질량 : 339.0
Log P_{ow} : 0.11 (unbuffered), 0.90 (pH 5), <-1.0 (pH 7 및 9)
물에 대한 용해도 (mg/L) : 160 (unbuffered), 2200 (pH 9)
증기압 : 5.69×10^{-3} mPa (25℃)
pKa : 3.12, 약산성

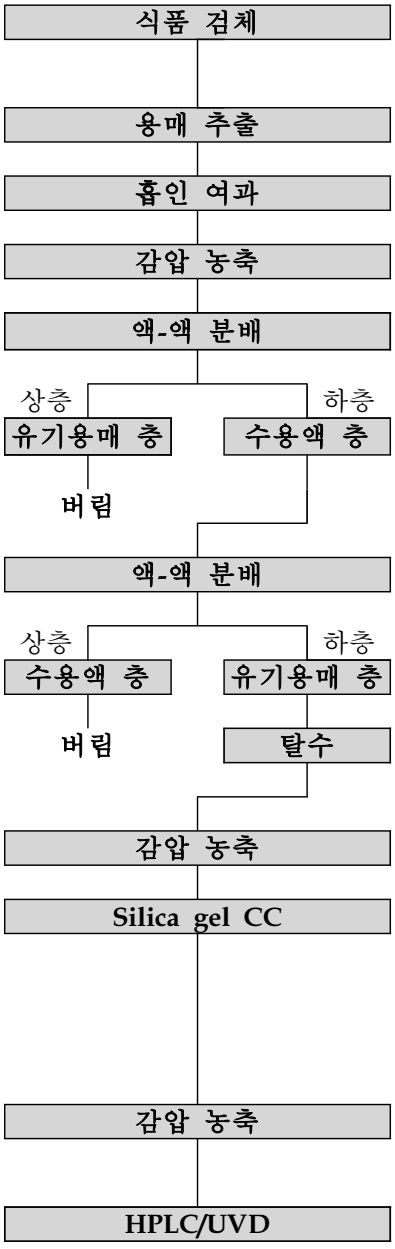
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Mesotrione	0.01	0.2	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

산성화한 세절 검체에 acetonitrile을 가하고 고속 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인 여과한 후 ion-associated partition법으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 silica gel column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 20g, 0.2M NH_4Cl 수용액 (pH 2.0) 20mL를 가하여 10분간 습윤화
- Acetonitrile 100mL로 2분간 고속 마쇄 추출
- 40℃에서 acetonitrile 증발
- 2% K_2HPO_4 수용액 40mL 첨가 후 1M HCl을 가하여 pH 6.0±0.2로 조절
- *n*-Hexane 50mL로 분배 추출하여 버림
- 6M HCl 수용액으로 pH 2.0±0.2로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 acetone 10mL에 재용해
- Silica gel 5g (내경 11mm, 40cm 칼럼)
- Acetone 25mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Methanol/acetone (7/93) 50mL → 버림
- Methanol/acetone (20/80) 50mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 acetonitrile/50mM KH_2PO_4 (30/70) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/50 mM KH_2PO_4, pH 2.5 (30/70, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : UV 258 nm
주입량 : 50 μL
분석법의 정량한계 : 0.01 mg/kg

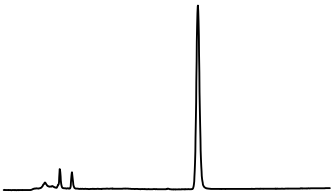


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
mesotrione (11.9분) 10 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물/formic acid (25/75/0.1, v/v/v), 0.2 mL/min
이온화 : ESI, negative-ion mode
주입량 : 10 μL
Cone voltage : -31 V
Capillary temperature : 330℃
분자량 범위 : 100~400

표 1. LC-MS ESI(-) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Mesotrione	12.0	339	338

6) 분석법 해설

- Mesotrione은 주로 옥수수 등 곡류의 광엽 잡초방제에 사용되는 triketone계 제초제이다. 잔류허용기준은 0.2 mg/kg이므로 일반적 잔류분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하의 분석 감도가 요구된다.

- Mesotrione은 pKa가 3.1인 약산성의 화합물이다. 또한 화합물의 log P_{ow}가 pH 범위에 따라 0.1~0.9로 알려진 극성이 강한 화합물이므로 직접 GLC로 분석하는 것은 불가능하다. 분자 내에 258 nm의 장파장에서 충분한 흡광계수를 나타내는 발색단을 보유하고 있으므로 기기분석에는 HPLC/UVD를 이용한다.

- 추출 및 분배는 일반 약산성 농약의 잔류 분석 시와 매우 유사하다. 즉, 검체로부터 mesotrione을 추출하기 위한 용매로는 검체를 산성화한 후 acetonitrile을 사용한다. Mesotrione의 pKa는 3.1이므로 검체를 pH 2 이하로 산성화할 경우 90% 이상이 이온억압되어 유기용매 가용의 특성을 나타내게 되므로 acetonitrile로 충분히 추출이 가능하다.

- 분배 정제과정은 pH 조절에 의한 ion-associated partition법을 사용한다. 대상성분은 pKa가 3.1인 약산성의 해리가능 화합물이므로 pH 5 이상에서는 수용성, pH 2 이하의 산성에서는 90% 이상이 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 pH 6.0 조건에서 *n*-hexane으로 분배하여 버림으로써 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거 할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 산성으로 조절하면 대상성분은 유용성의 비해리 형태가 되고 중화과정 중 생성된 염에 의하여 ionic strength가 증대된 조건에서 dichloromethane 등의 유기용매로 추출하면 우수한 분배효율로 회수할 수 있다.

- 흡착크로마토그래피의 흡착제로는 대상성분의 용출을 용이하게 하기 위하여 silica gel을 사용한다. Mesotrione은 약산성의 해리 화합물임에도 불구하고 용출강도를 충분히 높일 경우 silica gel로부터 용출되므로 이온성 및 비극성 간섭물질을 효율적으로 제거할 수 있다.

- HPLC에서 이동상으로는 mesotrione의 pKa가 3.1인 점을 감안, 이온억압조건을 적절히 조절하여 간섭물질과의 분리를 최적화한다. 제시한 pH 2.5 조건은 충분한 이온억압조건은 아니나 phosphate buffer에 의한 이온강도 효과에 따라 mesotrione은 sharp한 대칭형 peak로 관찰된다. 또한 silica-based column의 사용한계와 화합물의 가수분해에 대한 안정성을 고려할 때 너무 낮은 pH 조건은 바람직하지 않다.

표 2. 쌀 중 회수율 및 정량한계

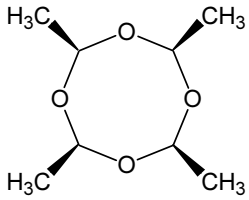
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Mesotrione	0.1	74.3±0.6	0.01
	0.5	79.1±4.8	

* 3반복 평균±표준편차

8.4.87 잔류농약 분석법 4.1.4.118

메트알데하이드(Metaldehyde)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metaldehyde
화학명 (IUPAC) : *r*-2,*c*-4,*c*-6,*c*-8-tetramethyl-1,3,5,7-tetroxocane
분자식 : $C_8H_{16}O_4$ (tetramer), $(C_2H_4O)_x$ (homopolymer)
평균분자량 : 176.2 (tetramer)
질량분석 시의 M+질량 : 176.1
Log P_{ow} : 0.12
물에 대한 용해도 : 222 mg/L
증기압 : 6.6×10^3 mPa (25℃)
pKa : 비해리성

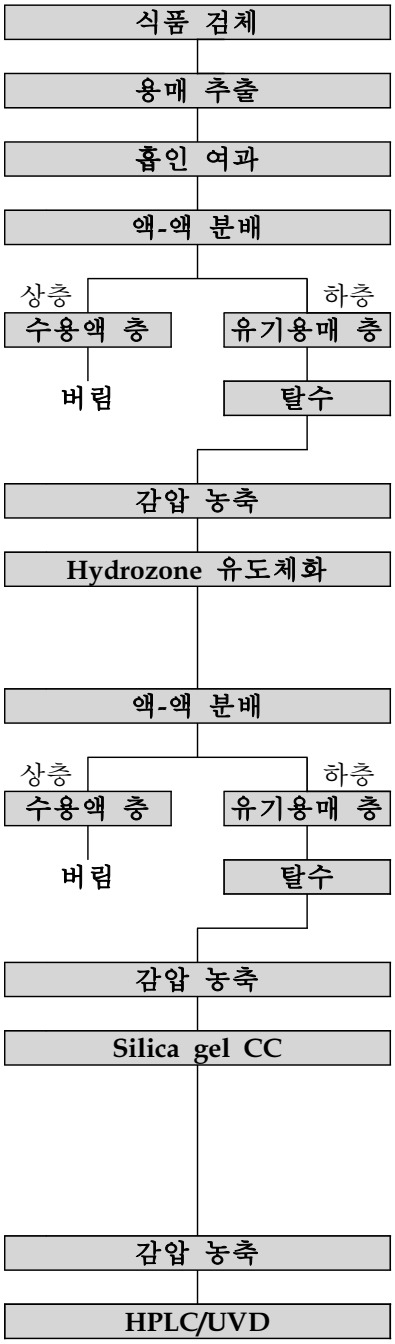
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metaldehyde	0.025	-	-	1.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체를 dichloromethane으로 고속 마쇄 추출하고 sodium metabisulfite 수용액으로 세척한 후 농축한다. 잔류물에 2,4-dinitrophenylhydrazine을 반응시켜 hydrazone 유도체를 형성하고 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 silica gel column chromatography로 추가 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g
- Dichloromethane 100mL로 2분간 고속 마쇄 추출
- 2% $Na_2S_2O_5$ 100mL × 2회 분배 추출하여 버림
- 물 100mL로 분배 추출하여 버림
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 dichloromethane 10mL에 재용해
- 6N HCl에 녹인 0.25% 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) 10mL첨가
- 40℃에서 20분간 교반 반응.
- Dichloromethane 20mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 건고 후 *n*-hexane 10mL에 재용해
- Silica gel 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 → 버림
- Ethyl acetate*n*-/hexane (10/90) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 100mL → 받음
- 건고 후 잔류물을 CH_3CN/water (50/50) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기파장 : 360 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.01 mg/kg

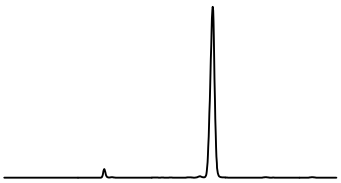


그림 1. 고성능 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
acetaldehyde-2,4-DNPH (9.3분) 10 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
이온화 : APCI, negative-ion mode
주입량 : 5 μL
Cone voltage : -55 V
Capillary temperature : 275℃
분자량 범위 : 100~300

표 1. LC-MS APCI(-) SIM 분석을 위한 fragment ion

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Metaldehyde	9.3	224	223

6) 분석법 해설

- Metaldehyde는 주로 채소류 재배 시에 발생하는 달팽이를 방제하기 위해서 사용되는 살연체동물제로서 화합물은 acetaldehyde의 tetramer 또는 homopolymer의 형태이다.

- 분석법은 대상성분을 검체로부터 직접 dichloromethane으로 추출하며 이를 acetaldehyde로 정량적으로 전환한다. Acetaldehyde는 2,4-dinitrophenylhydrazine 시약을 이용하여 hydrazone 유도체를 형성한다. 형성된 유도체는 360 nm에서의 강한 흡광성을 나타내므로 HPLC/UVD를 이용하여 분석한다. Metaldehyde의 monomer인 acetaldehyde의 유도체 형성 반응은 그림 1과 같다.

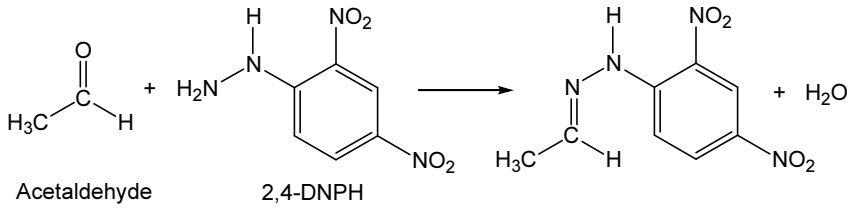


그림 1. Acetaldehyde의 2,4-dinitrophenylhydrazone 유도체 형성 반응

- 잔류분석실에서 용기 세척 시에 사용하는 acetone에는 acetaldehyde가 일부 불순물로서 존재할 수 있다. 따라서 분석 시 간섭을 최소화하기 위하여 용기는 사전에 dichloromethane으로 세척한 후 사용한다.

표 2. 배추 중 회수율 및 정량한계

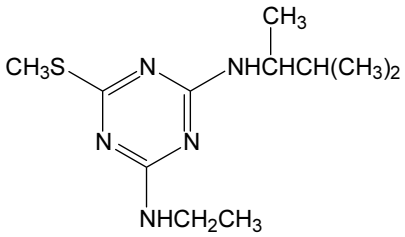
대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)*	정량한계 (mg/kg)
Metaldehyde	0.1	95.2±6.7	0.01
	1.0	98.4±3.5	

* 3반복 평균±표준편차

8.4.88 잔류농약 분석법 4.1.4.119

디메타메트린(Dimethametryn)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : dimethametryn
화학명 (IUPAC) : N^2-(1,2-dimethylpropyl)-N^4-ethyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine
분자식 : $C_{11}H_{21}N_5S$
평균분자량 : 255.4
질량분석 시의 M+질량 : 255.2
Log P_{ow} : 3.8
물에 대한 용해도 : 50 mg/L (20℃)
증기압 : 0.186 mPa (20℃)
pKa : 4.1

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

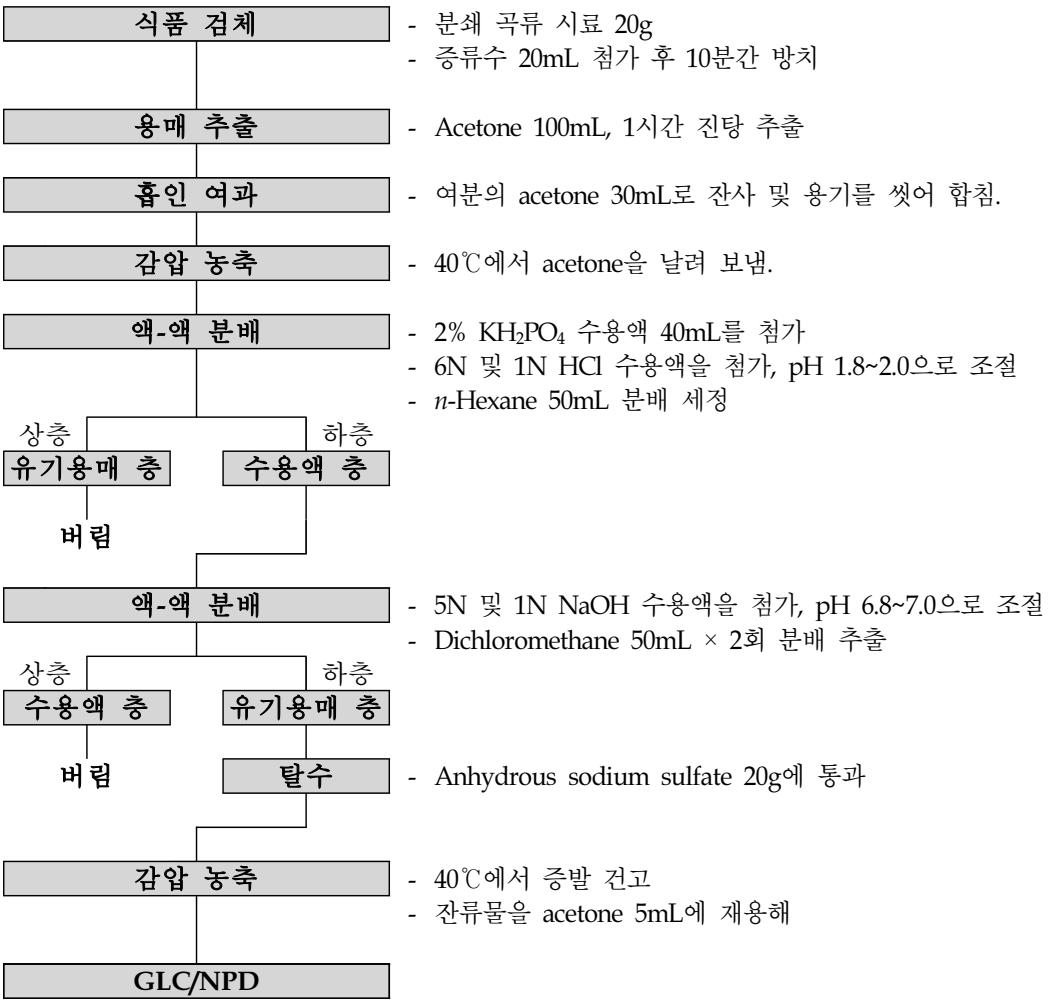
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Dimethametryn	0.01	0.1	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액의 산도를 산성으로 조절한 후 분액여두에 옮

겨 *n*-hexane으로 분배, 세정한다. 수용액 층의 산도를 중성으로 조절한 후 dimethametryn을 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 acetone에 재용해하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)

검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 220℃
주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

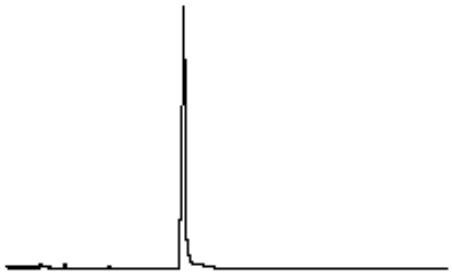


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
dimethametryn (6.0분) 2 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 280℃로 상승 시킨 후
2분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 100~300

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Dimethametryn	21.1	255	212, 255

6) 분석법 해설

- Dimethametryn은 광합성 Hill reaction에서의 전자전달계를 저해하여 잡초를 방제하는 전형적인 triazine계 선택성 제초제이다. 주로 벼 재배 중에 발생하는 1년생 광엽 잡초에 약효가 있어 타 약제와의 혼합제 형태로 널리 사용된다. 잔류분 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- Dimethametryn은 log P_{ow}가 3.8 (pH에 따라 달라짐.)인 비극성 화합물이나 짝산의 pKa가 4.1인 약염기성 화합물이다. 따라서 GLC 보다는 HPLC가 분석에 유리하나 자외 영역의 흡광도가 약하고 형광성이나 산화/환원 특성이 없으므로 적절한 검출기가 없다. 화합물의 휘발성이 0.186 mPa로 크고 분자 내에 질소 원자를 5개 함유하고 있다는 점에 착안하여 GLC/NPD로 분석한다.

- 검체는 비극성 화합물에서 일반적으로 사용하는 acetone으로 추출한다. 건조 곡류 검체의 경우 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시키기 위하여 증류수를 첨가하고 10분간 방치, 습윤화 과정을 추출에 앞서 수행한다.

- 농축 추출액의 분배는 dimethametryn의 해리 특성을 이용하여 효과적인 불순물 세정과 분배 추출을 위한 ion-associated partition법을 사용한다. 즉, dimethametryn은 약염기성의 해리가능 화합물이므로 산성 조건에서는 수용성, 알칼리조건에서는 유용성의 특성을 나타낸다. 따라서 검체 추출액의 산도를 산성조건 (pH 2.1 이하)으로 조절하고 *n*-hexane과 같은 비극성 유기용매로 분배하여 버리면 유지와 같은 비극성 불순물을 효과적으로 제거 할 수 있다. 이 과정에서 남은 수용액 층의 pH를 중성~약알칼리성 (pH 6.1 이상)으로 조절하면 대상성분들은 유용성의 비해리 형태가 되므로 ionic strength를 보다 증대시킨 조건에서 dichloromethane으로 2회 분배, 우수한 효율로 대상성분을 회수할 수 있다. 대상성분의 분해 가능성을 최소화하고 해리성 불순물의 제거 효율을 높이기 위하여 pH는 약산과 중성의 좁은 범위 내에서 조절한다. 이러한 해리 특성을 이용한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이어서 흡착크로마토그래피와 같은 별도의 정제법을 추가하지 않더라도 기기분석이 가능하다.

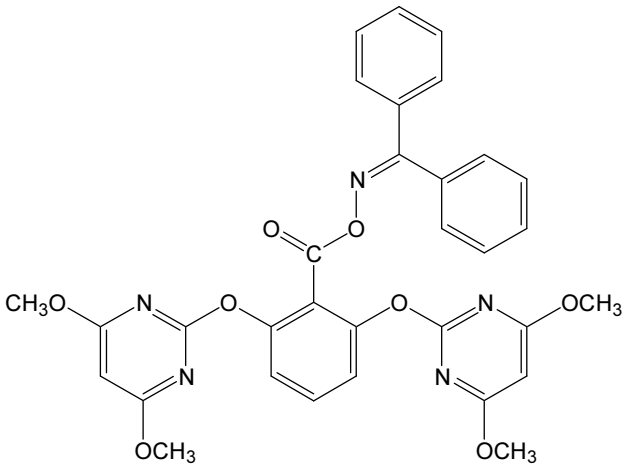
- Dimethametryn은 약염기성 화합물이므로 GLC 상 크로마토그래피 특성이 이상적이지 않다. 따라서 화합물의 극성에 맞는 비극성의 분리 column을 사용하되 가급적 짧은 column을 사용하여 머무름 시간을 단축, 분석하는 것이 좋다. 분석의 재현성을 위하여 column efficiency는 다소 떨어지더라도 내경 0.53 mm의 모세관 column에 검체 용액을 직접 주입하며 등온조건으로 분석한다.

- GC-MS에 의한 재확인법은 splitless 검체 주입법과 승온 조건으로 분석한다. 승온조건의 시작은 최종 용액인 acetone의 비등점 보다 낮은 45℃에서 시작하며 10℃/분의 비교적 빠른 속도로 승온시켜 column efficiency를 향상시킴과 동시에 머무름 시간을 가급적 단축한다. Dimethametryn은 electron impact (EI, 70 eV)에 의하여 비교적 용이하게 이온화되며 분자이온 (M^+, m/z=255)을 관찰할 수 있다. 그러나 상대적 intensity가 낮으므로 재확인 한계를 확보하기 위하여 isopropyl기가 이탈된 base peak (m/z=212)를 SIM용 이온으로 우선적으로 이용한다.

8.4.89 잔류농약 분석법 4.1.4.120

피리벤족심(Pyribenzoxim)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : pyribenzoxim
화학명 (IUPAC) : benzophenone *O*-[2,6-bis(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yloxy) benzoyl]oxime
분자식 : $C_{32}H_{27}N_5O_8$
평균분자량 : 609.6
질량분석 시의 M+질량 : 609.2
Log P_{ow} : 3.04
물에 대한 용해도 : 3.5 mg/L (25℃)
증기압 : 〈9.9×10^{-1} mPa
pKa : 비해리성

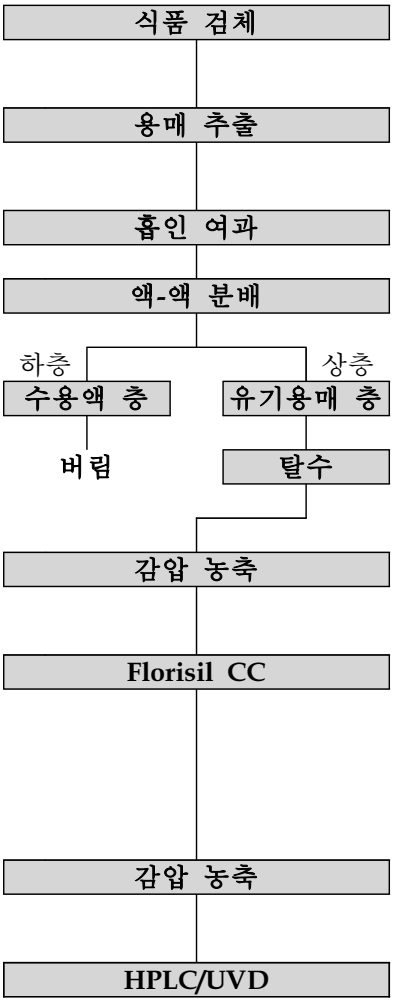
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Pyribenzoxim	0.25	0.01	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane /*n*-hexane 혼합액으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 곡류 검체 25g
- 증류수 20mL 첨가 후 10분간 방치

- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출

- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane/n-hexane (20/80) 100mL 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해

- Florisil (60~100mesh), 10g (내경 15 mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (15/85) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (40/60) 100mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (70/30) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 247 nm
주입량 : 40 μL
분석법의 정량한계 : 0.01 mg/kg

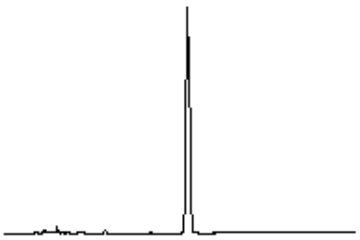


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
pyribenzoxim (10.3분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 142 V
Capillary temp. : 300℃
분자량 범위 (*m/z*) : 200~700

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Pyribenzoxim	5.8	609	610, 413

6) 분석법 해설

- Pyribenzoxim은 식물의 필수 아미노산인 valine 및 isoleucine 등의 생합성에 관여하는 acetolacetate synthase (ALS)나 acetohydroxyacid synthase (AHAS)를 저해함으로써 제초작용을 나타내는 선택성 제초제이다. 주로 벼 재배 시에 잡초 발아후 처리용 제초제로서 경엽 살포로 사용된다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 3.04인 비극성의 중성 화합물이나 분자량이 609.6으로 크고 휘발성이 낮을 뿐 아니라 분자 내에 치환 oxime기를 함유하고 있으므로 흡착 및 열분해 가능성으로 인하여 GLC로 분석하기는 어렵다. 따라서 자외영역에서 최대흡광파장 247 nm이 비교적 장파장인 점을 이용하여 HPLC법을 이용하여 분석한다.

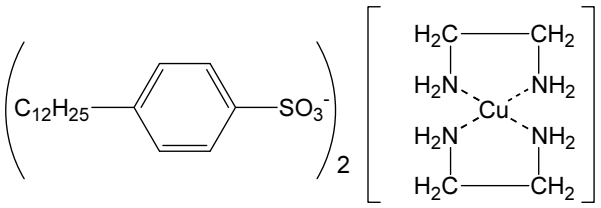
- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 비극성 용매 분배에 의한 조정제 (**組精製**), 그리고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다. 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 10분간 습윤화 과정을 수행함으로써 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시킨다. 분배과정은 검체 추출액을 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 혼합액으로 1회 분배하는 간편한 과정으로 수행하는데 대상성분의 95% 이상이 회수된다. Florisil 흡착크로마토그래피에서는 유지 등 검체 중 간섭물질에 의한 overloading을 최소화하기 위하여 충분한 양의 흡착제 (10 g)를 사용한다. Pyribenzoxim은 Florisil column에서 비교적 늦게 용출되며 유지 등 비극성 불순물은 세정 분획에서 상당량이 용출된다.

- HPLC 분석 시에는 pyribenzoxim의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화하며 늦게 용출되는 불순물을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다. 재확인을 위한 LC-MS에서 pyribenzoxim은 분자 내에 lone pair를 갖고 있는 질소원자가 다수 존재하므로 protonation이 용이하여 이온화법으로는 ESI, positive-ion mode가 최선이다.

8.4.90 잔류농약 분석법 4.1.4.121

디비이디시(DBEDC)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : DBEDC
화학명 (IUPAC) : copper bis(ethylenediamine)bis(dodecylbenzenesulfonate)
분자식 : $C_{40}CuH_{74}N_4O_6S_2$
평균분자량 : 834.7
질량분석 시 dodecylbenzenesulfonic acid의 $(M-H)^-$ 질량 : 325.2

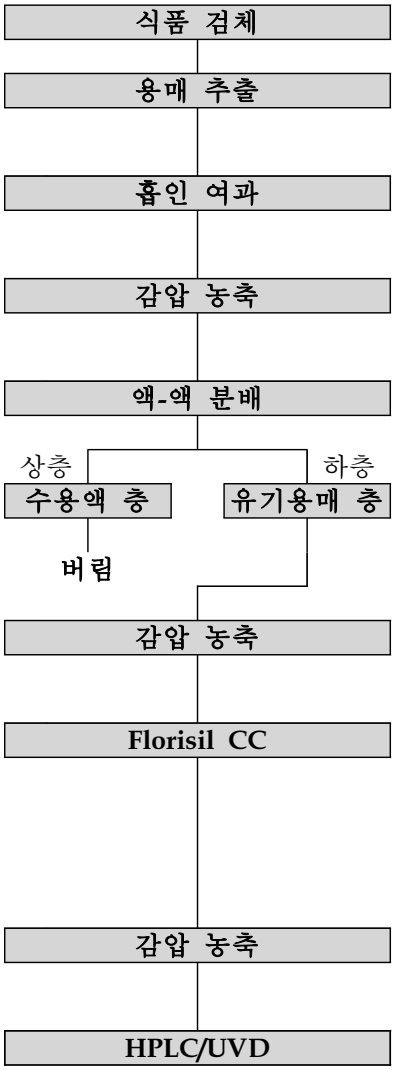
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
DBEDC	0.1	-	-	0.2~3.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 methanol과 NaOH 수용액을 가하여 copper complex인 DBEDC 중 dodecylbenzenesulfonate 부분을 sodium염으로 분리, 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 여과액을 중화시킨 후 감압 농축, methanol을 날려 보내고 분액여두에 옮겨 ion-pair 시약으로 methylene blue를 첨가한 후 chloroform으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/FLD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 25g
- Methanol 100mL + 10% NaOH 수용액 5mL
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 methanol 30mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 1N H_2SO_4 수용액을 첨가, pH 7.0으로 조절
- 40℃에서 methanol을 날려 보냄.
- 0.025% Methylene blue 수용액 40mL 첨가
- Chloroform 50mL × 2회 분배 추출
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 chloroform 5mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 5g (내경 11 mm 유리관 사용)
- Chloroform 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Acetone/chloroform (50/50) 100mL → 버림
- Methanol/acetone (50/50) 100mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Methanol/0.1% HCOOH 수용액 (60/40) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 형광검출기 (FLD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃

이동상 : methanol/0.1% formic acid (60/40, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : Ex 225 nm, Em 295 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

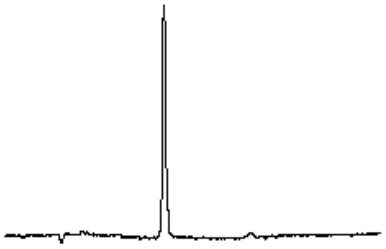


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
DBEDC (8.3분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : methanol/0.1% formic acid (60/40, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, negative-ion mode
Cone voltage : -100V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
DBEDC (dodecylbenzenesulfonic acid)	5.4	326	325

6) 분석법 해설

- 구리 이온은 고농도에서는 모든 생물에게 독작용을 나타내나 일정 농도범위에서는 살균효과가 우수하여 동 (銅)을 함유하는 화합물들은 오래전부터 예방적 살균제로 사용되어왔다. 동을 함유하는 살균제는 무기 및 유기 동 화합물로 대별되는데 무기동 화합물들은 천연적으로 부존하는 동 화합물들과 구별이 되지 않으므로 잔류면제성분으로 분류, 잔류분석 대상성분이 아니다. 반면 DBEDC와 같은 유기동제는 무기동제의 약점인 약해를 방지함과 동시에 유기착이온 (complex ion)의 형태로 제조, 살포함으로써 병원균 포자 발아단계에서의 침투성을 향상시켜 적은 살포량으로도 뛰어난 약효 증진효과를 거둘 수 있는 장점이 있어 무기동제를 대체, 그 사용량이 증가하고 있다. 유기동제는 무기동제와는 달리 잔류관리 대상성분으로 분류된다. DBEDC의 경우도 잔류분석 대상성분이며 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- DBEDC는 유기동 양이온과 dodecylbenzenesulfonic acid 음이온과의 착염 형태이다. 유기동 이온은 특정 발색시약을 이용한 비색법 (colorimetry)이 알려져 있으나 감도가 낮으며 간섭물질의 혼입을 최소화하기 위한 분리법이 결여되어 있어 선택성이 불량하므로 잔류분석법으로 이용하기 어렵다. 또한 물리화학적 특성이 일반적 크로마토그래피법을 적용하기 어려우므로 잔류분석법은 counter ion인 dodecylbenzenesulfonic acid를 대상성분으로 한다.

- 검체 추출은 methanol과 NaOH 수용액을 가하여 copper 착염인 DBEDC 중 dodecylbenzenesulfonate 부분을 sodium염의 형태로 분리하여 추출한다. Dodecylbenzenesulfonic acid는 pKa가 1~2로 예상되는 비교적 강산이므로 강염기에 의한 염 형성이 유기동이온 보다 유리하여 분리는 용이하게 일어난다. 추출성분이 이온성 염화합물이나 methanol에 대한 용해도가 높고 분자 내에서 상당부분을 차지하는 dodecylbenzene moiety의 비극성을 고려할 때 추출용매는 단순 수용액보다는 methanol을 사용하는 것이 추출효율이 우수하다.

- 추출액은 대상성분 및 검체로부터 함께 추출되는 성분의 가수분해에 의한 간섭을 최소화하기 위해서 신속히 pH를 중성으로 조절한다. Dodecylbenzenesulfonic acid는 비교적 강산이므로 pH 조절에 의해서는 완전한 이온화 억압이 어려우며 pH 7에서는 완전 해리상태이다. 따라서 그림 2에 나타낸 바와 같이 methylene blue 시약을 사용, 유기용매 가용성인 ion-pair를 형성함으로써 비극성 유기용매 층으로 분배 추출한다.

- Methylene blue 수용액 시약은 methylene blue anhydrous 0.25 g 및 sodium phosphate, dibasic 50 g을 증류수에 녹이고 sulfuric acid 6.8 mL를 첨가한 후 증류수를 가하여 총 부피를 1-liter로 조절한다.

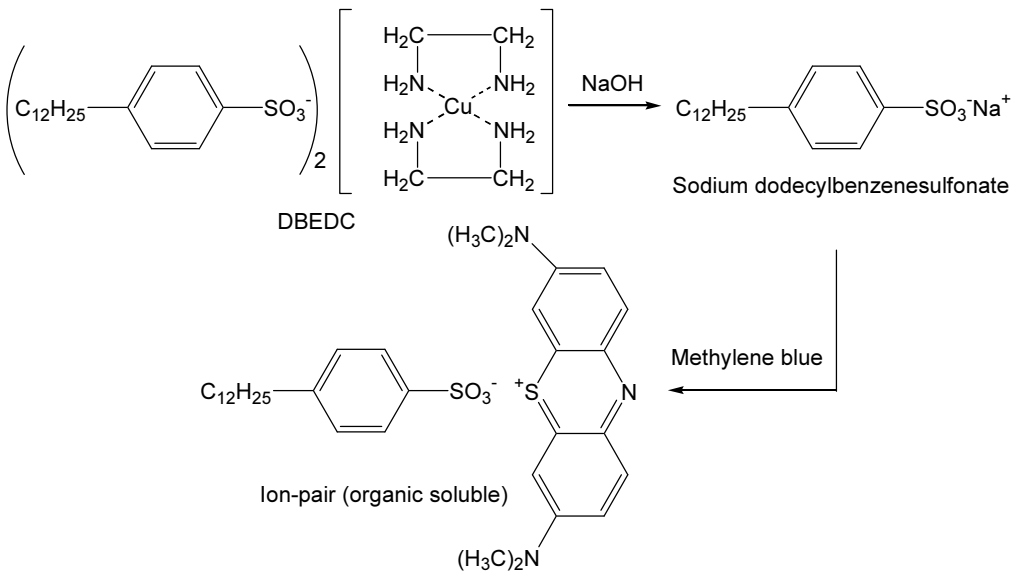


그림 2. DBEDC 중 dodecylbenzenesulfonate 분리 및 분배 추출을 위한 ion-pair 생성

- Dodecylbenzenesulfonic acid는 이온성 화합물이므로 Florisil column에서의 이동이 매우 느리다. 따라서 검체 주입 전에 Florisil을 chloroform으로 pre-washing하여 활성도를 감소시키고 극성이 강한 용매를 사용하여 대상성분을 용출시키며 세척 분획에서 대부분의 비극성 간섭물질이 용이하게 제거된다.

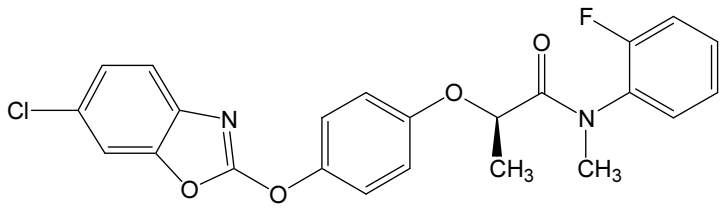
- HPLC에서는 역상 분배크로마토그래피의 원리를 이용하고 이동상에 formic acid를 첨가하여 pH 2.5 부근으로 조절함으로써 어느 정도의 이온억압에 의한 대칭형의 peak를 얻을 수 있다. 검출기로는 형광검출기를 사용하며 자외부흡광검출기에 비하여 선택성이 우수한 분석이 가능하다.

- Dodecylbenzenesulfonic acid는 산성화합물이므로 LC-MS에서 이온화법으로는 ESI, negative-ion mode가 최선이다. 즉, 분자 내 carboxylic acid의 proton은 용이하게 해리되어 deprotonation되므로 생성되는 이온은 대부분 $[M-H]^-$로 나타난다.

8.4.91 잔류농약 분석법 4.1.4.122

메타미포프(Metamifop)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metamifop
화학명 (IUPAC) : (*R*)-2-[4-(6-chloro-1,3-benzoxazol-2-yloxy)phenoxy]-2'-fluoro-*N*-methylpropionanilide
분자식 : $C_{23}H_{18}ClFN_2O_4$
평균분자량 : 440.9
질량분석 시의 M+질량 : 440.1
Log P_{ow} : 5.45 (pH 7, 20℃)
물에 대한 용해도 : 0.687 mg/L (pH 7, 20℃)
pKa : 비해리성

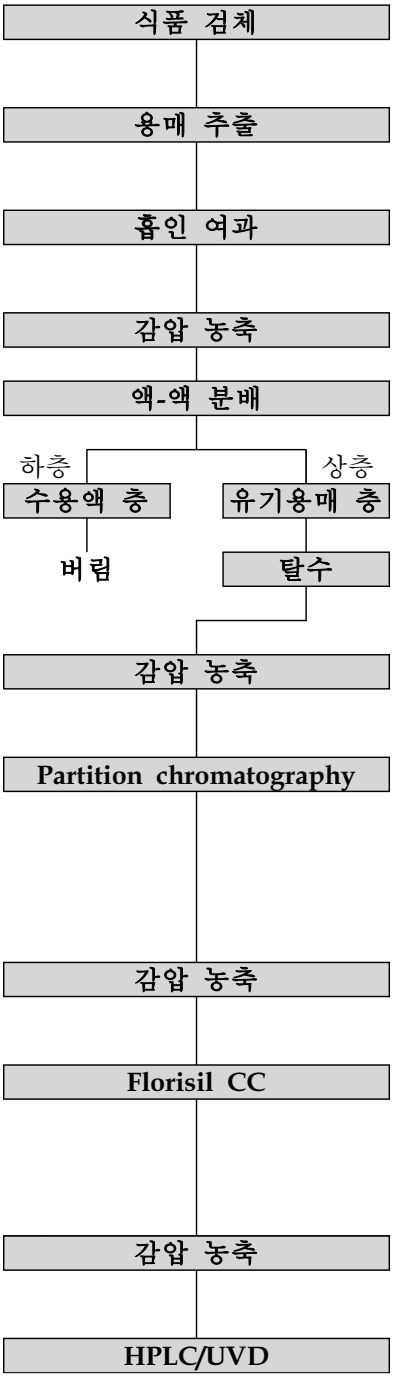
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metamifop	0.017	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetonitrile을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 증류수를 첨가, 희석한 후 ethyl acetate로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 역상 partition chromatography (C_{18})와 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 곡류 검체 40g
- 증류수 40mL 첨가 후 10분간 방치

- Acetonitrile 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출

- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 acetonitrile 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 40℃에서 acetonitrile을 날려 보냄.

- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 50mL 첨가
- Ethyl acetate 100mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (50/50) 5mL에 재용해

- SPE-C_{18}, 500mg
- Acetonitrile/water (50/50) 5mL (activation) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 40g 해당량) → 버림
- Acetonitrile/water (50/50) 10mL → 버림
- Acetonitrile/water (70/30) 20mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 5mL에 재용해

- SPE-Florisil, 1g
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 5mL (pre-washing) → 버림
- 분배 CC 용출액 5mL (검체 40g 해당량) → 버림
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 10mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetonitrile/water (70/30) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 240 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg 검체

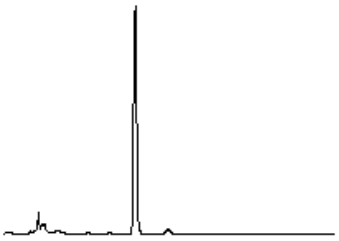


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
metamifop (7.9분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : APCI, positive-ion mode
Cone voltage : 85 V
Capillary temp. : 275℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 APCI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Metamifop	8.0	440	441, 443

6) 분석법 해설

- Metamifop는 aryloxyphenoxypropionionate계 제초제로서 식물체내 지질합성에 관여하는 acetyl-CoA carboxylase (ACCase)를 저해함으로써 제초활성을 나타내는 약제이다. Aryloxyphenoxypropionionate계 제초제는 광엽 밭작물 재배 시에 주로 단자엽 화본과 잡초를 방제하는데 사용되어 일명 graminicides라고도 알려져 있는데 metamifop는 이들과는 상이하게 주로 벼 재배 시에 발생하는 같은 화본과인 피에 대하여 강한 제초활성을 나타내는 특징이 있어 논농사에서 경엽살포용으로 주로 사용된다.

- Metamifop는 분자 내에 chiral carbon을 하나 보유하여 1쌍의 enantiomer가 존재하고 *R*-isomer가 *S*-isomer에 비하여 보다 활성이 강한 것으로 알려져 있으나 잔류분석에서 일상적으로 분석하는 HPLC나 GLC 조건에서는 분리되지 않는다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 5.45로 알려진 비극성의 중성화합물이며 휘발성이 낮고 분자 내에 benzoxazole기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetonitrile을 사용한 검체 추출, 농축한 추출액의 비극성 용매 분배에 의한 조정제(組精製), 분배크로마토그래피를 이용한 유지 및 비극성 불순물의 제거, 그리고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 10분간 습윤화 과정을 수행함으로써 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시킨다. 추출액은 감압농축하여 추출용매인 acetonitrile을 증발, 제거시키는데 이 과정에서 돌비 (突沸, bumping) 현상이 일어날 수 있으므로 splash protector를 플라스크에 추가로 부착하고 진공도를 세심하게 조절한다. 분배과정은 농축 수용액에 NaCl 수용액을 첨가하여 이온강도를 증대시키고 수용액 층으로부터 대상성분을 ethyl acetate로 2회 분배하는 과정으로 수행하는데 대상성분의 95% 이상이 확실하게 회수된다.

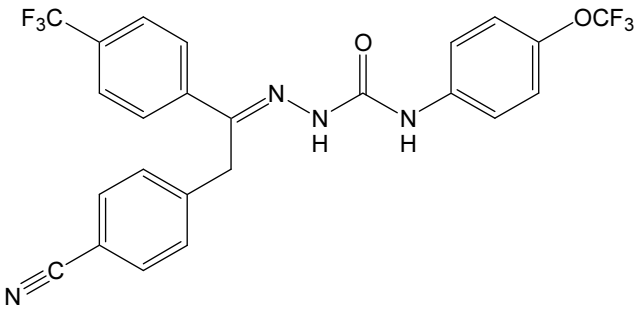
- 분배 추출물 중에는 현미 등 곡류에 함유된 유지 성분이 함께 포함되어 있으므로 이를 제거하기 위하여 고상추출용 C_{18} 카트리지를 이용한 분배크로마토그래피를 수행한다. Metamifop는 log P_{ow}가 5.45인 비극성 화합물이므로 물에 대한 용해도가 매우 낮아 100% 수용액으로는 검체용액을 조제할 수 없다. 따라서 분배 추출물을 acetonitrile/water (50/50, v/v) 혼합액에 재용해한다. C_{18} 카트리지 상에서 대상성분은 먼저 용출시켜 받고, 유지 성분을 카트리지에 남기게 되는데 대상성분과 유지 성분사이의 용출속도 차이가 크지 않으므로 카트리지 및 용출용매의 재현성 관리에 세심한 주의가 필요하다. 유지 등 비극성 불순물의 상당량이 C_{18} 분배크로마토그래피에 의하여 제거되었고 metamifop는 Florisil 흡착크로마토그래피에서 빠르게 용출되므로 극성 불순물을 비교적 용이하게 제거, 최종 정제과정을 수행할 수 있다.

- HPLC 분석 시에는 metamifop의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화하며 늦게 용출되는 불순물을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다. 재확인을 위한 LC-MS에서 metamifop는 비극성의 화합물이고 분자 내에 lone pair를 갖고 있는 질소 및 산소원자가 다수 존재하므로 protonation이 용이하여 이온화법으로는 APCI, positive-ion mode를 사용한다. 분자 내에 염소 원자를 한개 함유하고 있으므로 ^{35}Cl과 ^{37}Cl의 동위원소 존재비에 따른 $[M+H]^+$ (m/z=441)와 $[M+H+2]^+$ (m/z=443)의 비가 100:32로 나타나므로 정확한 정성이 가능하다.

8.4.92 잔류농약 분석법 4.1.4.123

메타플루미존(Metaflumizone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metaflumizone

화학명 (IUPAC) : (*E,Z*)-2'-[2-(4-cyanophenyl)-1-(α, α, α-trifluoro-*m*-tolyl)ethylidene]-4-(trifluoromethoxy)carbanilohydrazide

분자식 : $C_{24}H_{16}F_6N_4O_2$

평균분자량 : 506.4

질량분석 시의 M+질량 : 506.1

조성 : ≥90% (*E*)-isomer와 ≤10% (*Z*)-isomer의 혼합물

Log P_{ow} : 5.1 (*E*)-isomer, 4.4 (*Z*)-isomer

물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 1.07×10^{-3} (*E*)-isomer, 1.87×10^{-3} (*Z*)-isomer

증기압 (mPa, 20℃) : 7.94×10^{-7} (*E*)-isomer, 2.42×10^{-4} (*Z*)-isomer

pKa : 비해리성

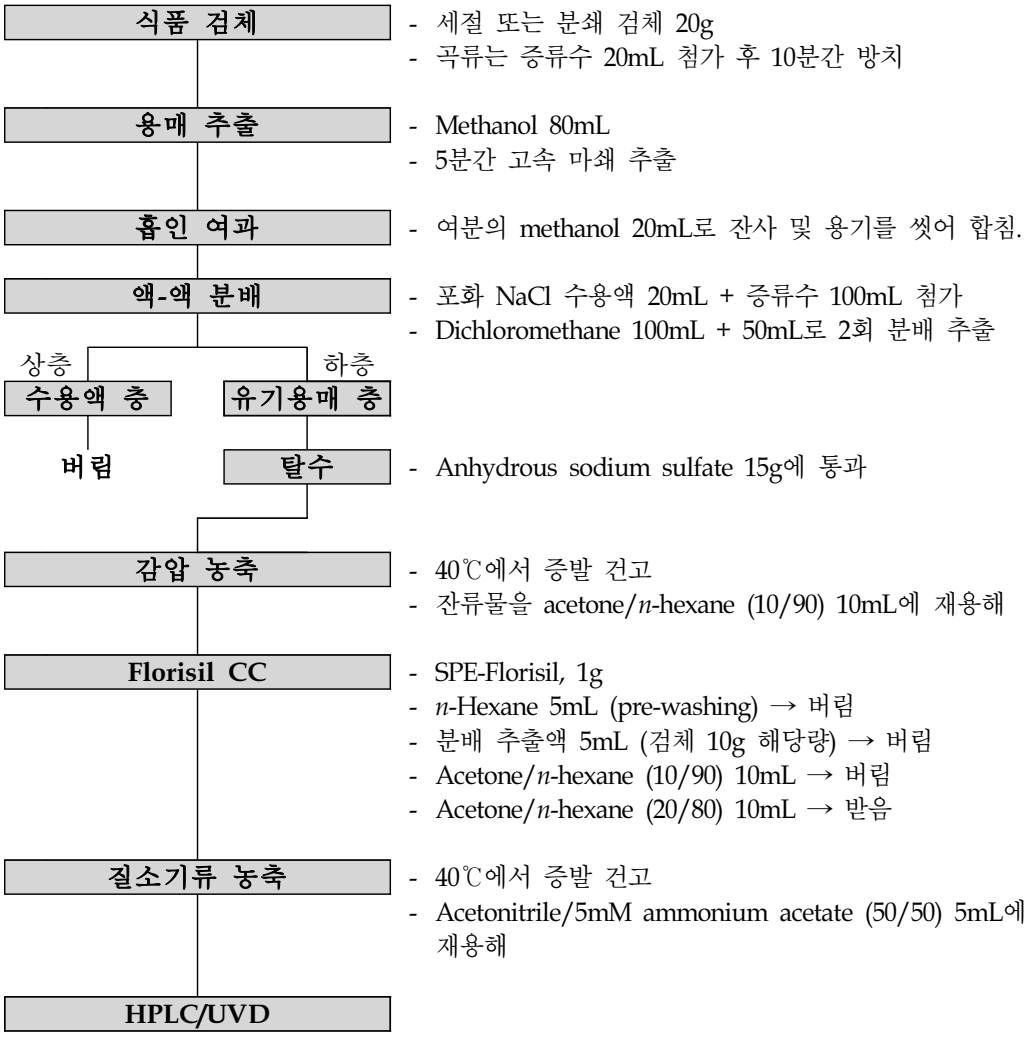
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metaflumizone	0.12	0.1	0.5~1.0	0.5~3.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 methanol을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/5 mM ammonium acetate (70/30, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 280 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

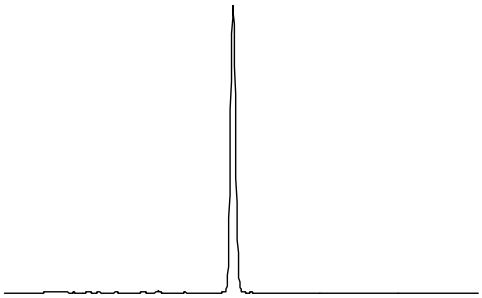


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
metaflumizone (8.2분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/5 mM ammonium acetate 수용액 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, negative-ion mode
Cone voltage : -109 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 300~700

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Metaflumizone	4.5	506	505

6) 분석법 해설

- Metaflumizone은 해충의 신경 자극전달 과정 중 sodium channel blocker로서 작용하는 semicarbazone계 살충제로서 합성 pyrethroid계 살충제 등의 기존 살충제와는 다른 작용기작을 나타낸다. 따라서 기존 살충제에 저항성을 나타내는 해충에 대한 효과가 우수하며 채소 및 과실 재배 시에 주로 사용된다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다. Metaflumizone은 분자 내에 비대칭 이중결합에 의한 *cis-trans* isomerism이 있어 *E, Z*-이성질체의 혼합물이다. 이중 *E*-이성질체의 함량이 90% 이상 (원제 중 통상 94.5% 이상)이므로 주로 *E*-이성질체에 의하여 잔류량이 좌우된다.

- 대상성분은 두 이성질체의 log P_{ow}가 4.4~5.1 범위로 알려진 비극성의 중성화합물이며 휘발성이 매우 낮고 분자 내에 imine이나 amide기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, methanol을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 검체 추출용매는 대상성분의 비극성 정도가 큼에도 불구하고 통상 사용하는 acetone이나 acetonitrile 보다는 methanol을 사용한다. 그 이유는 대상성분의 methanol에 대한 용해도가 14.1 g/L로 충분하므로 가급적 비극성 불순물의 추출량을 줄여 정제과정을 간편화하기 위함이다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다.

- 추출용매로 methanol을 사용하여 비극성 불순물의 양을 줄였으므로 Florisil 흡착크로마토그래피는 간편하게 수행하는데 먼저 고상추출용 카트리지의 흡착제 양이 제한적임을 고려, overloading을 방지하기 위하여 검체 추출물의 양을 1/2로 줄인다. Florisil

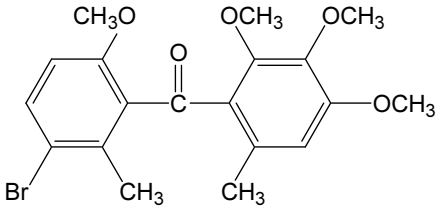
흡착크로마토그래피에서 metaflumizone은 분자 내 -NH기의 존재로 인하여 log P_{ow} 값으로부터 예상되는 극성에 비하여 느리게 용출되므로 검체 중 불순물을 효과적으로 제거할 수 있다.

- HPLC 분석에서 metaflumizone의 최대흡광파장은 280 nm의 비교적 장파장이므로 기기분석의 선택성은 우수한 편이다. Metaflumizone 분자 내의 -NH기 해리 정도는 미약하므로 pH 조절 없이 이동상 중 약간의 염농도 증대만으로도 충분한 이온억압이 가능하며 대칭성이 우수한 peak로 관찰된다. LC-MS에서의 이온화는 -NH기에서 proton 이탈성을 감안하여 ESI, negative-ion mode를 사용하며, HPLC에서와 마찬가지로 이온억압을 위하여 휘발성 염인 ammonium acetate를 이동상에 소량 혼합하여 사용한다.

8.4.93 잔류농약 분석법 4.1.4.124

메트라페논(Metrafenone)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : metrafenone
화학명 (IUPAC) : 3'-bromo-2,3,4,6'-tetramethoxy-2',6-dimethylbenzophenone
분자식 : $C_{19}H_{21}BrO_5$
평균분자량 : 409.3
질량분석 시의 M+질량 : 408.1
Log P_{ow} : 4.3 (pH 4, 25℃)
물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 0.552 (pH 5), 0.492 (pH 7), 0.457 (pH 9)
증기압 : 1.53×10^{-1} mPa (20℃)
pKa : 비해리성

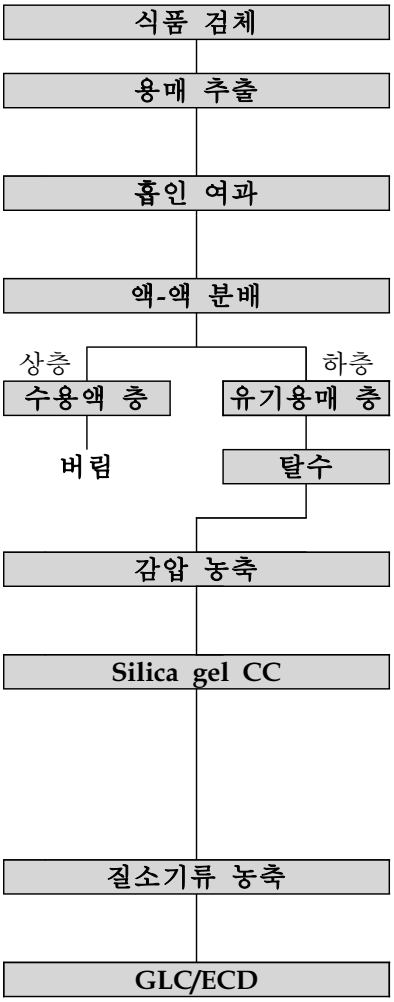
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Metrafenone	0.25	-	5.0	0.5~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 50g
- Acetone 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해
- SPE-silica, 1g
- *n*-Hexane 10mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 50g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 10mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (15/85) 10mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- Acetone 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 230℃

주입부 온도 : 260℃
검출기 온도 : 300℃
캐리어가스 및 유량 : nitrogen, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

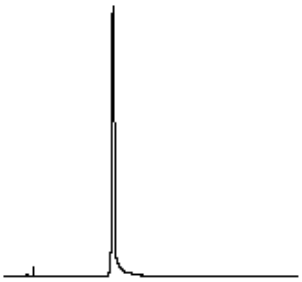


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
metrafenone (5.4분) 2 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 mm, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 280℃로 상승 시킨 후 2 분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Metrafenone	5.4	408	395, 379

6) 분석법 해설

- Metrafenone은 주로 채소 및 과실 재배 시에 발생하는 흰가루병 등에 예방 및 치료 효과를 함께 나타내는 benzophenone계 살균제이다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 4.3인 비극성의 중성화합물이며 증기압이 1.53×10^{-1} mPa로 어느 정도의 휘발성이 있고 분자 내에 열에 취약하거나 극성이 높아 흡착을 유발할 작용기가 없으므로 GLC를 이용하여 분석한다. 검출기로는 분자 내에 bromine 원자를 1개 함유하고 있으므로 ECD를 사용한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (**組精製**), 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

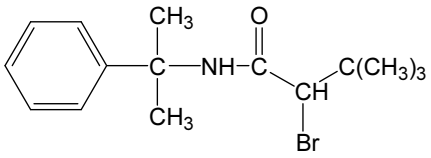
- 검체는 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetone으로 추출하는데 대상 검체가 채소 또는 과실의 비유지 검체이므로 색소외의 불순물의 양은 그다지 많지 않다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. Silica gel 흡착크로마토그래피는 고상추출용 카트리지를 사용, ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액의 용출체계로 간편하게 수행한다. Silica gel 카트리지는 흡착력의 항상성을 관리하기 위하여 동일한 제조번호의 것을 사용하며, 공기 중 수분에 의하여 그 흡착력이 민감하게 변화하므로 개봉 후에는 즉시 사용하고 장기간 보관하지 않는다.

- GLC 분석 시에 metrafenone은 ECD에 대한 감도가 우수한 편이며, DB-5 column 상에서 비교적 긴 머무름 시간을 나타내므로 불순물에 의한 간섭은 거의 없어 비교적 용이하게 분석을 수행할 수 있다. GC-MS에서 분자이온의 강도는 그다지 크지 않으므로 base fragment (*m/z*=395)를 기준으로 SIM을 수행하는데 bromine의 동위원소 ^{79}Br과 ^{81}Br의 존재비인 100:97에 따라 *m/z*=397의 fragment를 추가적 정성이온으로 유용하게 이용할 수 있다.

8.4.94 잔류농약 분석법 4.1.4.125

브로모뷰타이드(Bromobutide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : bromobutide
화학명 (IUPAC) : 2-bromo-3,3-dimethyl-*N*-(1-methyl-1-phenylethyl)butyramide
분자식 : $C_{15}H_{22}BrNO$
평균분자량 : 312.3
질량분석 시의 M+질량 : 311.1
Log P_{ow} : 3.48
물에 대한 용해도 : 3.54 mg/L (25℃)
증기압 : 74 mPa (25℃)
pKa : 비해리성

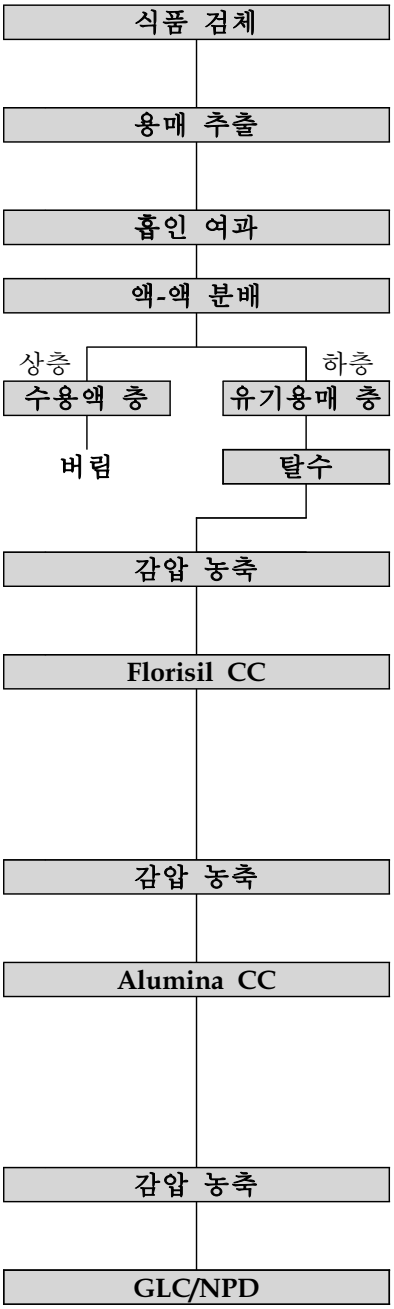
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Bromobutide	-	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 Florisil 및 alumina column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 곡류 검체 20g
- 증류수 20mL 첨가 후 10분간 방치

- Acetone 100mL + Celite 545 5g
- 2분간 고속 마쇄 추출

- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 100mL 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해

- Florisil (60~100mesh), 5g (내경 11mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 20g 해당량) → 버림
- $CH_2Cl_2/CH_3CN/n$-hexane (50/0.35/49.65) 50mL → 버림
- $CH_2Cl_2/CH_3CN/n$-hexane (50/5/45) 50mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해

- Alumina (70~230mesh), 5g (내경 11mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- Florisil CC 용출액 10mL (검체 20g 해당량) → 버림
- CH_2Cl_2/n-hexane (20/80) 50mL → 버림
- $CH_2Cl_2/CH_3CN/n$-hexane (50/1.5/48.5) 70mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- Acetone 4mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 220℃
주입부 온도 : 220℃
검출기 온도 : 310℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

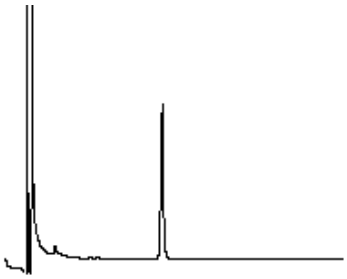


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
bromobutide (4.0분) 2 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 280℃로 상승 시킨 후
2 분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 100~350

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Bromobutide	19.4	311	119, 232

6) 분석법 해설

- Bromobutide는 벼 재배 시에 발생하는 같은 화본과인 피와 sulfonylurea계 제초제에 저항성인 잡초에 대하여 강한 제초활성을 나타내는 특징이 있어 논농사에서 다른 제초제와 혼합제의 형태로 제조, 사용되는 선택성 제초제이다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 3.48인 비극성의 중성화합물이며 증기압이 74 mPa (25℃)로 휘발성이 높으므로 GLC를 이용하여 분석한다. 검출기로는 분자 내에 질소 원자를 1개 함유하고 있으므로 NPD를 사용한다. Bromobutide는 분자 내에 chiral carbon을 1개 갖고 있어 1쌍의 enantiomer가 존재하나 통상적인 GLC 조건에서는 분리되지 않는다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 Florisil 및 alumina 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 검체는 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetone으로 추출하는데 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 10분간 습윤화 과정을 수행함으로써 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시킨다. 신속한 여과를 위하여 여과보조제를 추출용매와 함께 첨가하는데 일정한 여과 속도가 얻어질 경우에는 여과보조제 첨가를 생략할 수 있다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 1회 분배로 95% 이상이 회수된다.

- Florisil 흡착크로마토그래피에서 bromobutide는 분자내의 amide기로 인하여 log P_{ow} 값으로부터 예상되는 극성 정도 보다 느리게 용출되므로 용출강도가 강한 용매를 사용함에 따라 검체로부터 함께 추출된 유지성분 등 비극성 불순물들이 함께 용출된다. 또한 분자 내에 질소 원자를 1개만 함유하고 있어 NPD에 대한 감도가 낮으므로 추출액의 고농축에 따른 간섭물질의 상대적 증가가 우려되므로 alumina 흡착크로마토그래피에 의한 추가의 정제과정이 필요하다. 유지 등 비극성 불순물을 *n*-hexane-acetonitrile

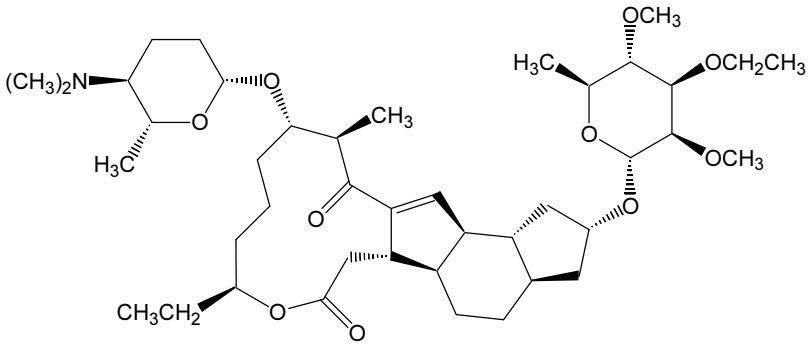
분배법을 이용, 흡착크로마토그래피에 앞서 미리 제거할 경우에는 후자의 alumina 흡착크로마토그래피를 생략할 수 있다.

- Bromobutide는 분자 내에 bromine 원자를 함유하고 있으므로 ECD로도 분석이 가능하다. 분자 내에 열에 다소 취약한 amide기를 함유하고 있으므로 정성/정량에 문제가 없는 한도 내에서 머무름 시간을 비교적 짧게 설정하는 것이 재현성을 향상시키는데 유리하다. 또한 내경 0.53 mm의 분리용 column을 사용, 직접 검체주입법 및 등온조건으로 분석하는 것이 splitless/승온조건 보다 분리능은 열등하나 재현성 측면에서 유리하다. GC-MS에서 분자이온은 강도는 낮으므로 SIM용 이온으로는 base peak를 나타내는 주 fragment를 이용한다. 이온화에 따른 분자 내 결합의 개열은 bromine 결합에서 일어나 m/z=232의 fragment ion이 관찰된다.

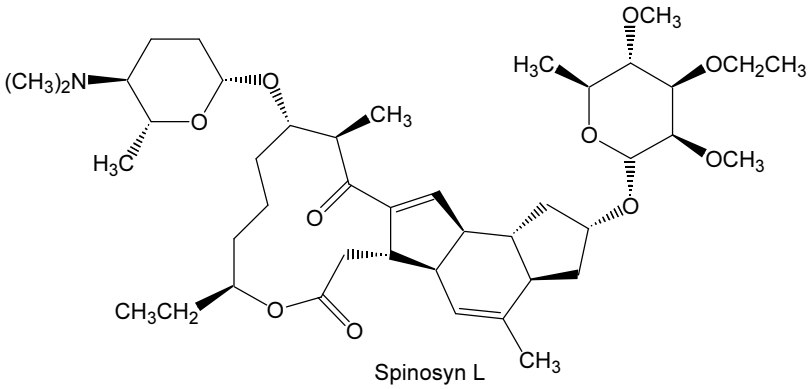
8.4.95 잔류농약 분석법 4.1.4.126

스피네토람(Spinetoram)

1) 대상 농약의 특성



Spinosyn J



Spinosyn L

일반명 (ISO) : spinetoram

화학명 (IUPAC) : mixture of 50~90% (2*R*,3*aR*,5*aR*,5*bS*,9*S*,13*S*,14*R*,16*aS*,16*bR*)-2-(6-deoxy-3-*O*-ethyl-2,4-di-*O*-methyl-α-L-mannopyranosyloxy)-13-[(2*R*,5*S*,6*R*)-5-(dimethylamino)tetrahydro-6-methylpyran-2-yloxy]-9-ethyl-2,3,3*a*,4,5,5*a*,5*b*,6,9,10,11,12,13,14,16*a*,16*b*-hexadecahydro-14-methyl-1*H*-*as*-indaceno[3,2-*d*]oxacyclododecine-7,15-dione and 50-10% (2*R*,3*aR*,5*aS*,5*bS*,9*S*,13*S*,14*R*,16*aS*,16*bS*)-2-(6-deoxy-3-*O*-ethyl-2,4-di-*O*-methyl-α-L-mannopyranosyloxy)-13-[(2*R*,5*S*,6*R*)-5-(dimethylamino)tetrahydro-6-methylpyran-2-yloxy]-9-ethyl-

2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,9,10,11,12,13,14,16*a*,16*b*-tetradecahydro-4,14-dimethyl-1*H*-*as*-indaceno[3,2-*d*]oxacyclododecine-7,15-dione

조성 : spinosyn J (50~90%)와 spinosyn L (50~10%)의 혼합물

분자식 : $C_{42}H_{69}NO_{10}$ (spinosyn J), $C_{43}H_{69}NO_{10}$ (spinosyn L)

평균분자량 : 748.0 (spinosyn J), 760.0 (spinosyn L)

질량분석 시의 M+질량 : 747.5 (spinosyn J), 759.5 (spinosyn L)

Log P_{ow} : 2.44 (pH 5), 4.09 (pH 7), 4.22 (pH 9) (20℃) (spinosyn J)
2.94 (pH 5), 4.49 (pH 7), 4.82 (pH 9) (20℃) (spinosyn L)

물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 423 (pH 5), 11.3 (pH 7), 6.27 (pH 10) (spinosyn J), 1630 (pH 5), 46.7 (pH 7), 0.706 (pH 10) (spinosyn L)

증기압 (20℃) : 5.3×10^{-2} mPa (spinosyn J); 2.1×10^{-2} mPa (spinosyn L)

pKa (25℃) : 7.86 (spinosyn J), 7.59 (spinosyns L)

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Spinetoram	-	-	0.1~0.5	0.05~2.0	-	-	-

2) 분석법 개요

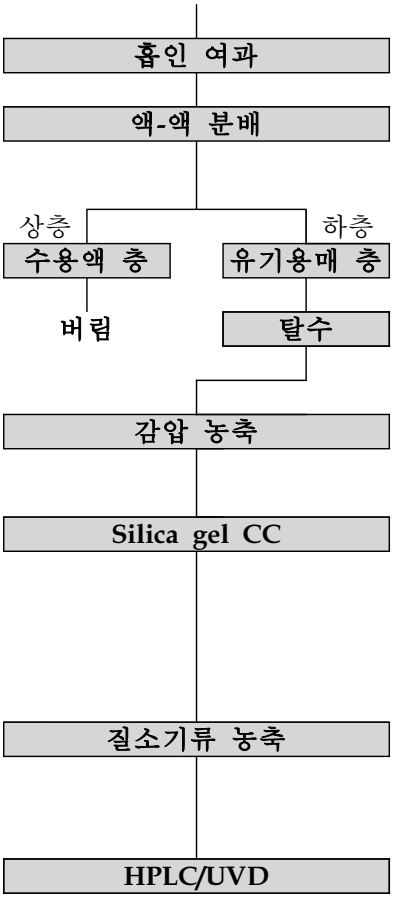
세절 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 pH를 조절하여 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정

식품 검체 - 세절 검체 30g

↓

용매 추출 - Acetone 100mL + Celite 545 5g
- 5분간 고속 마쇄 추출



- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- 1N NaOH 수용액을 첨가, pH 5.5~6.6으로 조절
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해
- SPE-silica, 1g
- *n*-Hexane 10mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 30g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 25mL → 버림
- Acetone 40mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/methanol/1% ammonium acetate 수용액 (45/45/10) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/methanol/1% ammonium acetate (45/45/10, v/v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 246 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

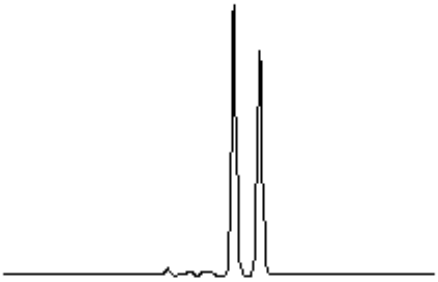


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
spinetoram J형 (8.0분), spinetoram L형 (8.9분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/methanol/1% ammonium acetate (45/45/10, v/v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 137 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 500~900

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Spinetoram	5.6	748	749
	6.5	760	761

6) 분석법 해설

- Spinetoram은 방선균의 일종인 *Saccharopolyspora spinosa*의 배양액으로부터 추출된 천연 살충성분 spinosyn계통 화합물의 일부 화학구조를 변개 (變改)하여 상용화된 살

충제이다. 작용기작은 spinosad와 유사하게 해충 내의 신경자극 전달체계 중 nicotinic acetylcholine receptor를 활성화하여 정상적 자극전달을 저해한다. 수용체 저해지점이 neonicotinoid계 살충제와는 별개의 생화학적 지점이므로 특히 neonicotinoid계 살충제에 저항성인 해충에 대한 효과가 뛰어난 장점을 가지고 있다. 화학적 변개는 분자 내 당 부분 (rhamnose)의 ethylation과 tetracyclic 구조의 hydrogenation으로 전자는 spinosad에 대비하여 살충력을 향상시키며 후자는 spinosyn의 최대 약점인 잔효성을 증대시키기 위한 것으로 알려져 있다. 비침투성의 접촉/식독제로서 주로 채소 및 과실류의 해충 방제에 사용되며 잔효성이 비교적 짧으므로 잔류성 측면에서 유리한 농약이다.

- 잔류허용기준은 0.05~2.0 mg/kg으로 보편적 농약 수준이나 분자량이 748~760으로 타 농약에 비하여 2배 정도 크므로 상대적으로 고감도 분석법이 요구된다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정되나 유효성분이 spinosyn J (50~90%)와 L (50~10%)의 혼합물로 구성되어 있으므로 분석성분은 2개 성분이다.

- Spinetoram은 분자구조 내 당 부분에 결합되어 있는 dimethylamine으로 인하여 약하게 해리하는 약염기성 화합물이다. 분자량이 크고 휘발성이 낮으며 해리성 화합물이므로 기기분석에는 HPLC를 이용한다. 자외선 영역 246 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다. 이동상은 이온억압조건으로 사용하는데 spinetoram 짝산의 pKa가 7.6~7.9 범위이므로 이동상의 pH를 7.0 정도로 설정하고 염농도를 첨가, 이온강도를 높이면 sharp한 대칭형 peak를 얻을 수 있다.

- 검체 추출에는 비해리 화합물에 보편적으로 사용하는 용매인 acetone을 사용한다. 대상 검체는 채소 및 과실류이므로 습윤화 과정은 불필요하다. 대상 화합물은 해리하는 특성을 가지고 있으나 dimethylamine기가 분자 중에서 차지하는 비율이 상대적으로 작아 log P_{ow} 값이 2.4~4.5 (pH 5~7)를 나타내므로 acetone으로 충분히 추출된다. 신속한 여과를 위하여 여과보조제를 추출용매와 함께 첨가하는데 일정한 여과 속도가 얻어질 경우에는 여과보조제 첨가를 생략할 수 있다.

- 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 pH를 5.5~6.6으로 조절하고 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 조절한 pH 범위에서 대상성분 중 dimethylamine기는 90% 이상 protonation된 상태이나 log P_{ow} 값은 최소 2.5 이상으로 예상되므로 분배 효율 상 문제는 없다.

- 추가 정제법으로는 고상추출용 silica 카트리지를 사용한 흡착크로마토그래피법을 이용한다. Spinetoram는 약염기성이므로 silica 표면의 hydroxyl 활성기와 강하게 흡착, log P_{ow} 값으로부터 예상되는 용출강도보다 극성이 큰 용매를 흘려보내야 비로소 용출시킬 수 있다. 따라서 대부분의 비극성 간섭물질을 먼저 용출시켜 효과적으로 제거할 수 있다.

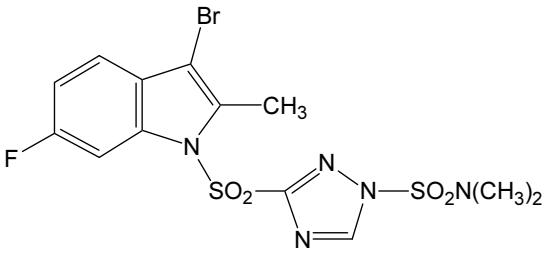
- Spinetoram은 화합물의 안정성이 떨어져 분석 중에 분해될 가능성이 높다. 특히 광분해가 심하므로 필요할 경우 실험실 조명조차도 일부 변경하여야 하며 분석 과정은 가급적 신속히 수행한다.

- LC-MS에서의 이온화는 dimethylamine기에서의 protonation의 용이성을 감안하여 ESI, positive-ion mode가 최선이다. HPLC에서와 마찬가지로 이온억압을 위하여 휘발성 염인 ammonium acetate를 이동상에 소량 혼합하여 사용한다.

8.4.96 잔류농약 분석법 4.1.4.127

아미설브롬(Amisulbrom)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : amisulbrom
화학명 (IUPAC) : 3-(3-bromo-6-fluoro-2-methylindol-1-ylsulfonyl)-*N,N*-dimethyl-1*H*-1,2,4-triazole-1-sulfonamide
분자식 : $C_{13}H_{13}BrFN_5O_4S_2$
평균분자량 : 466.3
질량분석 시의 M+질량 : 465.0
Log P_{ow} : 4.4
물에 대한 용해도 : 0.11 mg/L (20℃, pH 6.9)
증기압 : 1.8×10^{-5} mPa (25℃)
pKa : 비해리성

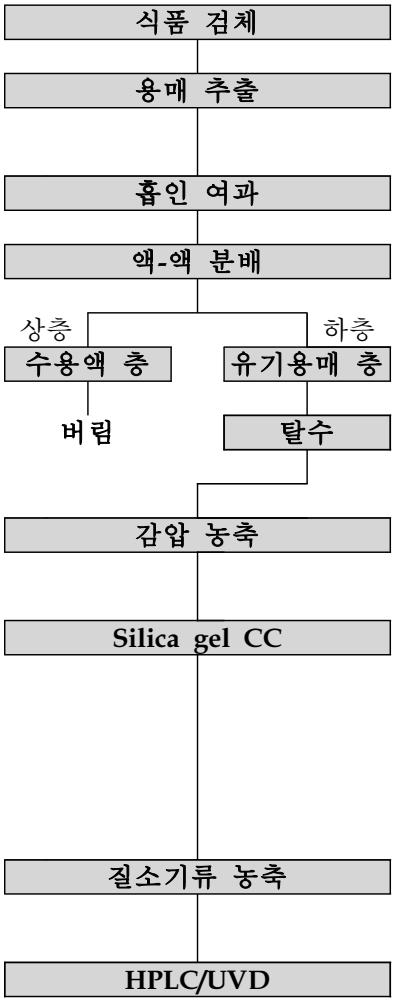
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Amisulbrom	-	-	3.0	0.2~1.0	-	-	0.05

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetonitrile/증류수 혼합액을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 20g
- Acetonitrile/water (80/20) 80mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetonitrile 20mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 20mL + 증류수 100mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 5mL에 재용해
- SPE-silica, 1g
- *n*-Hexane 5mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 20g 해당량) → 버림
- *n*-Hexane 5mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (5/95) 10mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 20mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (70/30) 2mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)

이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 255 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

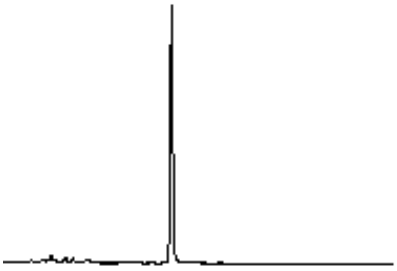


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
amisulbrom (8.6분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (70/30, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 83 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Amisulbrom	5.4	465	466

6) 분석법 해설

- Amisulbrom은 채소와 서류에 주로 사용하는 예방용 살균제로서 병원균의 호흡과정 중 전자전달계의 ubiquinone reductase를 저해하는 작용기작을 나타낸다. 접촉독제로서 단제나 치료용 살균제와의 혼합제 형태로 제조, 전면 살포용으로 사용된다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 4.4로 알려진 비극성의 중성화합물이며 휘발성이 낮고 분자 내에 sulfonamide기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다. 자외선 영역 255 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetonitrile을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

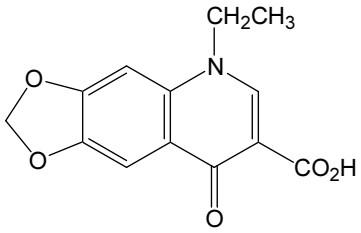
- 검체는 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetonitrile로 추출하는데 추출용매에 소량의 물을 첨가, 극성을 높여 비극성 간섭물질의 추출을 최소화한다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 대부분의 검체는 비유지 검체인 채소류이므로 추출물의 양은 그다지 많지 않다. Silica gel 흡착크로마토그래피는 고상추출용 카트리지를 사용, ethyl acetate/*n*-hexane 혼합액의 용출체계로 간편하게 수행한다. Silica gel 카트리지는 흡착력의 항상성을 관리하기 위하여 동일한 제조번호의 것을 사용하며, 개봉 후에는 즉시 사용하고 장기간 보관하지 않는다.

- HPLC 분석 시에는 amisulbrom의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화하며 늦게 용출되는 불순물을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다. 재확인을 위한 LC-MS에서 amisulbrom은 분자 내에 lone pair를 갖고 있는 질소 원자가 다수 존재하므로 protonation이 용이하여 이온화법으로는 ESI, positive-ion mode를 사용한다. 분자 내에 bromine 원자를 한개 함유하고 있으므로 ^{79}Br과 ^{81}Br의 동위원소 존재비 100:97이 $[M+H]^+$ (m/z=466)와 $[M+H+2]^+$ (m/z=468)의 비에 반영되므로 정확한 정성이 가능하다.

8.4.97 잔류농약 분석법 4.1.4.128

옥솔린산(Oxolinic acid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : oxolinic acid
화학명 (IUPAC) : 5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo[1,3]dioxolo[4,5-*g*]quinoline-7-carboxylic acid
분자식 : $C_{13}H_{11}NO_5$
평균분자량 : 261.2
질량분석 시의 M+질량 : 261.1
Log P_{ow} : 0.47 (예측치)
물에 대한 용해도 : 3.2 mg/L (25℃)
증기압 : 〈0.147 mPa (100℃)

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

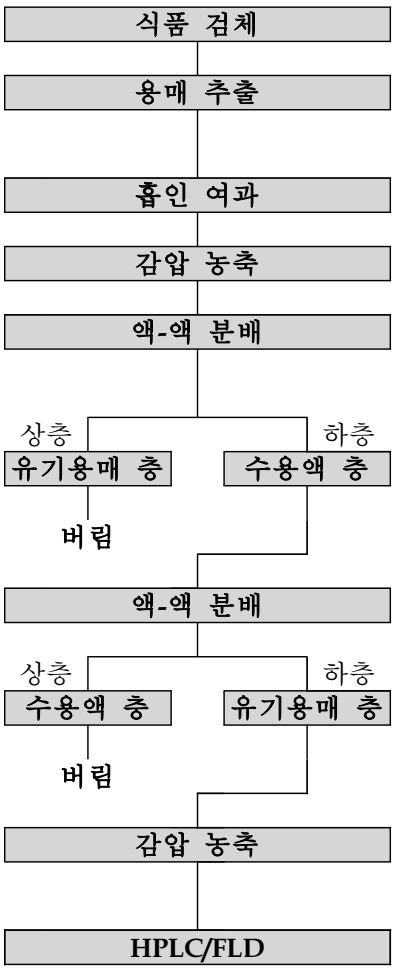
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Oxolinic acid	0.036	0.05	-	0.05~3.0	-	-	-

2) 분석법 개요

분쇄 또는 세절 검체를 methanol/염산 혼합액을 가하여 산성조건에서 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 methanol을 날려 보내고 농축액의 산도를 약알칼리성으로 조절한 후 분액여두에 옮겨 *n*-hexane으로 분배, 세정한다. 수용액 층의

산도를 산성으로 조절한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하여 HPLC/FLD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 곡류 10g 또는 세절 채소류 20g
- Methanol/1N HCl 수용액 (90/10) 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 methanol 20mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 40℃에서 methanol을 날려 보냄.
- 2% K_2HPO_4 수용액 40mL를 첨가
- 5N 및 1N NaOH 수용액을 첨가, pH 7.5~8.0으로 조절
- *n*-Hexane 50mL 분배 추출
- 6N 및 1N HCl 수용액을 첨가, pH 2.5로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- 40℃에서 증발 건고
- Methanol/0.1% HCOOH (40/60) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 형광검출기 (FLD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 40℃
이동상 : methanol/0.1% formic acid (40/60, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : Ex 330 nm, Em 365 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

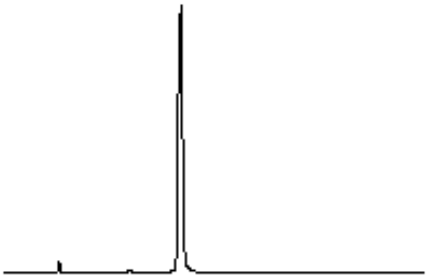


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
oxolinic acid (8.3분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : methanol/0.1% formic acid (40/60, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 80 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~400

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Oxolinic acid	5.4	261	262

6) 분석법 해설

- Oxolinic acid는 인간의 요도관 감염치료용 의약품으로도 사용되는 quinolone계 항생제로서 세균의 세포분열 과정 중 DNA gyrase를 저해하여 약효를 나타내는 세균병 전문약제 (bactericide)이다. 기존 항생제에 저항성인 세균병에 대한 약효가 우수하여 벼의 종자소독용이나 채소 병해의 전면살포용으로 사용된다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- Oxolinic acid는 약산성 화합물이므로 극성이 높아 GLC로는 직접 분석하기 어려우므로 HPLC를 이용하여 분석한다. 검출기로는 대상 화합물이 형광성을 나타내므로 선택성이 우수한 형광검출기를 사용한다.

- 검체 추출은 약산성 화합물을 추출하는 일반적 방법을 사용한다. 즉, 산을 가하여 이온화를 억압, 중성 형태를 비극성 유기용매로 추출하는 방법과 염기를 가하여 해리를 유발하고 생성된 음이온 형태를 극성 추출용매로 추출하는 방법이 있는데 본 분석법에서는 전자의 방법을 이용한다. 곡류 및 채소 검체에 염산 수용액을 가하여 산성 조건과 습윤화를 동시에 수행한 후 methanol로 추출한다. Methanol 추출액은 감압 농축할 때에 돌비 (突沸, bumping) 현상이 일어나기 쉬우므로 splash protector를 플라스크에 부착하고 진공도를 세심하게 조절한다.

- Carboxylic acid의 산도를 감안할 때 oxolinic acid의 pKa는 4~5로 예상되므로 추출액의 정제는 oxolinic acid의 해리성을 이용하여 ion-associated partition을 적용한다. 즉, 농축 추출액의 pH를 약알칼리성으로 조절하면 oxolinic acid는 해리하여 이온 형태로 수용성을 나타내므로 *n*-hexane과 같은 유기용매로 분배 추출하더라도 여전히 수용액층에 존재한다. 이러한 hexane 세정에 의하여 비극성의 불순물을 제거한다. 남은 수용액 층에 산을 가하여 산성으로 조절하면 oxolinic acid는 해리가 억압, 유기용매 가용성인 중성의 화합물 형태가 되므로 dichloromethane 층으로 분배 추출되며 수용성 불순물이 제거된다. 이러한 해리 특성을 이용한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이어서 흡착크로마토그래피와 같은 별도의 정제법을 추가하지 않더라도 기기분석이 가능하다.

- Dichloromethane 분배 추출액은 anhydrous sodium sulfate에 의한 탈수과정을 수행하지 않는다. 그 이유는 anhydrous sodium sulfate는 일부 시약에서 규격과는 달리 액성이 약알칼리성인 경우가 있는데 대상성분은 약산성 화합물이므로 알칼리성에서는 해리, 염의 형태로 sodium sulfate에 포집되어 회수율이 심하게 저하될 수 있기 때문이

다. 따라서 분배 과정 중 진탕 후 충분한 시간동안 방치하여 층 분리를 명확히 하고, 수용액이 혼입되지 않도록 층 분리를 보다 세심하게 수행하여야 한다.

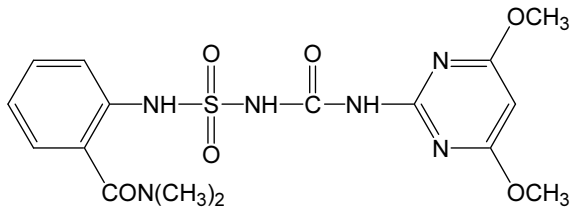
- HPLC 분석 시에 이동상은 oxolinic acid의 이온화를 억압하기 위하여 pH 약 2.5인 0.1% formic acid 수용액을 혼합하여 사용한다. 형광검출기는 자외부흡광검출기에 비하여 선택성이 우수하므로 흡착크로마토그래피 등 추가의 정제과정이 없어도 간섭물질의 혼입 가능성이 낮아 비교적 용이하게 기기분석을 수행할 수 있다.

- 재확인을 위한 LC-MS에서 oxolinic acid의 이온화법으로 ESI, positive-ion mode를 제시하였으나 추가하여 ESI, negative-ion mode도 이용할 수 있다. 즉, 분자 내 carboxylic acid의 proton은 용이하게 해리되어 deprotonation되므로 생성되는 이온은 대부분 $[M-H]^-$로 나타나게 된다.

8.4.98 잔류농약 분석법 4.1.4.129

올소설파뮤론(Orthosulfamuron)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : orthosulfamuron
화학명 (IUPAC) : 1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[2-(dimethylcarbamoyl)-phenylsulfamoyl]urea
분자식 : $C_{16}H_{20}N_6O_6S$
평균분자량 : 424.4
질량분석 시의 M+질량 : 424.1
Log P_{ow} : 2.02 (pH 4), 1.31 (pH 7), 〈0.3 (pH 9)
물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 26.2 (pH 4), 629 (pH 7), 38900 (pH 8.5)
증기압 : $\leq 1.116 \times 10^{-1}$ mPa (20℃)
pKa : -

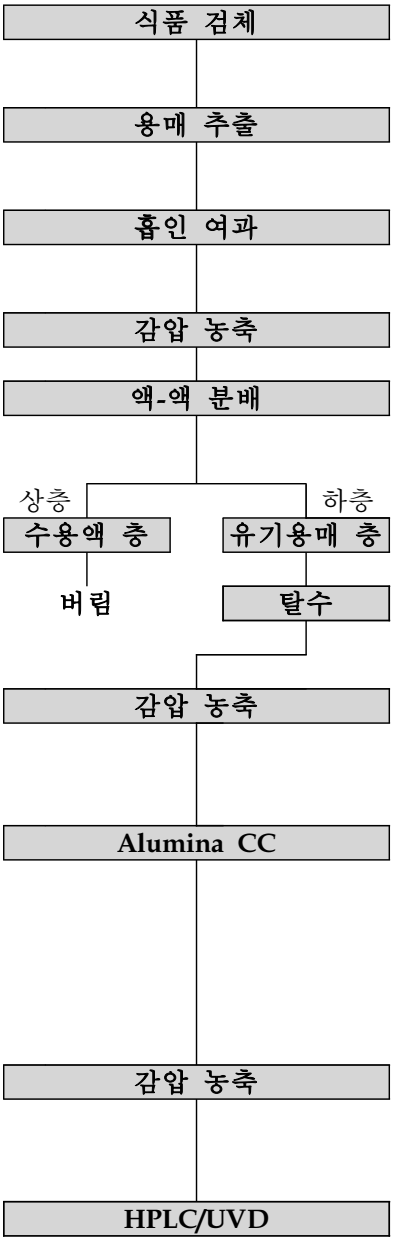
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Orthosulfamuron	0.05	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetonitrile을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 분액여두에 옮겨 농축액의 산도를 산성으로 조절한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 alumina column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 검체 20g
- 증류수 40mL를 첨가하여 2시간 동안 방치

- Acetonitrile 100mL
- 30분간 진탕 추출

- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 acetonitrile 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 40℃에서 acetonitrile을 날려 보냄.

- 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- 3N HCl 수용액 5mL을 가하여 pH 2 이하로 조절
- Dichloromethane 100mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 methanol/dichloromethane (5/95) 10mL에 재용해

- Alumina (70~230mesh), 5g (내경 11mm 유리관 사용)
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 20g 해당량) → 버림
- Methanol/dichloromethane (5/95) 100mL → 버림
- Methanol/dichloromethane/acetic acid (5/94/1) 100mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/인산 수용액 (pH 2.5로 조절) (20/80) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/20 mM phosphate buffer (pH 2.5) (20/80, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 235 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

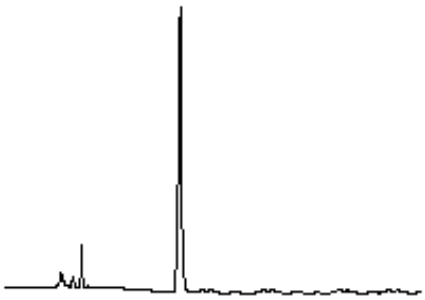


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
orthosulfamuron (9.7분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/0.2% formic acid 수용액 (10/90, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 89 V
Capillary temp. : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 200~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Orthosulfamuron	5.4	424	425

6) 분석법 해설

- Orthosulfamuron은 cyclosulfamuron과 유사한 sulfonylurea계 제초제로서 식물의 필수 아미노산인 valine 및 isoleucine 등의 생합성에 관여하는 acetolacetate synthase (ALS)나 acetohydroxyacid synthase (AHAS)를 저해함으로써 고활성의 제초작용을 나타내는 발아후 처리용 선택성 제초제이다. 주로 벼를 위한 곡류 재배에 발생하는 초기 잡초를 방제하기 위하여 토양처리로 사용되는데, 제초활성이 높아 10a 당 유효성분 투하량이 다른 계열 제초제의 1/10이하로 수 g에 불과하다. 따라서 작물체 및 환경 중 잔류량은 살포 초기에도 매우 낮으며 전세계 및 국내에서의 잔류허용기준이 0.05 mg/kg으로 엄격하게 설정되어 있어 수확물 중 매우 낮은 잔류수준까지 분석하여야 하는 어려움이 있다. 잔류분의 정의는 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 모화합물로 한정된다.

- Orthosulfamuron은 cyclosulfamuron이나 다른 syulfonylurea계 제초제와 유사하게 분자 내의 sulfonyl group의 강한 전자끌기 특성으로 인하여 인접한 nitrogen에 결합된 hydrogen이 해리, pKa가 4~5 범위로 예상되는 약산성 화합물이다. 따라서 휘발성이 매우 낮고 극성이 높아 GLC로는 직접 분석할 수 없으므로 HPLC로 분석한다. 검출기로는 대상 화합물이 산성조건에서 최대 흡광파장이 235 nm인 강한 흡광성을 나타내므로 자외부흡광검출기를 사용한다. 대상 화합물은 수용액 중에서 해리하는 약산성의 특성을 반영하므로 유기용매 및 pH 조건을 달리한 유기용매/수용액 혼합액 중에서 최대 흡수파장을 달리하는 등 흡수스펙트럼 상에 상당한 변화를 나타낸다. 이러한 약이온성 화합물은 단순한 유기용매/물의 혼합액을 이동상으로 하여 HPLC로 분석할 경우, column 내에서 비이온/이온 형태가 혼재 또는 상호 변환되는 상태로 이동하므로 용출되는 peak의 sharpness 와 symmetry가 매우 불량해지는 경향이 있다. 따라서 완전 해리시키거나 이온억압조건 (ion-suppression)으로 설정하여 하나의 화학종 상태로 분석하여야 한다. 전자의 경우 ion-pair chromatography법이 가능하나 후자의 이온억압법에 비하여 그 mobile phase 조성이 매우 복잡하고 별도의 분석체계를 설정하여야 하는 단점이 있다. 따라서 이동상의 pH를 산성조건으로 조절, 이온억압법으로 분석하며 이때 검출파장은 산성조건에서 측정한 흡수스펙트럼으로부터 최대 흡수파장인 235 nm를 사용한다.

- HPLC 기기분석 시의 최적 이온억압조건은 pKa 값이 4~5 범위로 예상되므로, silica-based C_{18} column의 사용 pH 범위가 통상적으로 pH 2~9인 점을 감안하여 이동상의 pH를 2.5~3.0 범위에서 조절하면 충분히 이온억압된다.

- 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시키기 위하여 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 2시간 동안 습윤화 과정을 수행하고 acetonitrile으로 직접 추출한다. 대상성분은 약산성이나 pKa가 4~5 범위로 그 해리정도가 미약하여 산성화 과정을 거치지 않아도 충분히 추출된다. 신속한 여과를 위하여 여과보조제를 깔대기에 깔아 사용하는데 어느 정도의 여과 속도가 얻어질 경우에는 가급적 여과보조제를 사용하지 않는 것이 불순물을 최소화하는 측면에서 유리하다. Acetonitrile 추출액은 수분이 포함되어 있어 감압 농축할 때에 돌비 (突沸, bumping) 현상이 일어날 수 있으므로 splash protector를 플라스크에 부착하거나 진공도를 세심하게 조절한다.

- 추출액으로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위하여 액-액 분배법을 수행하는데 먼저 대상 화합물은 약산성 화합물이므로 농축 수용액 층의 pH를 약산성으로 조절하여 대상성분의 이온화를 억압, 유용성의 비해리 형태로 유지시킨다. 이 후 NaCl을 첨가하여 ionic strength를 보다 증대시킨 조건에서 dichloromethane으로 2회 분배하며 분배 효율은 95% 이상으로 우수하다. Orthosulfamuron은 산과 알칼리조건에서 쉽게 분해되므로 산성화 후에는 신속히 분배 과정을 완료하여 분해를 최소화한다.

- 추가 정제법으로는 alumina를 사용한 흡착크로마토그래피법을 이용한다. 대상성분은은 약산성이므로 alumina 표면의 hydroxyl 활성기와 강하게 흡착, log P_{ow} 값으로부터 예상되는 용출강도보다 극성이 크고 산성화된 용매를 흘려보내야 비로소 용출시킬 수 있다. 따라서 대부분의 비극성 간섭물질을 먼저 용출시켜 효과적으로 제거할 수 있어 최종 용액은 유지나 색소가 거의 없는 매우 잘 정제된 상태로 얻어진다.

- 앞서 언급한 바와 같이 orthosulfamuron은 산과 알칼리조건에서 쉽게 분해되므로 최종 용액의 산성조건에 유의하여야 한다. 최종 용액은 조제 후 가급적 즉시 분석하여야 하며 보관이 필요할 경우에는 acetonitrile만으로 재용해하여 냉동 보존하고 분석 직전 20/80 비율로 인산완충용액 (pH 2.5)을 혼합, 분석한다. 최종 검체용액 및 HPLC 이동상에 사용되는 20 mM 인산완충용액은 2 M phosphoric acid 10.0 mL를 1-L 용량플라스크에 정확히 가하고 약 980mL의 HPLC용 초순수를 가한 후 pH가 2.45~2.54사이가 되도록 2M NaOH 수용액으로 조절한 후 초순수로 눈금을 맞추어 혼합, 조제한다.

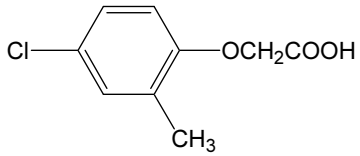
- HPLC에서 orthosulfamuron은 약산성인 이동상에서 충분히 이온화가 억압되어 대치형의 sharp한 peak로 나타난다. 표준용액은 acetonitrile에 조제하여 보관하고, 분석직전 산성 완충용액을 혼합하여 사용하여야 산성조건에서의 분해를 최소화, 재현성 있는 정량분석이 가능하다.

- LC-MS 재확인법에서 orthosulfamuron은 분자 내에 lone pair를 보유한 질소 원자가 다수 존재하여 protonation이 용이하므로 이온화법으로는 ESI positive-ion법을 사용하는데 $[M+H]^+$ ion은 충분한 intensity로 관찰되므로 감도 부족의 문제는 없다. Sulfonyl group에 인접한 nitrogen에 결합된 hydrogen이 해리되는 특성을 이용하여 ESI negative-ion 법도 가능하나 대상성분들의 크로마토그래피 특성 개선을 위하여 약산성의 이동상을 사용하므로 이온화가 억압되어 deprotonation에 의한 충분한 감도를 얻기 어렵다.

8.4.99 잔류농약 분석법 4.1.4.130

엠씨피에이(MCPA)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : MCPA
화학명 (IUPAC) : (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid
분자식 : $C_9H_9ClO_3$
평균분자량 : 200.6
질량분석 시의 M+질량 : 200.0
MCPA-2-chloroethyl ester의 질량분석시 M+질량 : 262.0
Log P_{ow} (25℃) : 2.75 (pH 1), 0.59 (pH 5), -0.71 (pH 7)
물에 대한 용해도 (mg/L, 25℃) :395 (pH 1), 26200 (pH 5), 293900 (pH 7), 320100 (pH 9)
증기압 : 2.3×10^{-2} mPa (20℃)
pKa : 3.73 (25℃)

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

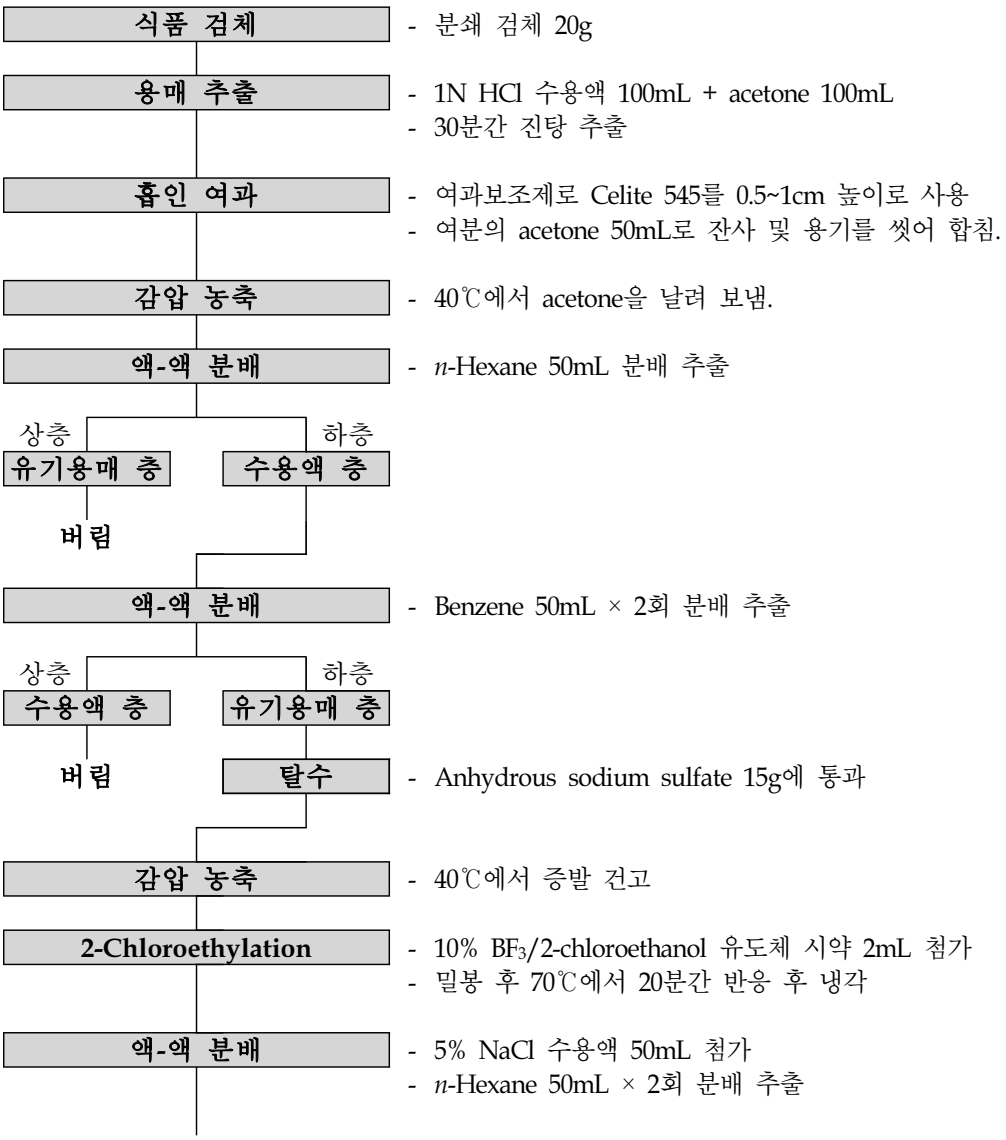
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
MCPA	0.002	0.05	-	-	-	-	-

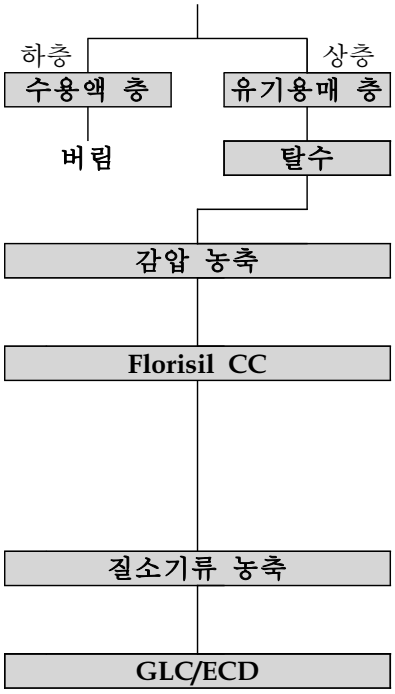
2) 분석법 개요

분쇄 검체를 산성화하고 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 *n*-hexane으로 분배, 세정한 후 benzene으로 분배 추출한다. Benzene 추출액을 감압 농축, 건고한 후

2-chloroethylation시키고 생성된 ester 유도체를 hexane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 Florisil column chromatography로 추가 정제하여 GLC/ECD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정





- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해
- SPE-Florisil, 1g
- *n*-Hexane 10mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 20g 해당량) → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (5/95) 10mL → 버림
- Ethyl ether/*n*-hexane (10/90) 10mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

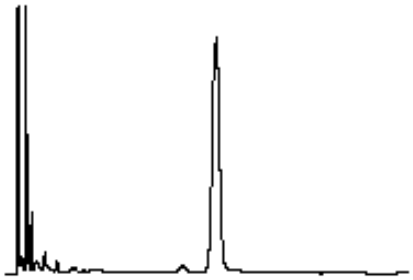


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
MCPA-2-chloroethyl ester 유도체 (7.7분) 2 ng.

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 전자포획검출기 (ECD)
분리용 칼럼 : DB-17 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)

칼럼온도 : 190℃
주입부 온도 : 250℃
검출기 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 mm, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 280℃로 상승 시킨 후 2 분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 100~250

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량*	Ion monitored (*m/z*)
MCPA	13.9	262	141, 143

* MCPA 2-chloroethyl ester 유도체.

6) 분석법 해설

- MCPA는 대표적 합성 auxin인 phenoxy계 선택성 제초제로서 광엽 잡초 방제에 탁월한 방제효과가 있다. 전세계적으로는 벼농사와 채소 및 과실 재배 중에 광범위하게 사용되고 있는 약제이다. 생체 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 잔류분은 모화합물로 한정된다.

- MCPA는 분자 내에 carboxylic acid기를 함유하고 있는 pKa가 3.73인 약산성 화합물이므로 휘발성 및 기체크로마토그래피 특성이 열등하여 GLC로 직접 분석하기는 어렵다. 따라서 carboxylic acid기를 ester화하여 중성의 휘발성 화합물로 변환, GLC로 분석한다. 분자 내에 1개의 염소 원자만을 함유하고 있으므로 단순 alkylation으로는 ECD 검출기에 대한 감도가 낮으므로 추가의 염소원자를 도입하기 위하여 2-chloroethyl ester를 형성하여 분석한다.

- 검체 추출은 약산성 화합물을 추출하는 일반적 방법을 사용한다. 즉, 염기를 가하여 해리를 유발하고 생성된 음이온 형태를 극성 추출용매로 추출하는 방법과 산을 가하여 이온화를 억압, 중성 형태를 비극성 유기용매로 추출하는 방법이 있는데 본 분석법에서는 후자의 방법을 이용한다. 곡류 검체에 염산 수용액을 가하여 산성화 및 습윤화를 동시에 수행한 후 acetone으로 추출한다. 추출액 중 acetone을 감압 농축하여 날려 보내는데 농축한 수용성 추출액의 산도는 첨가한 염산의 잔류로 인하여 MCPA의 이온화가 충분히 억압되어 유기용매 가용성인 상태이다.

- 농축 추출액을 정제하기 위한 액-액 분배는 MCPA의 유기용매에 대한 용해성을 이용하여 분별 분배한다. 즉, MCPA는 *n*-hexane에 대한 용해도가 낮으므로 hexane 세정으로 비극성 불순물을 제거한다. 재차 농축 수용액을 benzene으로 분배하면 비로소 MCPA가 분배 추출된다.

- 휘발성 유도체를 형성하기 위한 2-chloroethylation 반응은 그림 1에 나타낸 바와 같이 전형적인 Fischer esterification 반응의 한 예이다. Lewis산인 BF_3 또는 BCl_3가 촉매로서 10~14% 함유된 2-chloroethanol 시약을 사용하는데 반응은 빠르게 진행되어 통상적으로 10분 이내에 반응이 완결된다. BF_3와 BCl_3는 수분에 대하여 취약하여 잦은 개봉을 할 경우 반응성이 감소할 수 있으므로 시약 관리에 주의를 기울이도록 한다.

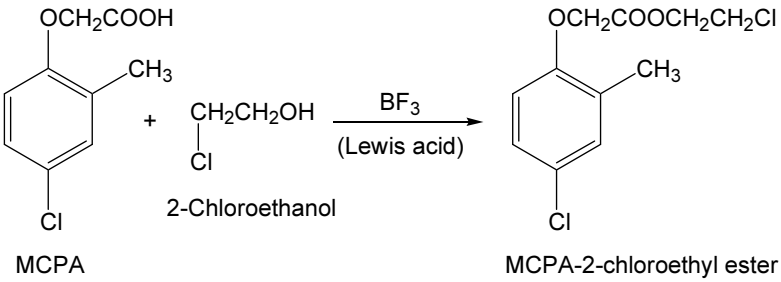


그림 2. MCPA의 2-chloroethyl ester 형성 반응

- 반응액은 방냉 후 NaCl 수용액을 가하여 반응을 종결하고 액-액 분배에 의하여 정제하는데 MCPA-2-chloroethyl ester는 log P_{ow}가 3.6으로 예측되는 비극성의 중성 화합물이므로 이온강도를 높인 NaCl 수용액상에서 *n*-hexane으로 용이하게 분배 추출된다.
- 분배 추출액은 고상추출용 Florisil 카트리지를 사용한 흡착크로마토그래피에 의하여 추가 정제하는데 MCPA-2-chloroethyl ester는 비극성의 중성 화합물이므로 낮은 용출강도의 ethyl ether/*n*-hexane 혼합액에서 용이하게 용출된다.

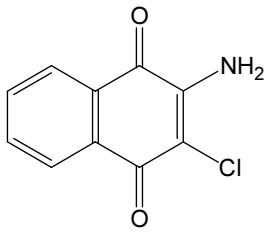
- 2-Chloroethylation에 의하여 MCPA 분자는 2개의 염소원자를 함유하게 되어 ECD에 대한 감도가 크게 높아지는 반면 검체로부터 함께 추출되는 다른 carboxylic acid계통의 불순물들은 1개의 염소원자만을 보유, ECD에 대한 반응성이 낮아 GLC 분석 시의 간섭 정도는 perhalogenation 등과 같이 다수의 halogen을 함유시키는 반응액에 비하여 매우 낮다. 따라서 0.53 mm 모세관 column을 사용하고 검체를 직접 주입하여 등온조건으로 분석하는 GLC법을 사용하여 재현성 있는 정확한 정량이 가능하다.

- GC-MS에 의한 재확인법은 splitless 검체 주입법과 승온 조건으로 분석한다. 승온조건의 시작은 최종 용액인 *n*-hexane의 비등점 보다 낮은 45℃에서 시작하며 10℃/분의 비교적 빠른 속도로 승온시켜 column efficiency를 향상시킴과 동시에 머무름 시간을 단축한다. MCPA-2-chloroethyl ester는 electron impact (EI, 70 eV)에 의하여 비교적 용이하게 이온화되나 분자이온 (M^+, m/z=262)의 상대적 intensity가 낮으므로 재확인 한계를 확보하기 위하여 2-chloroethylacetyl기가 이탈된 base peak (m/z=141)를 SIM용 이온으로 우선적으로 이용한다. Base peak인 4-chloro-2-methylphenoxyl fragment ion에는 염소원자를 1개 포함하고 있으므로 ^{35}Cl과 ^{37}Cl의 동위원소 존재비 100:32가 m/z=143에서 반영되므로 정확한 정성이 가능하다.

8.4.100 잔류농약 분석법 4.1.4.131

퀴노클라민(Quinoclamine)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : quinoclamine
화학명 (IUPAC) : 2-amino-3-chloro-1,4-naphthoquinone
분자식 : $C_{10}H_6ClNO_2$
평균분자량 : 207.6
질량분석 시의 M+질량 : 207.0
Log P_{ow} : 1.58 (25℃)
물에 대한 용해도 : 20 mg/L (20℃)
증기압 : 0.03 mPa (20℃)
pKa : -

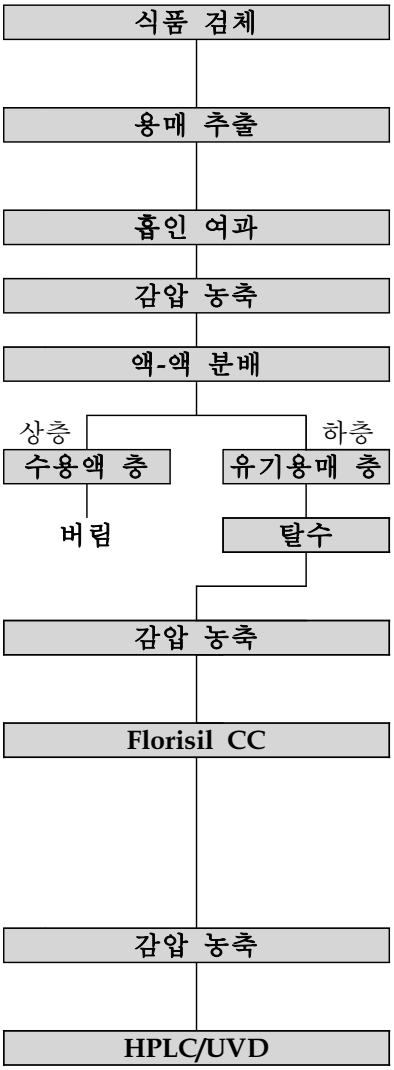
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Quinoclamine	0.0021	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액을 첨가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 검체 20g
- 증류수 20mL를 첨가하여 10분간 방치

- Acetone 100mL
- 1시간 진탕 추출

- 여분의 acetone 40mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 40℃에서 acetone을 날려 보냄.

- 포화 NaCl 수용액 100mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetone/*n*-hexane (5/95) 10mL에 재용해

- Florisil (60~100mesh), 10g (내경 15mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 20g 해당량) → 버림
- Acetone/*n*-hexane (5/95) 100mL → 버림
  Acetone/*n*-hexane (10/90) 70mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (30/70) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃

이동상 : acetonitrile/물 (30/70, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 290 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

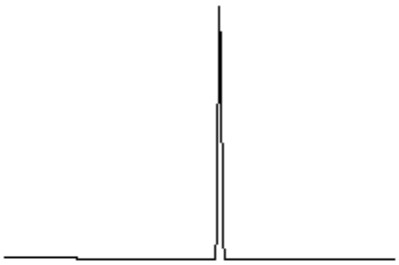


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
quinoclamine (11.0분) 20 ng

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (30/70, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : APCI, positive-ion mode
Cone voltage : 87 V
Capillary temp. : 275℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~400

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 APCI(+) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량*	Ion monitored (*m/z*)
Quinoclamine	11.4	207	208, 210

6) 분석법 해설

- Quinoclamine은 벼 재배 시에 발생하는 논이끼를 방제하기 위하여 사용되는 살조제(殺藻濟, algicide)이다. 또한 제초나 살균 활성도 일부 있다고 알려져 있다. 잔류분의 정의는 생체 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 1.58로 알려진 중간 극성의 화합물이며 분자 내에 naphthoquinone 및 amine기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다. Naphthoquinone moiety의 존재로 인하여 자외선 영역 290 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다. Quinoclamine 분자 내의 amine기는 aromatic amine으로 짝산의 pKa가 5이하로 추정되는 약한 염기성이므로 해리성을 크게 고려하지 않아도 무방하다.

- 검체 조제과정은 중간 극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 검체는 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetone으로 추출하는데, 곡류는 건조 검체이므로 수용성 추출용매에 의한 추출효율을 향상시키기 위하여 추출 전에 증류수를 첨가, 방치하는 습윤화 과정을 미리 수행한다. 추출액은 감압 농축하여 acetone을 날려 보내고 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. Florisil 흡착크로마토그래피는 acetone/*n*-hexane 혼합액의 용출체계로 수행하며 대상성분은 비교적 용이하게 용출된다. 용출액 중에는 일부의 유지 성분이 함유되어 있으나 quinoclamine의 log P_{ow}가 1.58로 HPLC 상에서 상대적으로 빠른 머무름 시간을 나타내므로 불순물과의 분리에는 문제가 없다.

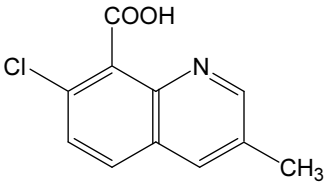
- HPLC 분석 시에 quinoclamine의 측정 파장이 290 nm로 비교적 장파장이므로 단파장에 비하여 간섭은 상대적으로 적다. 따라서 머무름 시간을 충분히 길게 조절하면 비교적 용이한 분석이 가능하다. 그러나 최종 용액 중에 일부의 유지 등 비극성 불순물이 함유되어 있으므로 늦게 용출되는 성분들을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다.

- 재확인을 위한 LC-MS에서 quinoclamine는 분자 내에 amine기를 함유하고 있어 protonation이 용이하여 이온화법으로는 APCI, positive-ion mode를 사용한다. 또한 염소원자를 1개 포함하고 있으므로 ^{35}Cl과 ^{37}Cl의 동위원소 존재비 100:32가 m/z=210에서 반영되므로 정확한 정성이 가능하다.

8.4.101 잔류농약 분석법 4.1.4.132

퀸메락(Quinmerac)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : quinmerac
화학명 (IUPAC) : 7-chloro-3-methylquinoline-8-carboxylic acid
분자식 : $C_{11}H_8ClNO_2$
평균분자량 : 221.6
질량분석 시의 M+질량 : 221.0
질량분석 시 quinmerac methyl ester의 M+질량 : 235.0
Log P_{ow} : -1.11 (pH 7)
물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 223 (pH 7), 240000 (pH 9)
증기압 : 〈0.01 mPa (20℃)
pKa : 4.32 (20℃)

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

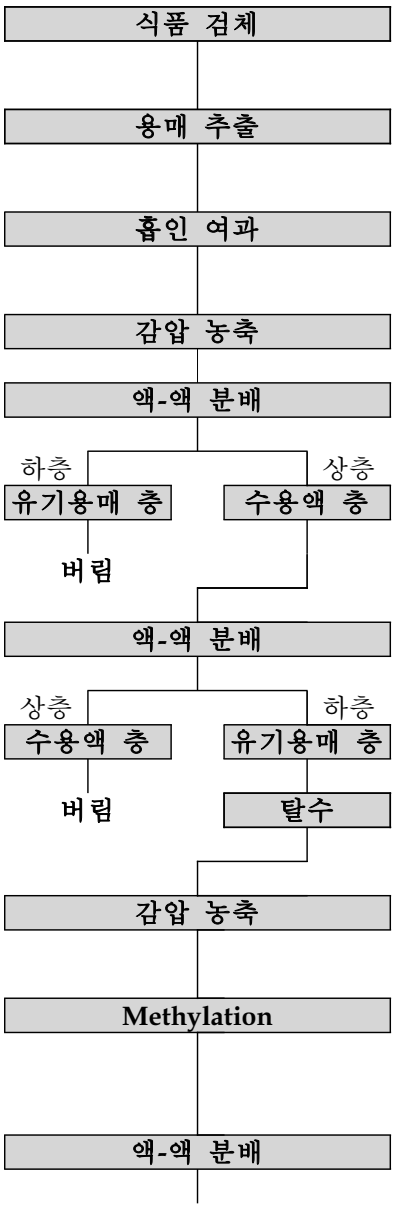
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Quinmerac	0.08	-	0.05	-	-	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 NaOH 수용액을 가하여 알칼리성으로 조절한 후 acetone으로 마쇄 추출한다. 추출액을 흡인여과하고 감압 농축하여 acetone을 날려 보낸 후 dichloromethane으로 분배 세척하여 비극성 방해물질을 제거한다. 수용액 층의 산도를 산성으로 조절

한 후 quinmeorac을 dichloromethane으로 분배 추출한다. Dichloromethane 추출액을 감압 농축하고 iodomethane 시약과 반응시켜 methyl ester를 형성한다. 반응액을 *n*-hexane으로 분배 추출하여 GLC/NPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 50g
- 0.1N NaOH 수용액 50mL 첨가 후 10분간 방치

- Acetone 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출

- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 acetone 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 40℃에서 acetone을 날려 보냄.

- 포화 NaCl 수용액 50mL 첨가
- Dichloromethane 50mL 분배 추출

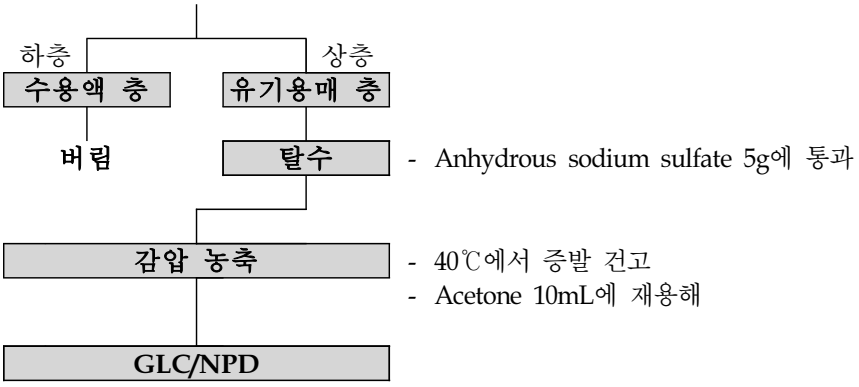
- 2N HCl 수용액 20mL을 첨가하여 pH 1로 조절
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- Benzene 1mL에 재용해

- Dimethyl sulfoxide 1mL + iodomethane 1mL + NaH 40mg 첨가 후 혼합
- 밀봉 후 40℃에서 60분간 반응

- 증류수 10mL 첨가
- *n*-Hexane 10mL 분배 추출



4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 질소·인검출기 (NPD)
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 180℃
주입부 온도 : 230℃
검출기 온도 : 260℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

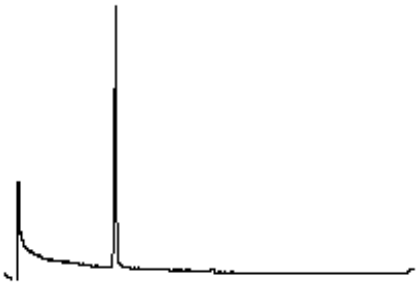


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
quinmerac methyl ester 유도체 (5.4분) 10 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 280℃로 상승 시킨 후 2 분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 100~250

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량*	Ion monitored (*m/z*)
Quinmerac	20.3	235	177, 204

* Quinmerac methyl ester 유도체

6) 분석법 해설

- Quinmerac은 quinolinecarboxylic acid계 합성 auxin의 일종으로 선택성 제초제 또는 생장조절제인데, 국내에서는 복숭아 등 과실류에 과실 비대 및 숙성 촉진을 목적으로 생장조절제로서 사용되고 있다. 잔류분의 정의는 생체 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 모화합물로 한정된다.

- Quinmerac은 quinoline ring 3번 위치가 염소 원자인 quinclorac과 구조가 유사하며 분자 내에 carboxylic acid기를 함유하고 있는 pKa가 4.32인 약산성 화합물이므로 휘발성 및 기체크로마토그래피 특성이 열등하여 GLC로 직접 분석하기는 어렵다. 따라서 carboxylic acid기를 ester화하여 중성의 화합물로 변환, 분석한다. 분자 내에 1개의 염소 원자만을 함유하고 있어 ECD 검출기에 대한 감도가 낮으므로 1개의 질소 원자를 포함하고 있다는 점을 이용, 검출기로는 NPD를 사용한다.

- 검체 추출은 약산성 화합물을 추출하는 일반적 방법을 사용한다. 즉, 염기를 가하여 해리를 유발하고 생성된 음이온 형태를 극성 추출용매로 추출하는 방법과 산을 가하

여 이온화를 억압, 중성 형태를 비극성 유기용매로 추출하는 방법이 있는데 본 분석법에서는 전자의 방법을 이용한다. 과실 검체에 NaOH 수용액을 가하여 알칼리 조건으로 조절한 후 acetone으로 추출한다. 추출용매로 methanol을 사용할 수도 있으나 여과 및 농축에 불리하므로 물의 함량을 높여 acetone을 사용한다. 추출액이 알칼리성이므로 여과지의 손상이 있을 수 있으므로 여과보조제를 사용, 신속하게 흡인 여과하거나 glass-fiber filter를 사용한다.

- 추출액을 정제하기 위한 액-액 분배는 quinmerac의 해리성을 이용하여 ion-associated partition을 적용한다. Quinmerac의 pKa가 4.32이므로 pH 6.4 이상에서는 99% 이상이 해리한다. 따라서 알칼리성 추출액에서 quinmerac은 해리, 이온 형태로 수용성을 나타내므로 dichloromethane과 같은 유기용매로 분배 추출하더라도 여전히 수용액 층에 존재한다. 이러한 dichloromethane 세정에 의하여 비극성의 불순물을 제거한다. 남은 수용액층에 산을 가하여 산성으로 조절하면 quinmerac의 해리가 억압, 유기용매 가용성인 중성의 화합물 형태가 되므로 dichloromethane 층으로 분배 추출되며 수용성 불순물이 제거된다. 이러한 해리 특성을 이용한 분배법은 불순물 제거에 매우 효과적이어서 흡착크로마토그래피와 같은 별도의 정제법을 추가하지 않더라도 기기분석이 가능하다.

- Dichloromethane 분배 추출액의 탈수를 위하여 사용되는 anhydrous sodium sulfate는 일부 시약에서 규격과는 달리 액성이 약알칼리성인 경우가 있으므로 그 선정에 유의하여야 한다. 대상성분은 약산성 화합물이므로 알칼리성에서는 해리, 염의 형태로 sodium sulfate에 포집되어 회수율이 저하될 수 있으므로 사용 전에 액성이 중성~약산성 범위인가를 미리 확인하여야 한다.

- Methylation은 그림 1에 나타낸 바와 같이 iodomethane 시약을 사용, S_N 2 반응으로 진행하는데 BF_3/methanol 등을 사용하여 Fischer esterification 반응으로 수행할 경우 수율이 80% 정도로 다소 낮다. 반응 시약인 iodomethane은 독성이 높고 sodium hydride는 moisture-sensitive 시약이므로 취급에 주의가 필요하다.

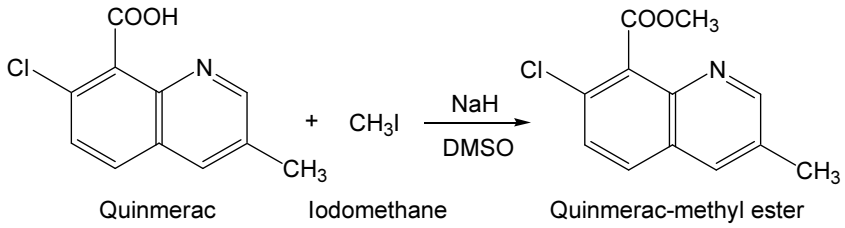


그림. Quinmerac의 methyl ester 형성 반응

- 반응액에 증류수를 가하여 반응을 종결하고 액-액 분배에 의하여 정제하는데 quinmerac-methyl ester는 log P_{ow}가 2.9로 예측되는 비극성의 중성 화합물이므로 *n*-hexane으로 용이하게 분배 추출된다.

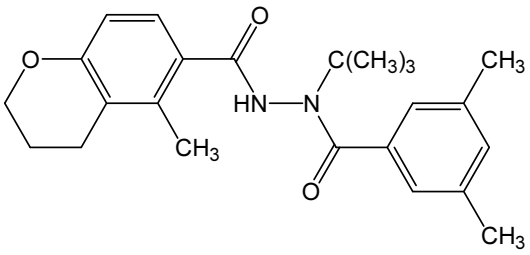
- 과실 검체는 비유지 검체이므로 추출물의 양이 상대적으로 적고 ion-associated partition에 의한 불순물 제거 효과가 확실하여 GLC 분석을 위한 최종 용액은 그 정제도가 높다. GLC 분석은 분리능은 다소 열등하나 정량의 재현성을 확보시키기 위하여 0.53 mm 모세관 column을 사용, 검체를 직접 주입하여 등온조건으로 분석한다.

- GC-MS에 의한 재확인법은 splitless 검체 주입법과 승온 조건으로 분석한다. 승온조건의 시작은 최종 용액인 acetone의 비등점 보다 낮은 45℃에서 시작하며 10℃/분의 비교적 빠른 속도로 승온시켜 column efficiency를 향상시킴과 동시에 머무름 시간을 단축한다. Quinmerac-methyl ester는 electron impact (EI, 70 eV)에 의하여 비교적 용이하게 이온화되나 분자이온 (M^+, *m/z*=235)의 상대적 intensity가 낮으므로 재확인 한계를 확보하기 위하여 *m/z*=177인 base peak $[M\text{-}COOCH_3+H]^+$와 *m/z*=204인 $[M\text{-}OCH_3]^+$ 을 SIM용 이온으로 이용한다.

8.4.102 잔류농약 분석법 4.1.4.133

크로마페노자이드(Chromafenozide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : chromafenozide
화학명 (IUPAC) : 2'-*tert*-butyl-5-methyl-2'-(3,5-xyloyl)chromane-6-carbohydrazide
분자식 : $C_{24}H_{30}N_2O_3$
평균분자량 : 394.5
질량분석 시의 M+질량 : 394.2
Log P_{ow} : 2.7
물에 대한 용해도 : 1.12 mg/L (20℃)
증기압 : $\leq 4\times10^{-6}$ mPa (25℃)
pKa : 비해리성

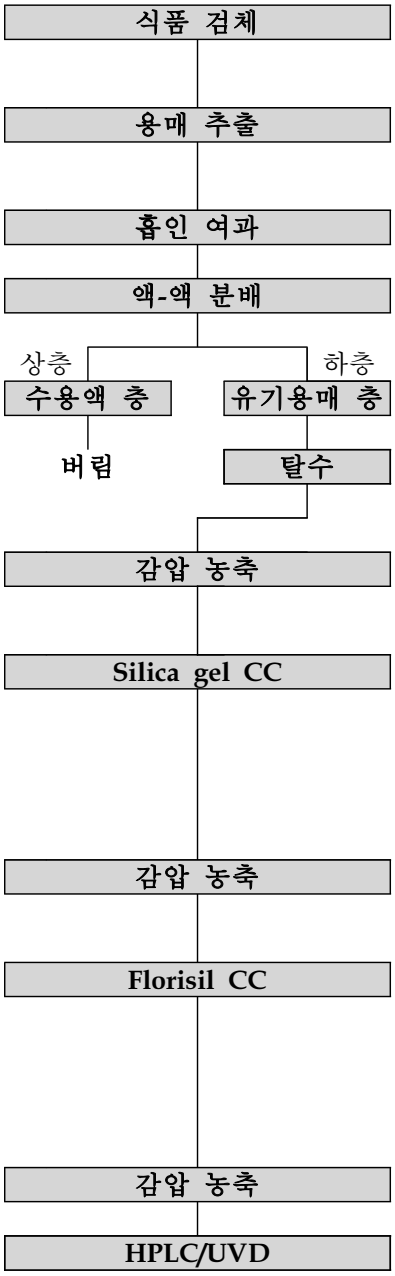
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Chromafenozide	0.27	0.5	0.5	0.3	-	-	-

2) 분석법 개요

습윤화한 분쇄 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel 및 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 검체 25g
- 곡류는 증류수 30mL 첨가 후 10분간 방치

- Acetone 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출

- 여분의 acetone 20mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 250mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 5mL에 재용해

- Silica gel (63~200mesh), 5g (내경 11mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 35mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 40mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetone/*n*-hexane (10/90) 5mL에 재용해

- Florisil (60~100mesh), 5g (내경 11mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- Silica gel CC 용출액 5mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Acetone/*n*-hexane (10/90) 25mL → 버림
- Acetone/*n*-hexane (20/80) 40mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (50/50) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (55/45, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 220 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

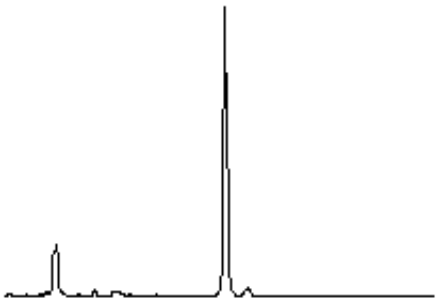


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
chromafenozide (10.2분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (55/45, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : APCI, negative-ion mode
Cone voltage : -61 V
Capillary temp. : 275℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100~500

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 APCI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Chromafenozide	8.3	394	393

6) 분석법 해설

- Chromafenozide는 곤충의 탈피호르몬인 ecdysteroids의 길항제로서 작용하는 diacylhydrazine계 살충제이다. 벼, 과실 및 채소 등 다양한 작물의 재배 시에 인시목(나방류) 방제에 주로 사용되며 국내에서는 수도에 경엽살포제로 등록되어 있다. 잔류분의 정의는 생체 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 2.7로 알려진 중간~비극성 범위의 중성화합물이며 휘발성이 낮고 분자 내에 carbohydrazide기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다. 자외선 영역 220 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製), 그리고 silica gel 및 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 대상 검체 중 곡류는 건조 검체이므로 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시키기 위하여 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 10분간 동안 습윤화 과정을 수행하고 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetone으로 추출한다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다.

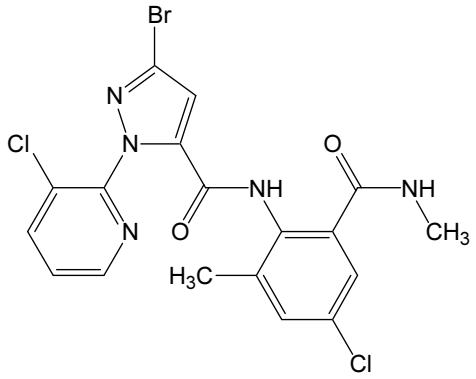
- Chromafenozide는 220 nm의 단파장에서 분석을 수행하기 때문에 검체로부터 함께 추출되는 불순물에 의하여 간섭이 관찰될 가능성이 높다. 또한 곡류 검체 중 유지 성분이 분배 추출물에 함께 함유되어 있으므로 2종의 흡착크로마토그래피법을 사용하여 보다 정밀하게 정제한다. 유지 등 비극성 불순물을 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용, 흡착크로마토그래피에 앞서 미리 제거할 경우에는 1종의 흡착크로마토그래피를 생략하는 것도 가능하다.

- HPLC 분석 시에는 chromafenozide의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화하며 늦게 용출되는 불순물을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다. Chromafenozide에서는 220 nm 보다 흡광계수는 낮으나 250 nm에서 최대흡광파장이 관찰된다. 따라서 분석 목적 상 정량한계를 0.05 mg/kg으로 낮추어 설정하여도 무방할 경우에는 보다 장파장인 250 nm에서 측정함으로써 분석의 선택성을 높일 수 있다. 재확인을 위한 LC-MS에서 chromafenozide는 carbohydrazide기의 -NH에서 deprotonation이 용이하므로 이온화법으로는 APCI, negative-ion mode를 사용한다.

8.4.103 잔류농약 분석법 4.1.4.134

클로란트라닐리프롤(Chlorantraniliprole)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : chlorantraniliprole

화학명 (IUPAC) : 3-bromo-*N*-[4-chloro-2-methyl-6-(methylcarbamoyl)phenyl]-1-(3-chloropyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide

분자식 : $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$

평균분자량 : 483.2

질량분석 시의 M+질량 : 481.0

Log P_{ow} : 2.76 (pH 7)

물에 대한 용해도 : 0.9~1.0 mg/L (pH 4~9, 20℃)

증기압 : 6.3×10^{-9} mPa (20℃)

pKa : 10.9

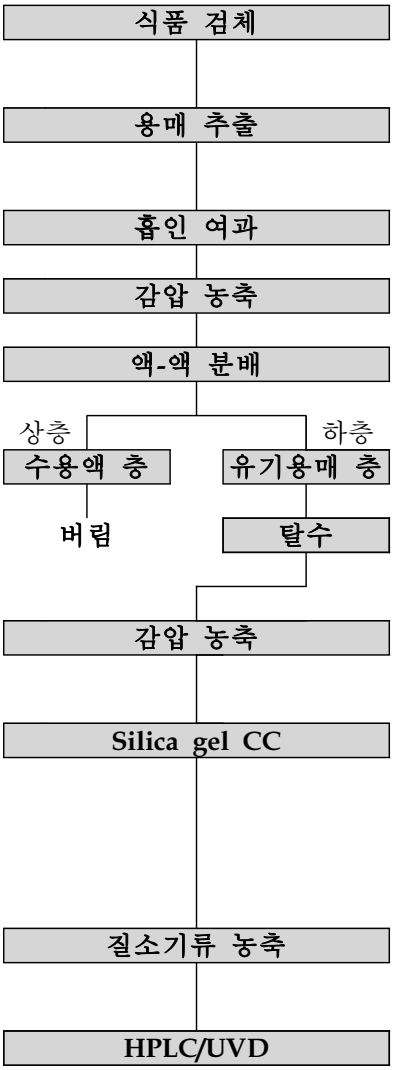
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Chlorantraniliprole	1.58	0.5	0.2~2.0	0.5~3.0	0.05~1.0	-	-

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetonitrile을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보내고 농축액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 silica gel column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 20g
  곡류 및 콩류는 증류수 30mL 첨가 후 10분간 방치
- Acetonitrile 100mL
- 5분간 고속 마쇄 추출
- 여분의 acetonitrile 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 40℃에서 acetonitrile을 날려 보냄.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 50mL 첨가
- Dichloromethane 100 mL + 50mL로 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (20/80) 10mL에 재용해
- SPE-silica, 1g
- *n*-Hexane 10mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 5mL (검체 10g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (30/70) 15mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (40/60) 10mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (50/50) 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (45/55, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 254 nm
주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

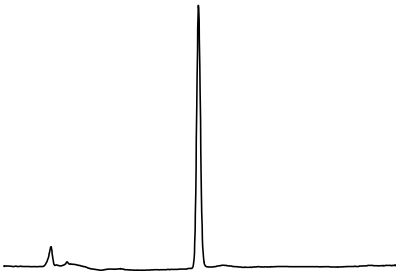


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
chlorantraniliprole (9.6분) 20 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (55/45, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : APCI, negative-ion mode
Cone voltage : -59 V
Capillary temp. : 275℃
분자량 범위 (*m/z*) : 200~600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 APCI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Chlorantraniliprole	6.0	481	480, 482, 484

6) 분석법 해설

- Chlorantraniliprole은 곤충의 정상적인 근육 수축을 저해, 섭식이나 흡즙 억제에 의하여 해충을 방제하는 anthranilic diamide계 살충제이다. 다양한 과실 및 채소류 재배 시에 발생하는 나방 및 진딧물을 방제하기 위하여 단제 및 혼합제의 형태로 사용된다. 환경 중 잔효성이 긴 편이며 많은 종류의 분해산물이 관찰되나 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물은 없으므로 잔류분의 정의는 모화합물로 한정된다.

- Chlorantraniliprole은 log P_{ow}가 2.76인 중간~비극성 범위의 화합물이다. 또한 pKa가 10.9인 약해리성 화합물이나 그 해리정도가 미약하여 비해리성 화합물에 준하여 분석하여도 큰 무리가 없다. 대상성분은 휘발성이 6.3×10^{-9} mPa (20℃)로 매우 낮고 분자 내에 amide기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다. 자외선 영역 254 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 검체 조제과정은 중간~비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetonitrile을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제(組精製) 그리고 silica gel 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

- 대상 검체 중 과실 및 채소류의 함수 검체이므로 습윤화 과정은 불필요하나 곡류 및 콩류는 건조 검체이므로 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시키기 위하여 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 10분간 동안 습윤화 과정을 수행하고 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetonitrile로 직접 추출한다. 추출액은 농축하여 acetonitrile을 제거하는데 수분이 포함되어 있어 감압 농축할 때에 돌비 (突沸, bumping) 현상이 일어날 수 있으므로 splash protector를 플라스크에 부착하거나 진공도를 세심하게 조절한다. 농축 수용액을 NaCl 수용액으로 희석하고 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다.

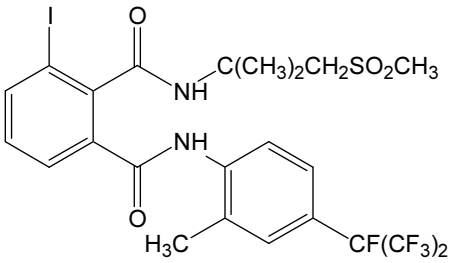
- 대상 검체는 비유지 검체이므로 분배 추출액 중에 유지 등 비극성 불순물의 양이 그다지 많지 않다. 또한 HPLC 분석시에 chlorantraniliprole의 측정파장이 254 nm로 비교적 장파장이므로 간섭물질에 대한 선택성이 기대되므로 추가 정제는 고상추출용 silica gel 카트리지를 사용하여 간편하게 수행한다.

- HPLC 분석 시에 chlorantraniliprole의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화하며 늦게 용출되는 불순물을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다. 재확인을 위한 LC-MS에서 chlorantraniliprole은 amide기의 -NH에서 deprotonation이 용이하므로 이온화법으로는 APCI, negative-ion mode를 사용한다. Chlorantraniliprole은 분자 내에 염소원자 및 bromine 원자를 각각 2개 및 1개 포함하고 있으므로 ^{35}Cl와 ^{37}Cl, 그리고 ^{79}Br과 ^{81}Br의 동위원소 존재비의 조합에 따라 $[M-H]^-$:$[M-H+2]^-$:$[M-H+4]^-$비인 62:100:45가 m/z=480, 482 및 484에서 반영되므로 정확한 정성이 가능하다.

8.4.104 잔류농약 분석법 4.1.4.135

플루벤디아마이드(Flubendiamide)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : flubendiamide
화학명 (IUPAC) : 3-iodo-*N*′-(2-mesyl-1,1-dimethylethyl)-*N*-{4-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluoromethyl)ethyl]-*o*-tolyl}phthalamide
분자식 : $C_{23}H_{22}F_7IN_2O_4S$
평균분자량 : 682.4
질량분석 시의 M+질량 : 682.0
Log P_{ow} : 4.2 (25℃)
물에 대한 용해도 : 0.0299 mg/L (20℃)
증기압 : $<1\times10^{-1}$ mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI* (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Flubendiamide	0.024	0.5	0.7~1.0	0.7~2.0	-	-	-

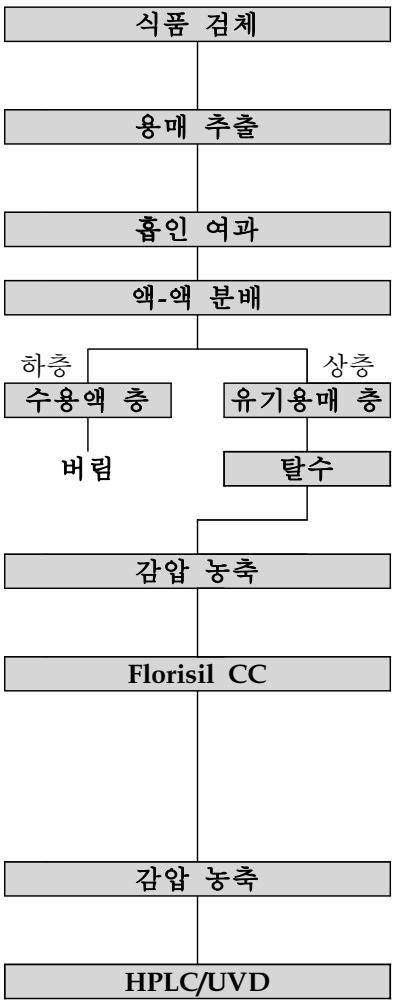
* cRfd (US EPA, 2008).

2) 분석법 개요

세절 검체에 acetone을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane/ *n*-hexane

혼합액으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 세절 검체 25g
- 곡류는 증류수 30mL 첨가 후 10분간 방치

- Acetone 100mL
- 2분간 고속 마쇄 추출

- 여분의 acetone 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.

- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane/*n*-hexane (20/80) 100mL로 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 dichloromethane 10mL에 재용해

- Florisil (60~100mesh), 5g (내경 11mm 유리관 사용)
- Dichloromethane 25mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 25g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (7/93) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (40/60) 50mL → 받음

- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (50/50) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : UV 240 nm
주입량 : 40 μL
분석법의 정량한계 : 0.05 mg/kg

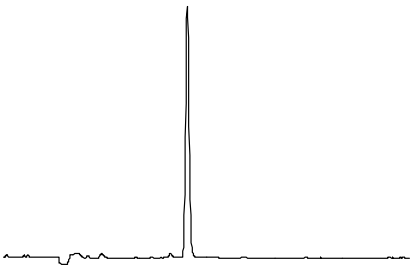


그림 1. 액체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
flubendiamide (9.1분) 40 ng.

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 (50/50, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
주입량 : 5 μL
이온화 : ESI negative-ion mode
Cone voltage : -113 V
Capillary temp. : 330℃
분자량 범위 (*m/z*) : 200~800

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기의 ESI(−) SIM 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Flubendiamide	9.0	682	681

6) 분석법 해설

- Flubendiamide는 chlorantraniliprole과 유사하게 곤충의 정상적인 근육 수축을 저해, 섭식이나 흡즙 억제에 의하여 해충을 방제하는 phthalic acid diamide계 살충제이다. 다양한 과실 및 채소류 재배 시에 발생하는 나방류을 방제하기 위하여 주로 사용되는데 기존 살충제와는 작용점이 상이하므로 저항성인 해충에 약효가 뛰어난 장점이 있다. 환경 중 잔효성이 긴 편이며 iodide가 이탈된 des-iodo-flubendiamide가 주 대사산물이나 독성학적 중요성이 없으므로 잔류분의 정의는 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 4.2로 알려진 비극성의 중성화합물이며 휘발성이 매우 낮고 분자 내에 amide기 등 열에 취약한 부분이 있으므로 GLC보다는 HPLC를 이용하여 분석한다. 자외선 영역 240 nm에서 강한 흡광성을 나타내므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製) 그리고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

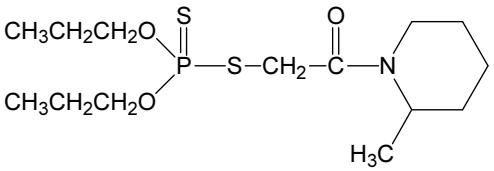
- 대상 검체 중 곡류는 건조 검체이므로 수용성 추출용매에 의한 추출 효율을 향상시키기 위하여 추출에 앞서, 증류수를 첨가, 10분간 동안 습윤화 과정을 수행하고 비극성 농약의 추출에 가장 보편적으로 사용하는 acetone으로 추출한다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 대상 검체는 비유지 검체이므로 분배 추출액 중에 유지 등 비극성 불순물의 양이 그다지 많지 않다. 또한 HPLC 분석 시에 flubendiamide의 측정파장이 240 nm로 비교적 장파장이므로 추가 정제는 Florisil 흡착크로마토그래피만으로 충분히 분석이 가능하다. Flubendiamid는 물에 대한 용해도가 매우 낮으므로 최종 용액을 acetonitrile/물 혼합액 (50/50)에 조제할 때에는 먼저 acetonitrile에 잔류물을 충분히 재용해하고 동량의 초순수를 혼합한다.

- 검체 정제과정이 간편한 만큼 HPLC 분석 시에는 flubendiamide의 머무름 시간을 충분히 길게 조절, 간섭을 최소화하며 늦게 용출되는 불순물을 제거하기 위하여 주기적으로 acetonitirle 함량을 높여 분석 column을 세정한다. 재확인을 위한 LC-MS에서 flubendiamide는 amide기의 -NH에서 deprotonation이 용이하므로 이온화법으로는 APCI, negative-ion mode를 사용한다.

8.4.105 잔류농약 분석법 4.1.4.136

피페로포스(Piperophos)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : piperophos
화학명 (IUPAC) : *S*-2-methylpiperidinocarbonylmethyl *O,O*-dipropyl phosphorodithioate
분자식 : $C_{14}H_{28}NO_3PS_2$
평균분자량 : 353.5
질량분석 시의 M+질량 : 353.1
Log P_{ow} : 4.3
물에 대한 용해도 : 25 mg/L (20℃)
증기압 : 0.032 mPa (20℃)
pKa : 비해리성

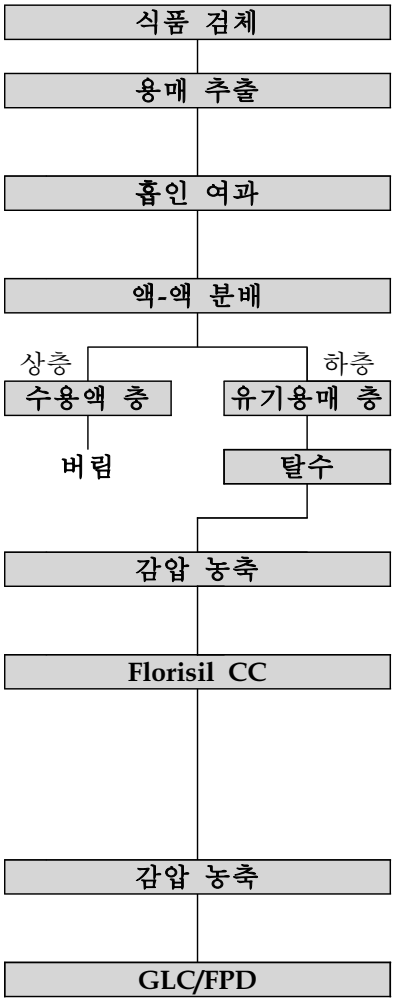
- 일일섭취허용량 (ADI) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Piperophos	0.0004	0.05	-	-	-	-	-

2) 분석법 개요

분쇄 검체에 acetone/증류수 혼합액을 가하여 마쇄 추출한 후 흡인 여과한다. 추출액을 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 수용액과 다량의 증류수를 첨가, 희석한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압 농축하고 Florisil column chromatography에 의하여 추가 정제한 후 GLC/FPD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 검체 50g
- Acetone/water (80/20) 100mL
- 3분간 고속 마쇄 추출
- 여과보조제로 Celite 545를 0.5~1cm 높이로 사용
- 여분의 acetone 50mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침.
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- Dichloromethane 50mL × 2회 분배 추출
- Anhydrous sodium sulfate 15g에 통과
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 10mL에 재용해
- Florisil (60~100mesh), 6g (내경 11mm 유리관 사용)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 분배 추출액 10mL (검체 50g 해당량) → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (10/90) 50mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (30/70) 50mL → 받음
- 40℃에서 증발 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 기체크로마토그래프 (GLC)
검출기 : 불꽃광도검출기 (FPD), 인용 간섭필터, 파장 526 nm
분리용 칼럼 : DB-5 capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.53 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm)
칼럼온도 : 220℃

주입부 온도 : 240℃
검출기 온도 : 240℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 15.0 mL/min
주입량 : 2 μL, 직접주입법
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

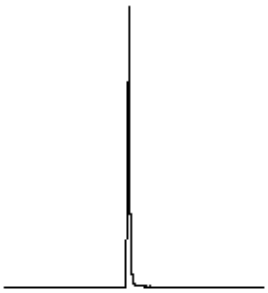


그림 1. 기체크로마토그래프에서 표준품의 크로마토그램
Piperophos (5.7분) 1 ng.

5) 재확인법

측정기기 : GC-MS
분리용 칼럼 : DB-5MS capillary column 또는 이와 동등한 것
(0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
칼럼온도 : 45℃에서 검체를 주입하고 10℃/min의 비율로 280℃로 상승 시킨 후 2 분간 유지한다.
주입부 온도 : 250℃
Interface 온도 : 280℃
캐리어가스 및 유량 : helium, 1.0 mL/min
주입량 : 1 μL, splitless
분자량 범위 (*m/z*) : 100~250

표 1. GC-MS의 SIM 분석을 위한 fragment ions

분석성분	머무름 시간 (min)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Piperophos	19.2	353	320, 140

6) 분석법 해설

- Piperophos는 phosphorodithioate 화학구조의 전형적인 유기인계 화합물이나 타 유기인계 살충제와는 달리 식물의 세포분열을 저해하는 선택성 제초제이다. 주로 벼농사에서 잡초발생전 토양처리용 제초제로 사용된다. 잔류분의 정의는 생체 및 환경 중에서 독성학적 중요성이 인정되는 대사산물이 없으므로 모화합물로 한정된다.

- 대상성분은 log P_{ow}가 4.3인 비극성의 중성화합물이며 휘발성이 0.032 mPa (20℃)로 어느 정도 있으므로 GLC로 분석한다. 검출기로는 분자 내에 인, 질소 및 황 원자를 포함하고 있어 FPD 및 NPD가 모두 이용 가능하나 선택성 및 안정성에서 탁월한 FPD (P-mode)를 검출기로 사용한다.

- 검체 조제과정은 비극성의 비해리성 농약에 대한 일반적 잔류분석법을 적용한다. 즉, acetone을 사용한 검체 추출, 추출액의 dichloromethane 분배에 의한 조정제 (組精製), 그리고 Florisil 흡착크로마토그래피에 의한 최종 정제과정으로 구성된다.

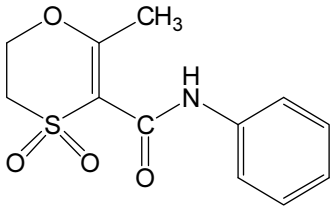
- 대상 검체인 곡류는 건조 검체이므로 수용성 acetone을 첨가하여 습윤화 과정과 추출을 동시에 수행한다. 추출액은 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석한 뒤 dichloromethane으로 분배하는 용이한 과정으로 수행하며 2회 분배로 95% 이상이 회수된다. 추가 정제과정으로는 Florisil 흡착크로마토그래피를 수행하는데 분배 추출액에 함유된 유지 성분은 Florisil 흡착크로마토그래피로도 완전히 제거되지는 않는다.

- GLC 분석은 분리능은 다소 열등하나 정량의 재현성을 확보시키기 위하여 0.53 mm 모세관 column을 사용, 검체를 직접 주입하여 등온조건으로 분석한다. 유지 등의 제거가 불완전 함에도 불구하고 FPD의 선택성이 우수하여 불순물에 의한 간섭은 문제시 되지 않는다. 그러나 다수의 검체를 분석하였을 때 불순물의 column 내 집적에 의하여 column efficiency가 열등해 질 가능성이 있으므로 분리용 column의 관리에 주의를 기울여야 한다. GC-MS에 의한 재확인법은 splitless 검체 주입법과 승온 조건으로 분석한다. 승온조건의 시작은 최종 용액인 *n*-hexane의 비등점 보다 낮은 45℃에서 시작하며 10℃/분의 비교적 빠른 속도로 승온시켜 column efficiency를 향상시킨다.

8.4.106 잔류농약 분석법 4.1.4.148

옥시카복신(Oxycarboxin)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : oxycarboxin
화학명 (IUPAC) : 5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathi-ine-3-carboxanilide 4,4-dioxide
분자식 : $C_{12}H_{13}NO_4S$
평균분자량 : 267.3
질량분석 시의 M+질량 : 267.1
Log P_{ow} : 0.77
물에 대한 용해도 : 1400 mg/L (25℃)
증기압 : $<5.6\times10^{-3}$ mPa (25℃)
pKa : 비해리성

- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

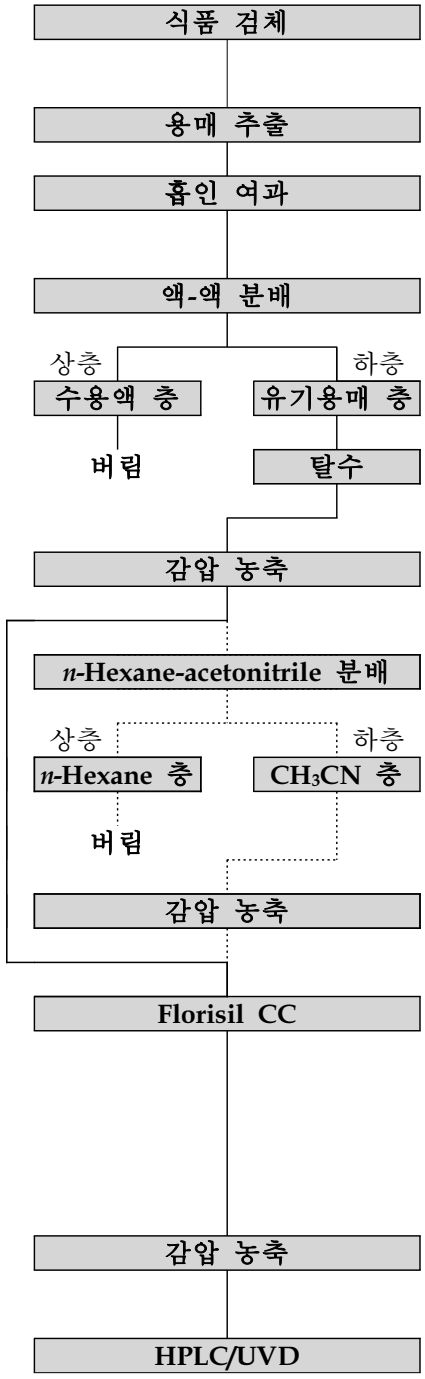
대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)*					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Oxycarboxin	0.15	0.2	-	-	0.2	0.2	-

* Carboxin 기준.

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 균질 검체에 acetone을 가하고 고속 마쇄하여 추출한다. 추출물을 흡인 여과하고 여액을 분액여두에 옮겨 다량의 NaCl 수용액을 가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 분배 추출액을 탈수, 감압농축하고 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하여 유지 및 비극성 방해물질을 제거한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 검체 25g, 곡류 및 콩류 검체의 경우 물 20mL를 가하여 30분간 습윤화
- Acetone 100mL을 가하여 2분간 고속 마쇄 추출
- 필요시 여과보조제를 0.5~1cm 높이로 사용
- Acetone 40mL로 잔류물을 씻어 합침
- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 450mL 첨가
- CH_2Cl_2 50mL × 2회 분배추출
- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과
- 40℃이하에서 농축 건고
- **곡류 및 콩류 등 유지검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (CH_3CN 포화) 40mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 40mL × 2회 분배추출
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 CH_2Cl_2 10mL에 재용해
- Florisil 10g (내경 15mm, 40cm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 10mL → 버림
- CH_2Cl_2/CH_3CN/*n*-hexane (50/5/45) 100mL → 버림
- CH_2Cl_2/CH_3CN/*n*-hexane (50/10/40) 150mL → 받음
- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetonitrile/water (35/65) 10mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/물 (35/65, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : 254 nm
검체 주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.04 mg/kg

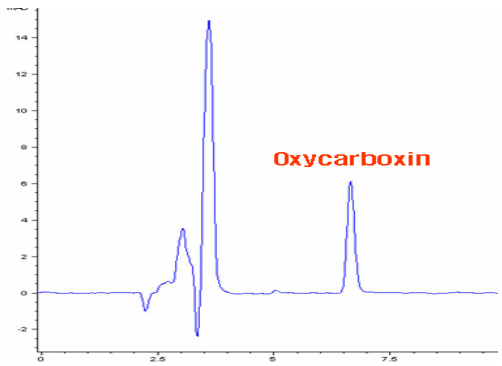


그림 1. 고성능 액체크로마토그래피에서 표준품의 크로마토그램
oxycarboxin (8.5분) 20 ng

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 30℃
이동상 : acetonitrile/0.1% formic acid 수용액 (35/65, v/v)
이동상 유량 : 0.3 mL/min
검체 주입량 : 5 μL
이온화 : ESI, positive-ion mode

Capillary temperature : 350℃
Needle voltage : 4.0 kV
분자량 범위 (*m/z*) : 200～600

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Oxycarboxin	3.9	267	268 [$(M+H)^+$]

6) 분석법 해설

- Oxycarboxin은 식물병원균의 호흡과정 중 succinate dehydrogenase를 저해함으로써 살균작용을 나타내는 carboxamide계 살균제이다. 병해 발병 후 치료 목적의 침투성 약제로서 주로 전면 살포용으로 사용된다. 대상성분은 단독약제로 등록, 사용되는 성분이나 또한 유사살균제 carboxin의 대사산물이기도 하다. 잔류분 정의는 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 유효성분인 모화합물에 한정된다.

- 대상 성분은 log P_{ow} 값이 0.77인 극성 화합물이며 해리성은 없으나 증기압이 〈5.6×10^{-3} mPa (25℃)로 휘발성이 낮고 분자 내에 존재하는 amide기의 열에 대한 취약성으로 인하여 GLC로 분석하는 것은 어렵다. 제시한 분석법에서는 HPLC를 분석기기로 이용하는데 분자 내에 자외영역 중 254 nm의 장파장을 강하게 흡광하는 발색단을 가지고 있으므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 식품 검체로부터 대상성분을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 극성을 나타내는 비해리 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되므로 추출효율에 대한 문제는 없다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행하는데 acetone 추출액을 농축과정 없이 다량의 NaCl 수용액으로 희석하여 직접 비극성 유기용매로 분배하는 방법을 이용한다. 분배 용매로서 *n*-hexane이나 dichloromethane/*n*-hexane (20/80, v/v) 혼합액은 대상성분의 극성에 비하여 비극성 정도가 너무 크므로 분배 효율이 0～23%로 매우 불량하다. 보다 극성이 큰 dichloromethane으로 2회 분배하면 비로소 90% 이상이 회수된다.

- 곡류 및 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄

인다. Acetonitrile로 2회 추출하였을 때의 분배효율은 90% 이상이다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략한다.

- 분배 추출액의 최종 정제는 잔류농약분석법에서 가장 보편적으로 사용하는 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용한다. 용출체계는 용출 강도를 달리하여 세척 및 용출 분획으로 구분, 간섭물질을 최대한 제거한다. Oxycarboxin은 극성이 높으므로 용출강도가 강한 용매로 세척하는 것이 가능하여 최종 용액의 정제도는 상당히 우수하다.

- HPLC 분석 시 측정 파장이 254 nm로 비교적 장파장이므로 검체 중 불순물에 의한 간섭 정도는 크지 않다. 또한 머무름 시간이 긴 비극성 불순물들이 Florisil 흡착크로마토그래피의 세척 분획에서 이미 제거되었으므로 연속적인 검체 주입이 가능하다. 제시한 분석법의 정량한계는 0.04 mg/kg이고 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 78~96%와 10% 미만으로 적용 농산물의 잔류허용기준에 대하여 적부판정을 정확히 수행할 수 있다. Oxycarboxin은 carboxin의 대사산물이기도 하므로 carboxin 잔류량으로 환산할 경우에는 분자량 차이에 따른 보정계수를 적용한다.

  Carboxin 잔류량 (mg/kg) = Oxycarboxin 잔류량 (mg/kg) × (carboxin 분자량 235.3) / (oxycarboxin 분자량 267.3)

- 잔류분의 재확인을 위한 LC-MS에서 이온화는 electrospray ionization법을 사용하는데 oxycarboxin은 소량의 formic acid를 protonation enhancer로서 첨가한 이동상 조건에서 용이하게 $(M+H)^+$ ion을 생성하며 base peak로서 관찰된다.

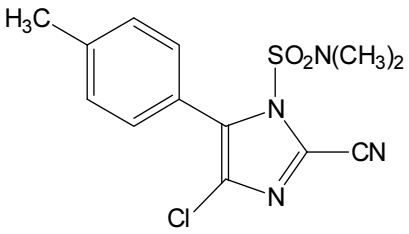
표 2. 농산물 검체 중 회수율

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)				
		현미	사과	고추	배추	대두
Oxycarboxin	0.04	96.1±4.5	84.3±2.3	86.3±3.7	88.2±2.6	88.7±3.1
	0.4	90.0±2.4	85.7±2.1	82.5±1.1	85.9±0.4	83.6±2.0
	2.0	90.9±0.5	84.0±1.7	78.3±0.8	83.0±1.3	80.9±1.2

8.4.107 잔류농약 분석법 4.1.4.149

시아조파미드(Cyazofamid)

1) 대상 농약의 특성



일반명 (ISO) : cyazofamid
화학명 (IUPAC) : 4-chloro-2-cyano-*N,N*-dimethyl-5-*p*-tolylimidazole-1-sulfonamide
분자식 : $C_{13}H_{13}ClN_4O_2S$
평균분자량 : 324.8
질량분석 시의 M+질량 : 324.0
Log P_{ow} : 3.2 (25℃)
물에 대한 용해도 (mg/L, 20℃) : 0.121 (pH 5), 0.107 (pH 7), 0.109 (pH 9)
증기압 : $<1.3\times10^{-2}$ mPa (35℃)
pKa : 비해리성

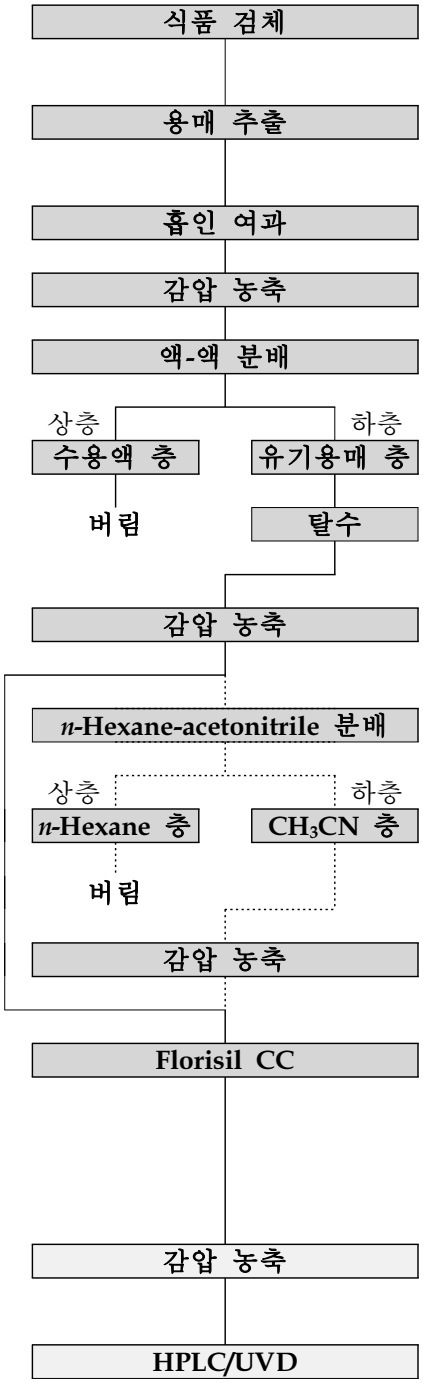
- 일일섭취허용량 (ADI, JMPR) 및 잔류허용기준 (MRL, KFDA)

대상성분	ADI (mg/kg 체중)	잔류허용기준 (mg/kg)					
		곡류	과실류	채소류	콩류	종실류	서류
Cyazofamid	0.17	-	0.2~2.0	0.5~10	-	0.1	0.1

2) 분석법 개요

함수 또는 습윤화한 검체에 acetone을 가하여 진탕 추출한 후 흡인 여과한다. 여액을 감압 농축하고 농축 수용액을 분액여두에 옮겨 NaCl 수용액을 첨가한 후 dichloromethane으로 분배 추출한다. 콩류 등 유지 검체는 *n*-hexane/acetonitrile 분배법을 추가하여 유지 및 비극성 방해물질을 제거한다. 분배 추출액을 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 최종 정제하여 HPLC/UVD로 분석한다.

3) 검체 추출 및 정제 과정



- 분쇄 검체 25g
- 콩류 검체의 경우 물 20mL를 가하여10분간 습윤화

- Acetone 100mL
- 1시간 동안 진탕 추출 (200rpm)

- 여분의 acetone 30mL로 잔사 및 용기를 씻어 합침

- 40℃이하에서 acetone 증발

- 포화 NaCl 수용액 50mL + 증류수 50mL 첨가
- Dichloromethane 100mL + 50mL로 2회 분배 추출

- Anhydrous sodium sulfate 20g에 통과

- 40℃이하에서 농축 건고

- **콩류 등 유지검체**
- 잔류물을 *n*-hexane (acetonitrile 포화) 50mL에 재용해
- Acetonitrile (*n*-hexane 포화) 50mL + 30mL로 2회 분배추출

- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 *n*-hexane 5mL에 재용해

- Florisil 10g (내경 15mm 칼럼)
- *n*-Hexane 50mL (pre-washing) → 버림
- 검체용액 5mL → 버림
- Ethyl acetate/*n*-hexane (10/90) 100mL → 버림
- Ethyl acetate/dichloromethane (30/70) 150mL → 받음

- 40℃이하에서 농축 건고
- 잔류물을 acetonitrile 5mL에 재용해

4) 기기분석법

측정기기 : 고성능 액체크로마토그래프 (HPLC)
검출기 : 자외부흡광검출기 (UVD)
분리용 칼럼 : C_{18} (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 35℃
이동상 : acetonitrile/물 (65/35, v/v)
이동상 유량 : 1.0 mL/min
검출기 파장 : 280 nm
검체 주입량 : 20 μL
분석법의 정량한계 : 0.02 mg/kg

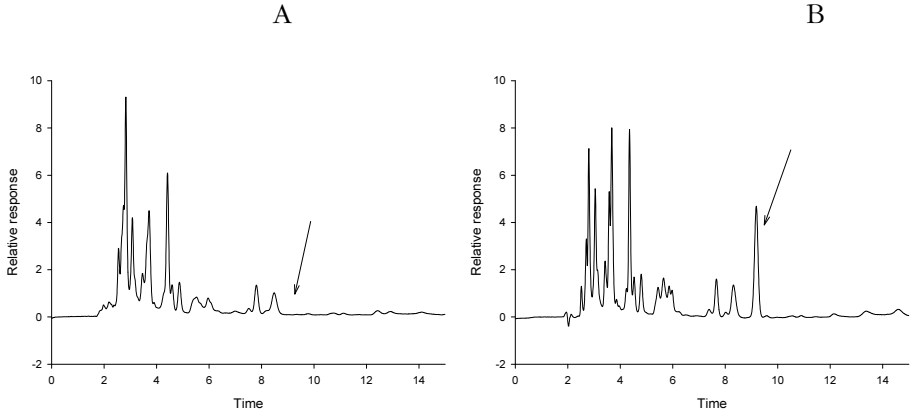


그림 1. 대두 검체 중 cyazofamid 분석 크로마토그램
A, 무처리 시료; B, 0.2 mg/kg 처리 시료

5) 재확인법

측정기기 : LC-MS
분리용 칼럼 : C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 2.6 μm) 또는 이와 동등한 것
칼럼온도 : 40℃
이동상 : acetonitrile/물 혼합액 (0.1% formic acid 함유) (60/40, v/v)
이동상 유량 : 0.2 mL/min
검체 주입량 : 2 μL

이온화 : ESI, positive-ion mode
Cone voltage : 56 V
Capillary temperature : 350℃
분자량 범위 (*m/z*) : 100～400

표 1. 액체크로마토그래프·질량분석기 분석을 위한 이온

분석성분	머무름 시간 (분)	분자량	Ion monitored (*m/z*)
Cyazofamid	1.9	324	325 [$(M+H)^+$]

6) 분석법 해설

- 분석 대상성분인 cyazofamid는 식물병원균의 호흡과정 중 전자전달계를 저해함으로써 살균작용을 나타내는 보호용 살균제이다. 주로 과실 및 채소류에 경엽 또는 토양살포제로 사용된다. 대상성분은 모화합물이 유효성분이고 독성학적으로 중요성이 인정되는 대사산물이 없어 잔류분은 모화합물 잔류량으로 정의된다.

- Cyazofamid는 log P_{ow} 값이 3.2인 비극성 화합물이며 해리성이 없으나 휘발성이 낮고 분자 내에 존재하는 imidazole ring과 sulfonamide기의 열에 대한 취약성으로 인하여 GLC로 분석하는 것은 어렵다. 따라서 제시한 분석법에서는 HPLC를 분석기기로 이용한다. 대상 성분은 분자 내에 자외영역 중 280 nm의 장파장을 강하게 흡광하는 발색단을 가지고 있으므로 검출기로는 UVD를 사용한다.

- 식품 검체로부터 대상성분 전부를 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용한다. Acetone은 대상성분과 유사한 물리화학적 특성을 나타내는 비극성 농약 잔류분을 추출하는데 보편적으로 사용되는 표준적 용매이므로 추출효율에 대한 문제는 없다. 검체 추출물로부터 불순물을 1차적으로 제거하기 위해서 액-액 분배법을 수행한다. Acetone 추출액 중 acetone을 증발시킨 후 NaCl 수용액을 가하여 이온강도를 높이고 dichloromethane으로 분배하는데 2회 추출로 전량 회수된다.

- 콩류 등 유지함량이 높은 검체에 대해서는 흡착크로마토그래피법에 의한 최종 정제에 앞서 *n*-hexane-acetonitrile 분배법을 이용하여 유지 등 비극성 불순물의 양을 줄인다. Acetonitrile 50mL 및 30mL로 2회 추출하였을 때 cyazofamid는 전량 회수되므로 추가적 분배 추출은 필요하지 않다. *n*-Hexane-acetonitrile 분배법은 유지 검체에 대해서는 불순

물 제거 효율이 높으나 저유지 검체인 채소 및 과실 검체 등에 대해서는 그 정제정도가 미미하므로 생략한다.

- 해리하지 않는 중성 대상성분에 대하여 흡착크로마토그래피법은 잔류농약분석법에서 가장 많이 사용하는 정제 방법이며 흡착제로는 가장 보편적이면서 간섭물질 제거효율이 우수한 Florisil을 사용한다. 용출체계는 용출 강도를 달리하여 세척 및 용출 분획으로 구분, 간섭물질을 최대한 제거한다.

- HPLC 분석 시 측정 파장이 280 nm로 장파장이므로 검체 중 불순물에 의한 간섭 정도는 크지 않다. 또한 머무름 시간이 긴 비극성 불순물들이 Florisil 흡착크로마토그래피의 세척 분획에서 이미 제거되었으므로 연속적인 검체 주입이 가능하다. 제시한 분석법의 정량한계는 0.02 mg/kg이고 대표 5종 농산물에 대한 회수율과 분석오차는 각각 75~99%와 10% 미만으로 적용 농산물의 잔류허용기준에 대하여 적부판정을 정확히 수행할 수 있다.

- 잔류분의 재확인을 위한 LC-MS에서 이온화는 electrospray ionization법을 사용하는데 cyazofamid는 소량의 formic acid를 protonation enhancer로서 첨가한 이동상 조건에서 용이하게 $(M+H)^+$ ion을 생성하며 base peak로서 관찰된다. 분자 내에 염소원자를 1개 함유하고 있어 $(M+2+H)^+$ ion이 $(M+H)^+$ ion의 32% 강도로 관찰된다.

표 2. 농산물 검체 중 회수율

대상성분	처리농도 (mg/kg)	회 수 율 (%)					
		사과	감귤	고추	배추	대두	감자
Cyazofamid	0.02	79.1±5.2	75.3±6.0	90.1±1.3	92.0±2.6	98.5±4.4	87.0±3.4
	0.2	95.2±0.8	78.5±4.5	86.1±3.7	89.9±1.3	89.8±2.7	83.0±4.7
	2.0	91.7±0.5	86.1±0.5	88.6±3.4	88.0±2.7	82.6±5.9	78.9±9.2

참 고 문 헌

1. 농촌진흥청 (2006) *농약 잔류성 시험기준 및 방법*, 대한민국.
2. 식품의약품안전청 (2009) *식품공전 제2권*, 식품의약품안전청, 대한민국.
3. 식품의약품안전청 (2010) *식품의 농약 잔류허용기준*, 대한민국.
4. Ardrey, B. (2003) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Wiley, Chichester, UK.
5. European Commission (2004) *Guidance Document on Residue Analytical Methods*, SANCO/825/00 rev.7-2004.
6. Codex Alimentarius Commission (2007) *Draft and Proposed Draft Maximum Pesticide Residue Limits in Foods and Feeds at Step 7 and 4*, Codex Committee on Pesticide Residues, Rome, Italy.
7. Codex Alimentarius Commission (2003) *Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis*, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.
8. Grant, D.W. (1995) Capillary Gas Chromatography, Wiley, Chichester, UK.
9. Grob, K. (2001) *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
10. Horwitz, W. and Latimer Jr. G.W. ed. (2005) *Official Methods of Analysis*, 18th ed., AOAC International, Gaithersburg, USA.
11. Jennings, W., Mittlefehldt, E., and Stremple, P. (1987) *Analytical Gas Chromatography*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, USA.
12. Kitson, F.G., Larsen, B.S., and McEwen, C.N. (1996) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Academic Press, NY, USA.
13. Luque de Castro, M.D., Valcarcel, M., and Tena, M.T. (1994) *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
14. McLafferty, F.W. and Turecek, F. (1993) *Interpretation of Mass Spectra*, 4th ed., University Science Books, Sausalito, USA.
15. Neue, U.D. (2000) *HPLC Columns : Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, NY, USA.
16. Newton, R.P. and Walton, T.J. (1996) *Application of Modern Mass*

Spectrometry in Plant Science Research, Clarendon Press, Oxford, UK.

17. Smith, R.M. (1995) *Retention and Selectivity in Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
18. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L. (1997) *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., Wiley, NY, USA.
19. Tomlin, C.D.S. (2009) The Pesticide Manual, 15th ed., British Crop Protection Council, Alton, UK.
20. US FDA (1999) *Pesticide Analytical Manual, Vol. I : Multiresidue Methods,* 3rd ed., US FDA, USA.
21. WHO (1984) *Pesticide Residue Analysis, Proceedings of a Joint FAO/WHO Course*, Copenhagen, Denmark.
22. Zweig, G. and Sherma, J. (1986) *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*, Vol. XV, Academic Press, NY, USA.

부록 1. 식품 검체별 전처리 방법

식품의 종류에 따라 아래 표에서와 같이 처리한 것을 검체로 한다. 다만, 이 표에서 정하지 아니한 식품은 원칙적으로 가식부를 시험부위로 한다.

식 품	검 체
곡류	
쌀, 보리, 밀, 메밀, 호밀, 수수, 귀리, 조, 율무	탈각한 것
옥수수	포엽, 수염 및 이삭 속을 제거한 것
기타곡류	탈각한 것
서류	
감자, 고구마, 토란, 기타서류	잔뿌리를 제거하고 물로 가볍게 씻어 흙을 제거한 것
콩류	
대두, 팥, 녹두, 완두, 강낭콩, 잠두	깍지를 제거한 것
땅콩	깍지를 제거한 것
기타콩류	깍지를 제거한 것
채소류	
무의 뿌리, 생강, 당근	물로 가볍게 씻어 흙을 제거한 것
무의 잎, 케일	변질 잎을 제거한 것
배추, 양배추, 상추, 양상추	바깥 변질 잎 및 심을 제거한 것
쑥갓, 셀러리	뿌리 및 변질 잎을 제거한 것
양파, 파, 마늘, 부추	겉껍질 및 잔뿌리를 제거한 것
아스파라거스, 고사리	뿌리 및 변질 잎을 제거한 것
고추, 토마토, 피망, 가지	받침을 제거한 것
수박, 참외, 메론, 오이, 호박	꼭지를 제거한 것
시금치	잔뿌리 및 변질 잎을 제거한 것
기타 채소류	가식부분

식 품	검 체
과실류	
사과, 배, 모과	심 및 양쪽 오목한 부분을 제거한 것
복숭아, 살구, 자두, 매실, 체리	꼭지 (果柄) 및 씨 (核)를 제거한 것
딸기	받침을 제거한 것
포도	꼭지를 제거한 것
감	받침 및 씨를 제거한 것
바나나	꼭지 부분을 제거한 것
키위	꼭지를 제거한 것
밀감, 레몬, 자몽, 오렌지, 감귤류	과실전체
파파야	과실전체
아보카도, 망고	씨를 제거한 것
파인애플	왕관 (crown) 부분을 제거한 것
기타 과실류	가식부분
버섯류	
표고버섯, 기타버섯류	가식부분
종실류	
참깨	종자
해바라기씨, 면실	외피를 제거한 것
기타 종실류	종자
견과류	
아몬드, 은행, 밤, 피칸, 호두	외과피를 제거한 것
기타 견과류	외과피를 제거한 것
호 프	건조된 꽃
건포도	건조된 포도
건조채소류	건조된 채소류
차	건조된 차
인삼	수삼, 건조삼 또는 인삼농축액(장뇌삼 포함)

부록 2. 식품 검체별 유지, 수분 및 당 (糖) 함량

식품 검체 중 함유된 유지 함량 2%를 기준으로 비유지 및 유지 검체로 구분한다. 또한 수분 함량 75%를 기준으로 함수(含水) 및 건조 검체로 구분하며 당 함량은 5% 이하, 5~15% 및 15~30%로 구분한다. 각 부류별로 최적화된 공전 검체 조제법에 따라 분석을 수행한다. 향신료 등의 특이 성분이 다량 함유되어 있는 검체는 일반적 검체와는 별도로 구분하며 각각의 검체에 대하여 특성화된 분석법을 따른다. 수록된 자료는 미국 식품의약품안전청에서 발간한 Pesticide Analytical Manual 중 자료를 국내에서의 분석 검체 실정에 적합하도록 정리, 편집하였으며 일부 검체에 대해서는 수치상 편차가 있을 수 있다.

1) 곡류 (cereal grains)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
쌀 (rice)	알곡, 야생 조곡	1.08	7.76	2.5
	현미, 장립형, 조곡	2.92	10.37	0.7
	현미, 중립형, 조곡	2.68	12.37	0.7
	백미, 장립형, 일반, 조곡, 강화	0.66	11.62	0.5
	백미, 중립형, 조곡, 강화	0.58	12.89	0.5
	백미, 중립형, 조곡, 미강화	0.58	12.89	0.5
	백미, 단립형, 조곡, 강화	0.52	13.29	-
	백미, 찹쌀, 조곡	0.55	10.46	-
	백미, 장립형, 밥형태, 건물, 강화	0.56	10.16	-
	백미, 장립형, 조리형태, 강화, 건물	0.29	8.14	-
	백미, 중립형, 조리형태, 강화	0.21	68.61	0.2
	쌀가루, 현미	2.78	11.97	-
	쌀가루, 백미	1.42	11.89	1
	쌀겨 (rice bran), 미가공	20.85	6.13	0.9
보리 (barley)	알곡, 정백 조곡	1.16	10.09	-
밀 (wheat)	밀가루 (semolina), 강화	1.05	12.67	-
	쿠스쿠스 (couscous), 알곡, 건물	0.64	8.56	-

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
메밀 (buckwheat groats)	알곡	3.4	9.75	-
	알곡, 볶은 건물	2.71	8.41	-
	메밀가루, 통알곡으로 제조	3.1	11.15	-
조 (millet)	조곡	4.22	8.67	1.2
수수 (sorghum)	알곡	3.3	9.2	-
옥수수 (corn)	알곡, 건물 (dry)	2.08	10	-
	조곡, 백색종	4.74	10.37	-
	조곡, 황색종	4.74	10.37	-
	조곡, 감미종, 백색종	1.18	75.96	-
	조곡, 감미종, 황색종,	1.18	75.96	5.4
	팝콘용 (popcorn), 알곡, 조곡	4.7	9.8	-
	옥수수가루, masa (조리용), 강화	3.78	9.03	-
	옥수수가루, 알곡 전체 분쇄, 백색종	3.86	10.91	-
	옥수수가루, 알곡 전체 분쇄, 황색종	3.86	10.91	-
	옥수수녹말,	0.05	8.32	-
귀리 (oats)	알곡	6.9	8.22	-
	기울 (bran), 조곡	7.03	6.55	1.4
호밀 (rye)	알곡	2.5	10.95	-
	호밀가루, 다크 (dark)	2.69	11.07	3.5
	호밀가루, 라이트 (light)	1.36	8.78	3.5
	호밀가루, 미디움 (medium)	1.77	9.85	3.5
퀴노아 (quinoa)	-	5.8	9.3	-

2) 서류 (potatoes)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
감자 (potatoes)	생괴경, 과육	0.1	78.96	1.0
	생괴경, 껍질 포함	0.1	83.29	0.6
고구마 (sweet potato)	생괴경	0.3	72.84	5.0
	고구마 잎, 생채소	0.3	87.96	-
토란 (taro)	생괴경	0.2	70.64	0.8
	타히티형, 생 괴경	0.97	87.96	-
	토란잎, 생채소	0.74	85.66	-
	토란순, 생채소	0.09	95.82	-
타로토란 (poi)	하와이산 타로토란	0.14	71.64	-
마 (yam)	생괴경	0.17	69.6	0.5
	Mountain yam, Hawaii, 생괴경	0.1	81.44	-
	Yambean, 생괴경	0.2	89.15	-
카사바 (cassava)	생괴경	0.39	68.51	1.2
갈분 (arrowroot flour)		0.1	11.37	-

3) 콩류 (Beans)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
대두 (soybean)	성숙 종자, 생두	19.94	8.54	6.6
	청대콩 (green bean), 생두 (raw)	6.8	67.5	-
	두부, 일반형, 비조리형태	4.78	84.55	0.4
	두부, 경화형, 비조리형태	8.72	69.83	0.4
	납두 (natto)	11	55.02	-
	템페 (tempeh), 인도네시아 발효	7.68	54.95	1.3
녹두 (mung bean)	성숙 종자, 생두	1.15	9.05	6.6
	성숙 종자, 최아상태, 생두	0.18	90.4	1.7
	필리핀산, 성숙 종자, 생두	1.83	8.58	-
완두 (pea)	말린, 성숙 종자, 생두	1.16	11.27	-
	완두 새싹, 생체	0.2	88.89	4
	청완두, 생체	0.4	78.86	4.5
강낭콩 (kidney bean)	강낭콩 전체, 성숙 종자, 생두	0.83	11.75	-
	Red bean, 성숙 종자, 생두	1.06	11.75	-
	Royal red bean, 성숙 종자, 생두	0.45	11.9	-
	California red, 성숙 종자, 생두	0.25	11.75	-
	Cranberry (Roman) bean, 성숙 종자, 통조림	0.28	77.56	-
	French (green) bean, 성숙 종자, 생두	2.02	10.77	-
	Snap bean, 녹색종, 생두	0.12	90.27	2.6
	Snap bean, 황색종, 생두	0.12	90.27	-
	Great northern bean, 성숙 종자, 생두	1.14	10.7	-
	Navy bean, 성숙 종자, 생두	1.28	12.36	-
	Pink bean, 성숙 종자, 생두	1.13	10.06	-

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
강낭콩 (kidney bean)	Pinto bean, 성숙 종자, 생두	1.13	10.95	-
	White bean, 성숙 종자, 생두	0.85	11.32	-
	Small white bean, 성숙 종자, 생두	1.18	11.71	-
	Yellow bean, 성숙 종자, 생두	2.6	11.1	-
동부 (yardlong bean)	성숙 종자, 생두	1.31	8.43	-
	생두	0.4	87.85	-
	Catjang, 성숙 종자, 생두	2.07	11.05	3.0
팥 (adzuki, red bean)	성숙 종자, 생두	0.53	13.44	-
잠두 (broad beans)	Fava beans, 성숙 종자, 생두	1.53	10.98	5.7
피전피 (Pigeon pea)	Red gram, 성숙 종자, 생두	1.49	10.59	2.8
리마콩 (lima bean)	대형, 성숙 종자, 생두	0.69	10.17	8.5
렌즈콩 (lentil)	성숙 종자, 생두	0.96	11.19	2.5
루핀 (lupin bean)	성숙 종자, 생두	9.74	10.44	-
모스콩 (moth bean)	성숙 종자, 생두	1.61	9.68	-
편두 (hyacinth bean)	제비콩, 성숙 종자, 생두	1.69	9.38	-
	제비콩, 미숙 종자, 생두	0.2	87.87	-
블랙빈 (black bean)	성숙 종자, 생두	1.42	11.02	-
	Turtle bean, 성숙 종자, 생두	0.9	11	-
병아리콩 (chickpeas)	Garbanzo beans, bengal gram, 성숙 종자, 생두	6.04	11.53	3.8
윙드빈 (winged bean)	성숙 종자, 생두	16.32	8.34	7
	잎, 생체	1.1	76.85	-
	괴경, 생체	0.9	57.4	-
알팔파 종자 (alfalfa seed)	최아상태, 생 종실	0.69	91.14	0.2

4) 견과 종실류 (Nuts and seeds)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
밤 (chestnut)	유럽산, 생견과, 각피 포함	2.26	48.65	10.6
	유럽산, 생견과, 각피 제외	1.25	52	11.3
	중국산, 생견과, 각피 제외	1.11	43.95	-
	일본산, 생견과, 각피 제외	0.53	61.41	-
은행 (ginkgo nut)	생견과	1.68	55.2	-
도토리 (acorn)	생견과	23.86	27.9	-
코코넛 (coconut)	속 과육, 생견과	33.49	46.99	3.5
땅콩 (peanut)	땅콩 전체, 생견과	49.24	6.5	4.3
	스페인산, 생견과	49.6	6.39	-
	발렌시아산, 생견과	47.58	4.26	-
	버지니아산, 생견과	48.75	6.91	4.3
	땅콩버터, 통조림, 가미	49.98	1.42	-
	땅콩버터, chunk형, 가미	49.94	1.13	7.8
	땅콩버터, chunk형, 비가미	49.94	1.13	-
	땅콩버터, smooth형, 가미	49.98	1.42	7.8
	땅콩버터, smooth형, 비가미	49.98	1.42	7.8
연밥 (lotus seed)	생 종실	0.53	77	-

5) 과실류 (Fruits)

5-1) 인과류 (Pome fruits)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
사과 (apple)	생과실, 과피 포함	0.36	83.93	11.5
	탈수, 생과실	0.58	3	-
	건과, 생과실	0.32	31.76	-
	사과소스 (apple sauce), 통조림, 가당, 가미	0.18	79.58	16.5
	사과즙 (apple juice), 통조림 또는 병, 무가당 (아스코르빈산 첨가)	0.11	87.93	10.9
야생능금 (crabapple)	생과실	0.3	78.94	-
마미애플 (mammy-apple)	생과실	0.5	86.2	-
장미사과 (rose-apple)	생과실	0.3	93	-
배 (pear)	생과실	0.4	83.81	10.5
선인장열매 (pricklypear)	생과실	0.51	87.55	-
모과 (quince)	생과실	0.1	83.8	-
단감 (persimmon)	생과실	0.4	64.4	-
	일본산, 생과실	0.19	80.32	-
석류 (pomegranate)	생과실	0.3	80.97	8.9

5-2) 감귤류 (Citrus fruits)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
감귤 (mandarin)	생과실	0.19	87.6	-
오렌지 (orange)	오렌지 전체, 생과실	0.12	86.75	8.9
	캘리포니아산, Navel, 생과실	0.09	86.81	-
	캘리포니아산, Valencia, 생과실	0.3	86.34	-
	플로리다산, 생과실	0.21	87.14	8.9
	오렌지즙 (orange juice), 생과실	0.2	88.3	10.2
	오렌지즙 (orange juice), 통조림, 무가당	0.14	89.01	9.8
자몽 (grapefruit)	핑크/레드/화이트 전체, 생과실	0.1	90.89	6.2
	자몽즙 (grapefruit juice), 핑크/레드/화이트 전체, 생과실	0.1	90	7.5
레몬 (lemon)	생과실, 껍질 포함	0.3	87.4	-
	레몬 껍질 (lemon peel), 생과실	0.3	81.6	-
	레몬즙 (lemon juice), 생과실	0	90.73	2.4
	레몬즙 (lemon juice), 통조림 또는 병	0.29	92.46	2.4
라임 (lime)	생과실	0.2	88.26	0.4
	라임즙 (lime juice), 생과실	0.1	90.21	-
	라임즙 (lime juice), 통조림 또는 병, 무가당	0.23	92.52	-
금귤 (kumquat)	생과실	0.1	81.7	-
포멜로 (pummelo)	생과실	0.04	89.1	-

5-3) 핵과류 (Stone fruits)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
복숭아 (peach)	생과실	0.09	87.66	8.7
대추 (jujube)	생과실	0.2	77.86	-
대추 (dates)	천연, 건과	0.45	22.5	64.2
살구 (apricot)	생과실	0.39	86.35	9.3
	탈수, 생과실	0.62	7.5	-
	건과, 생과실	0.46	31.09	38.9
	살구즙 (apricot nectar), 통조림 (아스코르빈산 첨가)	0.09	84.87	13.5
자두 (plum)	생과실	0.62	85.2	7.5
자바자두 (java-plum)	Jambolan, 생과실	0.23	83.13	-
체리 (cherries)	Red, sour, 생과실	0.3	86.13	8.1
	Sweet, 생과실	0.96	80.76	14.6
넥타린 (nectarine)	생과실	0.46	86.28	8.5
비파 (loquat)	생과실	0.2	86.73	-
피탕카 (pitanga)	Surinam-cherry, 생과실	0.4	90.81	-
사포딜라 (sapodilla)	생과실	1.1	78	-

5-4) 장과류 및 기타 소과실류 (Berries and other small fruits)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
포도 (grape)	American type, 생과실	0.35	81.3	16.4
	European type, 생과실	0.58	80.56	18.1
	건포도 (raisin), golden, 씨 없음	0.46	14.97	-
	건포도 (raisin), 씨 있음	0.54	16.57	-
	건포도 (raisin), 씨 없음	0.46	15.42	61.7
	포도즙 (grape juice), 무가당	0.08	84.12	14.2
딸기 (strawberry)	생과실	0.37	91.57	5.7
산딸기 (raspberry)	생과실	0.55	86.57	-
무화과 (fig)	생과실	0.3	79.11	6.9
오디 (mulberry)	생과실	0.39	87.68	-
월귤 (cranberry)	생과실	0.2	86.54	-
커런트 (currants)	European black, 생과실	0.41	81.96	8
	Red 및 white	0.2	83.95	8
블랙베리 (blackberry)	생과실	0.39	85.64	7.9
블루베리 (blueberry)	생과실	0.38	84.61	7.3
엘더베리 (elderberry)	생과실	0.5	79.8	-
구스베리 (gooseberry)	생과실	0.58	87.87	-
꽈리 (ground cherry)	Cape-gooseberry 또는 poha, 생과실	0.7	85.4	-
오헬로베리(Oheloberry)	생과실	0.22	92.3	-

5-5) 열대과실류 (Tropical/sub-tropical fruits)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
바나나 (banana)	생과실	0.48	74.26	18.4
	Red, 생과실	0.2	74.4	-
파인애플 (pineapple)	생과실	0.43	86.5	11.9
키위 (kiwifruit)	생과실	0.44	83.05	8.9
아보카도 (avocado)	캘리포니아산, 생과실	17.33	72.56	0.9
	플로리다산, 생과실	8.87	79.73	-
파파야 (papaya)	생과실	0.14	88.83	5.9
망고 (mango)	생과실	0.27	81.71	14.8
구아바 (guava)	일반, 생과실	0.6	86.1	6
	Strawberry, 생과실	0.6	80.66	-
여주 (balsam-pear)	Leafy tips, 생과실 (raw)	0.69	89.25	0.8
	꼬투리, 생과실	0.17	94.03	0.8
오렴자 (carambola)	Starfruit, 생과실	0.35	90.92	7.1
체리모야 (cherimoya)	생과실	0.4	73.5	-
커스터드애플 (custard-apple)	생과실	0.6	71.5	-
잭푸르트 (jackfruit)	생과실	0.3	73.23	18.4
리치 (litchi)	생과실	0.44	81.76	-
	건과	1.2	22.3	-
롱간 (longan)	생과실	0.1	82.75	-
	건과	0.4	17.6	-
패션푸르트 (passion-fruit)	Granadilla, purple, 생과실	0.7	72.93	11.2
플랜테인 (plantain)	생과실	0.37	65.28	-
사포테 (sapotes)	Marmalade plum, 생과실	0.6	62.43	-

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
빵나무열매 (breadfruit seed)	삶은 열매	2.3	59.3	-
	생과실	5.59	56.27	-
타마린드 (tamarinds)	생과실	0.6	31.4	-
로젤 (roselle)	생과실	0.64	86.58	-
샤워솝 (soursop)	Guanabana, 생과실	0.3	81.16	-
슈거 애플 (sugar-apple)	반려지 과실 (sweetsop), 생과실	0.29	73.23	-
아세로라즙 (acerola juice)	생과실	0.3	94.3	-

6) 채소류 (Vegetables)

6-1) 엽경채류 (Leaf/stem vegetables)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
배추 (cabbage)	Chinese, pak-choi, 생채소	0.2	95.32	1
	Chinese, pe-tsai, 생채소	0.2	94.39	1.3
양배추 (cabbage)	일반형, 생채소	0.18	92.52	2.7
	적채 (red), 생채소	0.26	91.55	5.4
	Savoy, 생채소	0.1	91	2.9
공심채 (swamp cabbage)	Skunk cabbage, 생채소 (raw)	0.2	92.47	-
방울다다기양배추 (brussels sprouts)	생채소	0.3	86	2.2
꽃양배추 (cauliflower)	생채소	0.18	92.26	2.2
브로콜리 (broccoli)	생채소	0.35	90.69	1.6
상추 (lettuce)	Looseleaf, 생채소	0.3	94	-
양상추 (lettuce)	Butterhead, 생채소	0.22	95.58	-
	Cos 또는 Romaine, 생채소	0.2	94.91	2
	Iceberg, 생채소	0.19	95.89	1.8
시금치 (spinach)	생채소	0.35	91.58	0.4
겨자 시금치 (mustard spinach)	Tendergreen, 생채소	0.3	92.2	-
번행초 (New Zealand spinach)	생채소	0.2	94	-
말라바시금치 (vine spinach)	Basella, 생채소	0.3	93.1	-
근대 (chard)	생채소	0.2	92.66	1.1
머위 (butterbur)	Fuki, 생채소	0.04	94.5	-
순무우 잎 (turnip green)	생채소	0.3	91.07	1

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
케일 (kale)	생채소	0.7	84.46	2.2
	Scotch, 생채소	0.6	87	2.2
콜라드 (collard)	생채소	0.22	90.55	-
냉이 (cress)	다닥냉이 (garden), 생채소	0.7	89.4	-
	양갓냉이 (watercress), 생채소	0.1	95.11	0.4
치커리 (chicory)	Green, 생채소	0.3	92	0.9
	Witloof, 생채소	0.1	95.1	-
꽃상추 (endive)	생채소	0.2	93.79	1.2
파슬리 (parsley)	생채소	0.3	88.31	1.1
고추냉이 잎 (horseradish leaf)	Leafy tips, 생채소	1.4	78.66	-
비름나물 (amaranth)		6.51	9.84	1.9
쇠비름 (purslane)	생채소	0.1	93.92	-
사탕무 잎 (beet green)	생채소	0.06	92.15	-
겨자채 (mustard green)	생채소	0.2	90.8	0.8
대황 (rhubarb)	생채소	0.2	93.61	0.9
파 (Welsh onion)	생채소	0.4	90.5	-
부추 (leek)	생채소	0.3	83	3.9
아스파라거스 (asparagus)	생채소	0.22	92.25	2.1
큰뿌리 셀러리 (celeriac)	생채소	0.3	88	2
셀러리 (celery)	생채소	0.14	94.64	1
셀터스 (celtuce)	생채소	0.3	94.5	1.7
죽순 (bamboo shoot)	생채소	0.3	91	-
순무양배추 (kohlrabi)	생채소	0.1	91	4.5
아티초크 (artichoke)	French, 생채소	0.15	84.94	2.2
보리지 (borage)	생채소	0.7	93	0.9
카르둔 (cardoon)	생채소	0.1	94	1.7

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
카우피 (cowpea)	Leafy tips, 생채소	0.25	89.78	-
민들레 잎 (dandelion green)	생채소	0.7	85.6	2.4
수영 (dock)	생채소	0.7	93	-
황마 (jute)	Potherb, 생채소	0.25	87.72	-
명아주 (lambsquarter)	생채소	0.8	84.3	-
미국자라공 순 (pokeberry shoot)	생채소	0.4	91.6	-
세스바니아 꽃 (sesbania flower)	생채소	0.04	91.58	-

6-2) 근채류 (Root and tuber vegetables)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
무 (radish root)	동양, 생채소	0.1	94.62	2.5
	서양, 생채소	0.54	94.84	2.7
	white icicle, 생채소	0.1	95.37	2.5
순무 (turnip)	생채소	0.1	91.87	3.8
양파 (onion)	생채소	0.16	89.68	4.1
	풋양파 (spring), 생채소	0.19	89.83	3.2
	쪽파 (shallot), 생채소	0.1	79.8	3.2
마늘 (garlic)	생채소	0.5	58.58	1
당근 (carrot)	생채소	0.19	87.79	6.6
생강 (ginger root)	생채소	0.73	81.67	-
연근 (lotus root)	생채소	0.1	79.1	-
우엉뿌리 (burdock root)	생채소	0.15	80.09	-
우엉 (salsify)	서양우엉, 생채소	0.2	77	2.9
사탕무 (beet)	생채소	0.14	87.32	5.9
파스닢 (parsnip)	생채소	0.3	79.53	4.8
고추냉이 (horseradish)	생채소	0.3	74.6	1.8
	꼬투리 (pods), 생채소	0.2	88.2	-
치커리 뿌리 (chicory root)	생채소	0.2	80	2.4
자고 (arrowhead)	생채소	0.29	72.48	-
뚱딴지 (Jerusalem-artichoke)	생채소	0.01	78.01	2.5
루타베가 (rutabaga)	생채소	0.2	89.66	5.6
마름 (water chestnut)	Chinese (matai), 생채소	0.1	73.46	4.8

6-3) 과채류 (Fruiting vegetables)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
오이 (cucumber)	생과실	0.13	96.05	2.3
호박 (squash)	겨울호박 전체, 생과실	0.23	88.72	2.2
	Scallop, 여름호박, 생과실	0.2	94.18	2.2
	Zucchini, 여름호박, 껍질포함, 생과실	0.14	95.28	2.2
	Acorn, 겨울호박, 생과실	0.1	87.78	2.2
	Butternut, 겨울호박, 생과실	0.1	86.41	2.2
	Hubbard, 겨울호박, 생과실	0.5	88	2.2
	Spaghetti, 겨울호박, 생과실	0.57	91.6	2.2
차요테 (chayote)	생과실	0.3	93	-
박 (gourd)	수세미용, 생과실	0.2	93.85	-
	조롱박 (calabash), 생과실	0.02	95.54	-
수박 (watermelon)	생과실	0.43	91.51	9
멜론 (melon)	Cantaloupe, 생과실	0.28	89.78	8.1
	Casaba, 생과실	0.1	92	-
	Honeydew, 생과실	0.1	89.66	-
동아 (waxgourd)	중국산 저장 메론, 생과실	0.2	96.1	1
토마토 (tomato)	일반, 성숙토마토 (red), 생과실	0.33	93.76	3.0
	풋토마토 (green), 생과실	0.2	93	2.7
고추 (pepper)	Hot chili, 풋고추 (green), 생과실	0.2	87.74	-
	Hot chili, 성숙고추 (red), 생과실	0.2	87.74	-
	단고추, 풋고추 (green), 생과실	0.19	92.19	2.5
	단고추, 성숙고추 (red), 생과실	0.19	92.19	-
가지 (eggplant)	생과실	0.1	91.93	3.4
오크라 (okra)	생과실	0.1	89.58	2.4

7) 버섯류 (Mushrooms)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
버섯 (mushroom)	생체	0.42	91.81	1.8
표고버섯 (shiitake)	건물	0.99	9.5	-
목이버섯 (jew's ear)	Pepeao, 생체	0.04	92.59	-

8) 향신료 (Herbs and spices)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
파슬리 (parsley)	건물	4.43	9.02	-
처벌 (chervil)	생체	0.9	80.7	-
차이브 (chives)	생체	0.6	92	1
고수 (coriander)	생체	0.59	92.8	-
	잎, 건물	4.78	7.3	-
	종실	17.77	8.86	-
회향 (fennel)	잎, 생체	0.4	90	-
	종실	14.87	8.81	-
아니스 종자 (anise seed)	종실	15.90	9.54	-
캐러웨이 종자 (caraway seed)	종실	14.59	9.88	-
셀러리 종자 (celery seed)	종실	25.27	6.04	-
커민 종자 (cumin seed)	종실	22.27	8.06	-
시라자 (dill seed)	종실	14.54	7.7	-
호로파 종자 (fenugreek seed)	종실	6.41	8.84	-
겨자 종자 (mustard seed)	Yellow, 종실	28.76	6.86	-
양귀비 종자 (poppy seed)	종실	44.70	6.78	-
사프란 (saffron)	종실	5.85	11.9	-
올스파이스 (allspice)	분쇄 분말	8.69	8.46	-
바질 (basil)	분쇄 분말	3.98	6.43	-
월계수 잎 (bay leaf)	분쇄 분말	8.36	5.44	-
카르다몸 (cardamom)	분쇄 분말	6.69	8.28	-
처벌 (chervil)	건물	3.9	7.2	-
고추 가루 (chili powder)		16.76	7.79	-
	Red 또는 cayenne	15.67	8.05	-

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
계피 (cinnamon)	분쇄 분말	3.19	9.52	-
정향 (cloves)	분쇄 분말	20.07	6.86	-
딜 위드 (dill weed)	건물	4.36	7.3	-
마늘 가루 (garlic powder)		0.76	6.45	-
생강 (ginger)	분쇄 분말	5.95	9.38	-
육두구 (mace)	분쇄 분말	32.38	8.17	-
마조람 (marjoram)	건물	7.04	7.64	-
육두구 (nutmeg)	분쇄 분말	36.31	6.23	-
양파 가루 (onion powder)		1.05	5.01	-
오레가노 (oregano)	분쇄 분말	10.25	7.16	-
파프리카 (paprika)		12.95	9.54	-
후추 (pepper)	Black	3.26	10.51	-
	White	2.12	11.42	-
로즈마리 (rosemary)	건물	15.22	9.31	-
세이지 (sage)	분쇄 분말	12.75	7.96	-
사보리 (savory)	분쇄 분말	5.91	9.00	-
타라곤 (tarragon)	분쇄 분말	7.24	7.74	-
백리향 (thyme)	분쇄 분말	7.43	7.79	-
강황 (turmeric)	분쇄 분말	9.88	11.36	-
참깨 버터 (sesame butter)	Tahini	48	3	-
카레 가루 (curry powder)		13.81	9.52	-

9) 조류 (Algae)

식 품 명	부위 또는 가공품	성분 함량 (%)		
		유지	수분	당
한천 (agar)	생체	0.03	91.32	-
딜스 (dulse)	생체	3.2	16.6	-
아이리쉬모스 (Irishmoss)	생체	0.16	81.34	-
다시마 (kelp)	생체	0.56	81.58	-
파래 (laver)	생체	0.28	85.03	-
스피룰리나 (spirulina)	생체	0.39	90.67	-
미역 (wakame)	생체	0.64	79.99	-

농약 색인

번호	농약명	분석법 번호	쪽
1	2,4-D	4.1.3.13	153
2	3-Hydroxycarbofuran	4.1.3.30	264
3	6-Benzyl aminopurine	4.1.4.106	621
4	Abamectin	4.1.3.12	146
5	Acephate	4.1.3.8	122
6	Acequinocyl	4.1.4.88	557
7	Acetamiprid	4.1.2.2 및 4.1.3.6	94, 115
8	Acibenzolar-S-methyl	4.1.4.75	518
9	Acrinathrin	4.1.2.2	92
10	Alanycarb	4.1.4.99	595
11	Aldicarb	4.1.2.2	94
12	Aldrin	4.1.2.2	92
13	Aluminium phosphide	4.1.4.2	304
14	Amisulbrom	4.1.2.2 및 4.1.4.127	94, 707
15	Amitraz	4.1.4.3	310
16	Anilazine	4.1.4.41	412
17	Anilofos	4.1.2.2	92
18	Azafenidin	4.1.2.2	94
19	Azimsulfuron	4.1.3.26	228
20	Azinphos-methyl	4.1.2.2	92
21	Azocyclotin	4.1.3.16	175
22	Azoxystrobin	4.1.2.2	94
23	Benalaxyl	4.1.4.42	416
24	Bendiocarb	4.1.2.2	94
25	Benfuracarb	4.1.3.30	264
26	Benfuresate	4.1.4.57	453
27	Benomyl	4.1.3.27	241
28	Bensulfuron-methyl	4.1.3.26	228
29	Bensultap	4.1.3.20	196

번호	농약명	분석법 번호	쪽
30	Bentazone	4.1.4.4	314
31	Benthiavalicarb-isopropyl	4.1.4.32	375
32	Benzobicyclon	4.1.4.107	626
33	Benzoximate	4.1.2.2 및 4.1.3.14	94, 159
34	BHC	4.1.2.2	92
35	Bifenazate	4.1.4.87	553
36	Bifenox	4.1.3.32	281
37	Bifenthrin	4.1.2.2	92
38	Bioresmethrin	4.1.3.5	105
39	Bispyribac-sodium	4.1.4.72	505
40	Bistrifluron	4.1.4.53	441
41	Boscalid	4.1.2.2 및 4.1.3.31	94, 274
42	Bromacil	4.1.2.2	92
43	Bromobutide	4.1.2.2 및 4.1.4.125	93, 696
44	Bromopropylate	4.1.2.2	92
45	Buprofezin	4.1.4.45	419
46	Butocarboxim	4.1.2.2	94
47	Cadusafos	4.1.2.2	92
48	Cafenstrole	4.1.4.108	630
49	Captafol	4.1.2.2	92
50	Captan	4.1.2.2	92
51	Carbaryl	4.1.2.2	94
52	Carbendazim	4.1.3.27	241
53	Carbofuran	4.1.2.2 및 4.1.3.30	94, 264
54	Carbophenothion	4.1.2.2	92
55	Carbosulfan	4.1.3.30	264
56	Carfentrazone-ethyl	4.1.4.90	565
57	Cartap	4.1.3.20	196
58	Chinomethionat	4.1.2.2	92
59	Chlorantraniliprole	4.1.2.2 및 4.1.4.134	94, 744
60	Chlordane	4.1.2.2	92
61	Chlorfenapyr	4.1.2.2	92
62	Chlorfluazuron	4.1.3.28	247

번호	농약명	분석법 번호	쪽
63	Chlorobenzilate	4.1.2.2	92
64	Chlorothalonil	4.1.2.2	92
65	Chlorpyrifos	4.1.2.2	92
66	Chlorpyrifos-methyl	4.1.2.2 및 4.1.4.8	92, 325
67	Chlorsulfuron	4.1.3.26	228
68	Chromafenozide	4.1.2.2 및 4.1.4.133	94, 739
69	Cinosulfuron	4.1.2.2 및 4.1.3.26	94, 228
70	Clethodim	4.1.3.17	181
71	Clofentezine	4.1.3.14	159
72	Clothianidin	4.1.2.2 및 4.1.3.6	94, 115
73	Cyazofamid	4.1.2.2 및 4.1.4.149	94, 762
74	Cycloprothrin	4.1.2.2	92
75	Cyclosulfamuron	4.1.3.26	228
76	Cyflufenamid	4.1.2.2 및 4.1.4.109	92, 633
77	Cyflumetofen	4.1.4.11	329
78	Cyfluthrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
79	Cyhalofop-butyl	4.1.2.2	94
80	Cyhalothrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
81	Cyhexatin	4.1.3.16	175
82	Cymoxanil	4.1.2.2	94
83	Cypermethrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
84	Cyproconazole	4.1.2.2 및 4.1.3.33	92, 290
85	Cyprodinil	4.1.2.2	92
86	Cyromazine	4.1.4.40	408
87	Dymron	4.1.4.68	487
88	Dazomet	4.1.4.86	549
89	DBEDC	4.1.4.121	677
90	DDT	4.1.2.2	92
91	Deltamethrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
92	Diazinon	4.1.2.2	92
93	Dicamba	4.1.3.13	153
94	Dichlofluanid	4.1.2.2 및 4.1.4.1	92, 299
95	Dichlorprop	4.1.4.69	492

번호	농약명	분석법 번호	쪽
96	Dichlorvos	4.1.2.2	93
97	Dicloran	4.1.2.2	92
98	Dicofol	4.1.2.2	92
99	Dieldrin	4.1.2.2	92
100	Diethofencarb	4.1.2.2	92
101	Difenoconazole	4.1.3.23	214
102	Diflubenzuron	4.1.3.28	247
103	Dimepiperate	4.1.2.2	92
104	Dimethametryn	4.1.4.119	668
105	Dimethenamid	4.1.2.2	92
106	Dimethoate	4.1.2.2	92
107	Dimethomorph	4.1.2.2	94
108	Dimethyldithiocarbamates	4.1.3.21	202
109	Dimethylvinphos	4.1.2.2	92
110	Diniconazole	4.1.2.2 및 4.1.3.33	92, 290
111	Dinotefuran	4.1.3.6	115
112	Diphenamid	4.1.2.2	92
113	Diphenylamine	4.1.2.2	92
114	Dithianon	4.1.4.55	445
115	Dithiopyr	4.1.2.2	92
116	Edifenphos	4.1.2.2 및 4.1.3.10	92, 134
117	Emamectin benzoate	4.1.4.59	456
118	Endosulfan	4.1.2.2	92
119	Endrin	4.1.2.2	92
120	EPN	4.1.2.2	92
121	Esprocarb	4.1.2.2	92
122	Ethaboxam	4.1.2.2	94
123	Ethalfluralin	4.1.3.32	281
124	Ethephon	4.1.4.46	423
125	Ethiofencarb	4.1.2.2	94
126	Ethion	4.1.2.2	92
127	Ethoprophos	4.1.2.2 및 4.1.4.13	92, 333
128	Ethoxysulfuron	4.1.3.26	228
129	Ethychlozate	4.1.4.73	509

번호	농약명	분석법 번호	쪽
130	Ethylenebis (dithiocarbamate)s	4.1.3.21	202
131	Etofenprox	4.1.4.47	427
132	Etoxazole	4.1.2.2	92
133	Etrimfos	4.1.2.2 및 4.1.4.16	92, 337
134	Famoxadone	4.1.4.60	461
135	Fenamidone	4.1.2.2	92
136	Fenarimol	4.1.2.2 및 4.1.3.23	92, 214
137	Fenazaquin	4.1.2.2 및 4.1.3.14	92, 159
138	Fenbuconazole	4.1.2.2 및 4.1.3.23	92, 214
139	Fenbutatin oxide	4.1.4.31	370
140	Fenclorim	4.1.4.110	637
141	Fenhexamid	4.1.2.2	94
142	Fenitrothion	4.1.2.2	92
143	Fenobucarb	4.1.2.2	92
144	Fenothiocarb	4.1.3.14	159
145	Fenoxanil	4.1.2.2	92
146	Fenoxycarb	4.1.2.2	92
147	Fenpropathrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
148	Fenpyroximate	4.1.2.2 및 4.1.3.14	94, 159
149	Fensulfothion	4.1.3.10	134
150	Fenthion	4.1.2.2 및 4.1.3.11	92, 138
151	Fentin acetate	4.1.3.18	190
152	Fentin chloride	4.1.3.18	190
153	Fentin hydroxide	4.1.3.18	190
154	Fentrazamide	4.1.4.93	573
155	Fenvalerate	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
156	Ferimzone	4.1.2.2 및 4.1.4.100	94, 599
157	Fipronil	4.1.2.2	92
158	Flonicamid	4.1.2.2 및 4.1.4.111	92, 640
159	Fluacrypyrim	4.1.2.2 및 4.1.4.101	94, 603
160	Fluazinam	4.1.2.2	92
161	Flubendiamide	4.1.2.2 및 4.1.4.135	94, 749
162	Flucetosulfuron	4.1.3.26	228

번호	농약명	분석법 번호	쪽
163	Flucythrinate	4.1.3.5	105
164	Fludioxonil	4.1.2.2	92
165	Flufenacet	4.1.2.2	94
166	Flufenoxuron	4.1.2.2	247
167	Flumioxazine	4.1.2.2	94
168	Fluopicolide	4.1.4.112	643
169	Fluoroimide	4.1.4.61	465
170	Flupyrazofos	4.1.2.2	92
171	Fluquinconazole	4.1.2.2 및 4.1.3.22	94, 208
172	Fluroxypyr	4.1.4.94	579
173	Flusilazole	4.1.2.2 및 4.1.3.33	92, 290
174	Flusulfamide	4.1.2.2	92
175	Flutolanil	4.1.2.2 및 4.1.3.31	92, 274
176	Fluvalinate	4.1.2.2 및 4.1.3.5	92, 105
177	Folpet	4.1.2.2	92
178	Forchlorfenuron	4.1.2.2	94
179	Fosetyl-aluminium	4.1.4.80	537
180	Fosthiazate	4.1.2.2	93
181	Fthalide	4.1.2.2	93
182	Furathiocarb	4.1.2.2 및 4.1.3.30	93, 264
183	Glyphosate	4.1.4.18	341
184	Halosulfuron-methyl	4.1.3.26	228
185	Haloxyfop	4.1.4.63	468
186	Heptachlor	4.1.2.2	93
187	Hexaconazole	4.1.3.23	214
188	Hexaflumuron	4.1.2.2 및 4.1.3.28	94, 247
189	Hexazinone	4.1.4.49	432
190	Hexythiazox	4.1.3.14	159
191	Hymexazol	4.1.4.84	545
192	Imazalil	4.1.2.2 및 4.1.4.19	93, 345
193	Imazosulfuron	4.1.3.26	228
194	Imibenconazole	4.1.2.2 및 4.1.3.22	94, 208
195	Imidacloprid	4.1.3.6	115
196	Inabenfide	4.1.4.76	523

번호	농약명	분석법 번호	쪽
197	Indanofan	4.1.2.2	93
198	Indoxacarb	4.1.2.2	93
199	Iodosulfuron-methyl-sodium	4.1.3.26	228
200	Iprobenfos	4.1.2.2	93
201	Iprodione	4.1.2.2	93
202	Iprovalicarb	4.1.2.2	93
203	Isazofos	4.1.2.2	93
204	Isofenphos	4.1.2.2	93
205	Isoprocarb	4.1.2.2	94
206	Isoprothiolane	4.1.2.2	93
207	Kresoxim-methyl	4.1.2.2	93
208	Lufenuron	4.1.2.2 및 4.1.3.28	94, 247
209	Malathion	4.1.2.2	93
210	Mandipropamid	4.1.4.116	655
211	MCPA	4.1.4.130	722
212	MCPB	4.1.3.24	222
213	Mecarbam	4.1.2.2	93
214	Mecoprop-P	4.1.4.102	606
215	Mefenacet	4.1.2.2	93
216	Mepanipyrim	4.1.2.2	94
217	Mepiquat chloride	4.1.4.71	500
218	Mepronil	4.1.2.2 및 4.1.3.31	93, 274
219	Mesotrione	4.1.4.117	659
220	Metaflumizone	4.1.4.123	687
221	Metalaxyl	4.1.4.21	349
222	Metaldehyde	4.1.4.118	664
223	Metamifop	4.1.2.2 및 4.1.4.122	94, 682
224	Metam-sodium	4.1.4.70	497
225	Metconazole	4.1.2.2 및 4.1.4.97	93, 588
226	Methabenzthiazuron	4.1.2.2	94
227	Methamidophos	4.1.3.8	122
228	Methidathion	4.1.2.2	93
229	Methiocarb	4.1.2.2	94

번호	농약명	분석법 번호	쪽
230	Methomyl	4.1.2.2 및 4.1.3.15	94, 168
231	Methoxychlor	4.1.2.2	93
232	Methoxyfenozide	4.1.2.2	94
233	Metolachlor	4.1.3.32	281
234	Metolcarb	4.1.2.2	94
235	Metrafenone	4.1.2.2 및 4.1.4.124	93, 692
236	Metribuzin	4.1.4.24	353
237	Metsulfuron-methyl	4.1.3.26	228
238	Milbemectin	4.1.3.12	146
239	Molinate	4.1.2.2	93
240	Monocrotophos	4.1.3.8	122
241	Myclobutanil	4.1.2.2 및 4.1.3.23	93, 214
242	Nitrapyrin	4.1.2.2	93
243	Nonachlor	4.1.2.2	93
244	Novaluron	4.1.2.2 및 4.1.3.28	94, 247
245	Nuarimol	4.1.2.2 및 4.1.3.23	93, 214
246	Ofurace	4.1.2.2	93
247	Omethoate	4.1.3.8	122
248	Orthosulfamuron	4.1.4.129	716
249	Orysastrobin	4.1.4.5	319
250	Oryzalin	4.1.4.64	474
251	Oxadiargyl	4.1.4.89	561
252	Oxadixyl	4.1.2.2	93
253	Oxamyl	4.1.2.2 및 4.1.3.15	94, 168
254	Oxaziclomefon	4.1.2.2	94
255	Oxolinic acid	4.1.4.128	711
256	Oxycarboxin	4.1.4.148	757
257	Oxyfluorfen	4.1.3.32	281
258	Paclobutrazol	4.1.2.2 및 4.1.3.23	93, 214
259	Parathion	4.1.2.2	93
260	Parathion-methyl	4.1.2.2 및 4.1.3.10	93, 134
261	Penconazole	4.1.2.2 및 4.1.3.33	93, 290
262	Pendimethalin	4.1.2.2	93

번호	농약명	분석법 번호	쪽
263	Penoxsulam	4.1.4.114	647
264	Pentoxazone	4.1.2.2	94
265	Permethrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	93, 105
266	Phenthoate	4.1.2.2	93
267	Phorate	4.1.3.11	138
268	Phosalone	4.1.2.2	93
269	Phosmet	4.1.2.2	93
270	Phosphamidone	4.1.2.2	93
271	Phoxim	4.1.4.26	357
272	Piperophos	4.1.2.2 및 4.1.4.136	93, 753
273	Pirimicarb	4.1.2.2	93
274	Pirimiphos-ethyl	4.1.2.2	93
275	Pirimiphos-methyl	4.1.2.2	93
276	Pretilachlor	4.1.3.32	281
277	Probenazole	4.1.2.2	93
278	Prochloraz	4.1.2.2	93
279	Procymidone	4.1.2.2 및 4.1.4.27	93, 362
280	Profenofos	4.1.2.2	93
281	Profoxydim	4.1.3.17	181
282	Promecarb	4.1.2.2	94
283	Propamocarb	4.1.4.29	366
284	Propiconazole	4.1.3.9	129
285	Propineb	4.1.3.21	202
286	Propisochlor	4.1.2.2	93
287	Propoxur	4.1.2.2	94
288	Prothiofos	4.1.2.2	93
289	Pymetrozine	4.1.4.56	449
290	Pyraclofos	4.1.2.2	93
291	Pyraclostrobin	4.1.2.2	94
292	Pyrazolate	4.1.2.2	94
293	Pyrazophos	4.1.2.2	93
294	Pyrazosulfuron-ethyl	4.1.3.26	228
295	Pyrazoxyfen	4.1.4.83	541
296	Pyribenzoxim	4.1.2.2 및 4.1.4.120	94, 673

번호	농약명	분석법 번호	쪽
297	Pyributicarb	4.1.2.2	94
298	Pyridaben	4.1.2.2 및 4.1.3.14	93, 159
299	Pyridalyl	4.1.2.2 및 4.1.4.103	93, 609
300	Pyriftalid	4.1.4.96	584
301	Pyrimethanil	4.1.2.2	94
302	Pyrimidifen	4.1.2.2	93
303	Pyriminobac-methyl	4.1.2.2	93
304	Pyriproxyfen	4.1.2.2	94
305	Pyroquilon	4.1.2.2 및 4.1.3.29	94, 256
306	Quinalphos	4.1.2.2 및 4.1.4.105	93, 617
307	Quinclorac	4.1.4.77	528
308	Quinmerac	4.1.4.132	733
309	Quinoclamine	4.1.2.2 및 4.1.4.131	94, 728
310	Quintozene	4.1.2.2	93
311	Sethoxydim	4.1.3.17	181
312	Simeconazole	4.1.2.2 및 4.1.4.115	93, 651
313	Simetryn	4.1.4.74	514
314	Spinetoram	4.1.4.126	701
315	Spinosad	4.1.4.66	478
316	Spirodiclofen	4.1.2.2	94
317	Spiromesifen	4.1.4.104	613
318	Tebuconazole	4.1.3.33	290
319	Tebufenozide	4.1.2.2	94
320	Tebufenpyrad	4.1.2.2 및 4.1.3.14	93, 159
321	Tebupirimfos	4.1.2.2	93
322	Teflubenzuron	4.1.2.2 및 4.1.3.28	94, 247
323	Tefluthrin	4.1.2.2	93
324	Terbufos	4.1.2.2 및 4.1.3.11	93, 138
325	Terbutylazine	4.1.2.2	94
326	Tetraconazole	4.1.4.79	533
327	Tetradifon	4.1.2.2	93
328	Thenylchlor	4.1.2.2 및 4.1.3.32	94, 281
329	Thiabendazole	4.1.3.27	241
330	Thiacloprid	4.1.2.2 및 4.1.3.6	94, 115

번호	농약명	분석법 번호	쪽
331	Thiamethoxam	4.1.2.2 및 4.1.3.6	94, 115
332	Thiazopyr	4.1.2.2	93
333	Thidiazuron	4.1.4.92	570
334	Thifensulfuron-methyl	4.1.3.26	228
335	Thifluzamide	4.1.2.2	93
336	Thifluzamide	4.1.3.31	274
337	Thiobencarb	4.1.4.33	379
338	Thiocyclam	4.1.3.20	196
339	Thiodicarb	4.1.2.2 및 4.1.4.34	94, 383
340	Thiometon	4.1.2.2	93
341	Thiram	4.1.4.67	482
342	Tiadinil	4.1.2.2	94
343	Tolclofos-methyl	4.1.2.2 및 4.1.4.50	93, 438
344	Tolylfluanid	4.1.2.2	93
345	Tralomethrin	4.1.2.2 및 4.1.3.5	93, 105
346	Triadimefon	4.1.2.2 및 4.1.4.35	93, 388
347	Triadimenol	4.1.3.9	129
348	Triazamate	4.1.4.98	592
349	Triazophos	4.1.2.2	93
350	Trichlorfon	4.1.4.36	394
351	Triclopyr	4.1.3.24	222
352	Tricyclazole	4.1.2.2 및 4.1.3.29	94, 256
353	Trifloxystrobin	4.1.2.2	94
354	Triflumizole	4.1.2.2 및 4.1.4.37	93, 400
355	Triflumuron	4.1.2.2 및 4.1.3.28	93, 247
356	Trifluralin	4.1.3.32	281
357	Triforine	4.1.4.38	404
358	Trimethacarb	4.1.2.2	94
359	Vamidothion	4.1.3.8	122
360	Vinclozoline	4.1.2.2	93
361	Zoxamide	4.1.2.2	93

식품공전 잔류농약 분석법
실무 해설서

2009년 7월 초판 인쇄
2011년 3월 1차 증보판 발행 (제2판)
2012년 7월 2차 증보판 발행 (제3판)

발 행 인 이 광 호

저 자 대구대학교 이영득

편집위원장 이 상 재

편 집 위 원 황인균, 오재호, 장문익, 도정아, 강일현,
조윤제, 이상목

발 행 처 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 화학물질과

충북 청원군 오송읍 오송생명2로 187 오송보건의료행정타운(363-700)
TEL 043-719-4207, FAX. 043-719-4200

식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서

– 제3판 –

청렴韓세상

KOREA
FOOD & DRUG
ADMINISTRATION