

사과, 감귤, 고추 및 배추에서 생장조절제 Forchlorfenuron의 HPLC-DAD/MS 분석법 확립

정명근¹ · 이진욱² · 이영득³ · 황영선⁴ · 강인규^{5*}

¹강원대학교 생약자원개발학과, ²중앙대학교 생명자원공학부, ³대구대학교 생명환경학부, ⁴텍사스주립대학교 생물학과, ⁵경북대학교 원예과학과

A Method for Determining Forchlorfenuron Levels in Apple, Mandarin, Green Pepper, and Kimchi Cabbage using HPLC-DAD/MS

Myoung-Gun Choung¹, Jinwook Lee², Young Deuk Lee³, Young-Sun Hwang⁴, and In-Kyu Kang^{5*}

¹Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

³Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

⁴Department of Biology, University of Texas-Arlington, Arlington, TX 76019, USA

⁵Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

*Corresponding author: koussa@cau.ac.kr

Abstract

Forchlorfenuron is a plant growth regulator that is currently utilized to accelerate cell division and cell expansion, and promote organ formation and protein synthesis in plants. This experiment was conducted to establish a method for determining forchlorfenuron residues in fruits and vegetables using HPLC-DAD/MS. Forchlorfenuron residue was extracted with acetone from apple, mandarin, green pepper, and kimchi cabbage. The extract was diluted with a large volume of saline water and directly partitioned into dichloromethane to remove the polar co-extractives in the aqueous phase. The extract was purified by optimized Florisil column chromatography. Forchlorfenuron was successfully separated from co-extractives on an octadecylsilyl column in HPLC and quantified by ultraviolet absorption at 265nm with no interference. The accuracy and precision of the proposed method was validated by a recovery experiment of each sample fortified with forchlorfenuron at 3 concentrations per sample in triplicate. Mean recoveries ranged from 75.2 to 94.4% in the four samples. The coefficients of variation were all less than 10%, irrespective of sample type and fortification levels. The limit of quantification of forchlorfenuron was 0.02mg·kg⁻¹ as verified by the recovery experiment. A method using LC/MS with a selected-ion monitoring technique was also conducted to confirm the identity of the suspected residue. This method is useful for routine analysis of forchlorfenuron residues in apple, mandarin, green pepper, and kimchi cabbage.

Additional key words: limit of quantitation, residues, selected-ion monitoring

Received: January 13, 2017

Revised: April 12, 2017

Accepted: April 19, 2017

 OPEN ACCESS



HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY
35(5):656-666, 2017
URL: <http://www.kjhst.org>

pISSN : 1226-8763
eISSN : 2465-8588

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright©2017 Korean Society for Horticultural Science.

This study was carried out with the support of Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea in 2016(Project No.: 16162MFD5020), and 2016 Research Grant from Kangwon National University(No. 620160100).

서 언

농약의 일종인 식물성장조절제는 등록 및 사용에 규제가 있으며, 생물체에 선택적으로 작용해야 함은 물론 살포량 또한 조절되어야 하나 실제로는 그렇지 않은 경우가 많아 안전성 평가가 반드시 이루어져야 할 과제이며(Hodgson, 2004), 이를 통해 소비자의 신뢰를 구축함으로써 국내 농산물 소비 촉진에 기여할 수 있을 것이다.

Forchlorfenuron[1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea, Table 1]은 참외, 포도, 수박 등의 착과 증진 및 과실 비대 촉진에 따른 과중을 증대시키는 목적으로 사용되고 있으며(Chung et al., 2002; Lee et al., 2012; Um et al., 1995), 천연 옥신과의 상승 작용을 통해 식물의 세포분열 및 횡 방향 성장을 촉진하고, 저장성을 향상시키는 phenylurea계 성장조절제이다(US EPA, 2004). 국내에서는 키위, 수박, 포도, 참외, 멜론, 호박 및 산후수의 과실 비대, 착과 증진에 주로 사용되며(KCPA, 2015), 국내 농약잔류허용기준(Maximum Residue Limits; MRL)은 $0.05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 로 설정되어 있다(MFDS, 2014).

Forchlorfenuron의 물리화학적 특성으로 n-octanol/water 분배계수(Log Pow)는 3.2로 중간 극성인 중성화합물이고, 녹는 점은 $165\text{--}170^\circ\text{C}$ 이며, 분자량은 $247.68(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O})$ 로 흰색에 가까운 유리상의 분말 형태이다(APVMA, 2005). 다양한 유기용매에 잘 녹으며(acetone 169.0g, isopropanol 74.0g, ethyl acetate 24.0g, dichloromethane $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 물에 대한 용해도는 $39\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 수준이며, 자연조건에서의 분해시간(DT_{50})은 암조건의 토양 내에서는 약 578일, 수중에서는 약 30일 정도로 알려져 있다(APVMA, 2005).

Phenylurea계 식물성장조절제인 forchlorfenuron의 잔류분석은 LC-MS/MS(liquid chromatograph-tandem mass spectrometry) 혹은 LC-TOF/MS(liquid chromatograph-time of flight mass spectrometry)를 이용한 분석법이 보고된 바 있으나(Valverde et al., 2010; Negre et al., 2014), 이들 선행 연구결과들은 모두 정제과정의 부재와 더불어 다양한 원예작물의 적용성이 평가되어 있지 않았으며, 더구나 일반적 범용 분석기기인 HPLC-DAD를 이용한 분석체계가 아닌 고가의 질량분석기를 적용한 분석체계로 이루어져 있다. 한편 forchlorfenuron은 인축에 장기간 노출 시 단백질 대사 장애 및 경증의 폐부종을 유발하는 등(Hu et al., 2008), 건강상의 문제를 야기할 수 있기 때문에 섭취 시 안전성을 제고하기 위해 범용적 정밀 분석법이 요구되더라도 불구하고 실제 다양한 원예산물을 대상으로 해당 식물성장조절제의 분석조건 확립 및 회수율 등에 대한 연구는 매우 미미하다.

따라서 본 연구는 국내 주요 원예작물 중 과일류로 사과와 감귤, 채소류로 고추와 배추를 대상으로 하여 phenylurea계 성장조절제 forchlorfenuron의 실제 사용에 대한 소비자의 안전 신뢰도를 높일 수 있도록 다양한 원예작물에 확대 적용할 수 있는 최적의 분석기술을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험 재료

시험재료는 국내 농약 잔류허용기준(MFDS, 2014) 중 forchlorfenuron의 사용이 등록되어 있는 원예작물, Codex의 잔류분석법 대상 대표 작물군(Codex, 2003) 및 다양한 원예산물에 적용 가능한 일상적 분석법을 확립하기 위하여 국내의 주요 작물 이면서 소비량이 많은 과일류인 사과와 감귤, 채소류인 고추와 배추를 선정하여 각 생육기간 중 식물성장조절제인 forchlorfenuron을 전혀 처리하지 않은 시료를 시험재료로 사용하였다. 시험재료 중 사과는 대구광역시 소재 경북대학교 내 시험포장에서 재배한 후지(*Malus domestica* Borkh 'Fuji') 품종을 10월 31일에, 고추는 슈퍼마니타(*Capsicum annum* L. 'Super Manita') 품종을 7월 20일에 수확하였다. 감귤은 제주도 서귀포시 소재의 농가에서 홍진조생(*Citrus unshiu* Marc. 'Satsuma') 품종을 11월 5일에 수확하였고, 배추는 춘광(*Brassica campestris* L. 'Choongwang') 품종을 강원도 삼척에 위치한 독농가에서 재배하여 7월 25일 수확하였다. 시험재료는 수확후 분석시료를 채취한 후 -80°C 에 동결한 다음 사용하였다. 각 원예작물의 대

표 시험재료들은 식품공전 검체 처리방법(MFDS, 2012)에 따라 전처리한 후 사용하였고, 대조구 시료는 잔류농약 검사를 수행하여 forchlorfenuron 무처리 시료임을 확인하였다.

Forchlorfenuron의 분석용 표준품은 순도 98.7% 이상인 것을 Dr. Ehrenstorfer GmbH(Germany)에서 구입하여 사용하였다. 표준품은 acetonitrile에 녹여 $1,000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도가 되도록 조제한 stock solution을 -20°C 의 냉동고에 보관하면서 필요 시 acetonitrile로 희석하여 사용하였다. J.T. Baker(USA)에서 구입한 Florisil(60–100mesh)의 경우 130°C 에서 하루 이상 가열하여 활성화시킨 후 사용하였다(Ahn et al., 2014). Deionized water는 J.T. Baker(USA)에서 HPLC용을 구입하여 사용하였으며, dichloromethane, acetone, n-hexane, ethyl acetate 및 acetonitrile는 잔류분석용을, 기타 유기용매 및 시약은 특급 혹은 잔류분석용을 사용하였다. 시료의 균질은 고속 균질기(IKA, Ultra-Turrax T-25, USA)를 사용하였고, 감압농축기는 Eyela NE-1000SW(Japan)를 이용하였다.

HPLC-UVD/MS 기기분석 조건

Forchlorfenuron은 분자구조 내에 urea기를 포함하고 있어 비교적 휘발성이 낮고 고온에서 열분해의 가능성이 있어 GLC(gas liquid chromatography) 분석이 불가능하다. 따라서 forchlorfenuron의 분석에는 HPLC를 이용하고, forchlorfenuron 분자구조 내의 urea기에 착안하여 240nm 이상의 자외부 흡광이 예상되므로 검출기로는 자외흡광다이오드검출기(diode array detector; DAD)를 이용하였다. DAD를 장착한 HPLC는 Agilent(USA) 1200 series를, 분리용 column은 YMC-Pack Pro C18 RS($4.6\times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$)를 이용하였다. 잔류분 재확인을 위해 사용된 LC/MS(liquid chromatograph/mass spectrometry)는 Agilent(USA) 6110 Quadrupole LC/MS를 사용하였고, 각각의 분석조건은 Table 2와 Table 3에 나타내었다.

표준검량선 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

Forchlorfenuron의 stock solution을 재희석하여 표준용액의 농도가 $0.01\text{--}10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 가 되도록 각각 조제한 후 각 $20\mu\text{L}$ 씩을 HPLC에 주입하여 분석된 peak의 면적값을 기준으로 표준검량선을 작성하였다. 또한, 분석기기의 재현성(reproducibility)을 검증하기 위해 $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 수준의 forchlorfenuron 표준용액을 HPLC에 연속해서 15회 주입한 후 크로마토그램에서의 retention time(RT)과 peak 면적의 변이를 비교, 평가하였다.

LOQ는 무처리 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 뒤, 시료량 및 분석기기의 정량한계와 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 산출하였으며(Lee et al., 2010), 동일 수준으로 forchlorfenuron을 처리하여 회수율을 검토하였다.

시료의 추출 및 분배

각각의 시료 25g에 acetone을 100mL 가하고, 균질기를 이용해 2분 정도 고속마쇄($12,000\text{rpm}$), 추출하였다. 추출물은 여과지(Toyo No. 6, Japan)가 장착된 Buchner funnel 상에서 여과하였으며, 시료와 균질기 컵 모두를 acetone 40mL로 세척한 후 앞서의 여과액과 합쳤다. 합친 추출액을 1L 용량의 분액여두에 옮기고 포화식염수 50mL와 증류수 450mL를 첨가한 뒤 dichloromethane으로 50mL씩 2회 분배 추출하였다. 합한 dichloromethane 추출액은 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수하였고, 40°C 의 수욕 상에서 감압 농축 및 건조하였다. 모든 시료의 건조물은 n-hexane/ethyl acetate(65/35, v/v) 10mL로 재용해한 후 Florisil 흡착 크로마토그래피를 이용하여 추가적 정제를 실시하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피

130°C 에서 하루 이상 가열하여 활성화시킨 Florisil은 길이 40cm, 내경 1.5cm의 유리칼럼에 10g을 건식 충전한 후, 그 위에 3g 수준의 무수황산나트륨을 첨가하였다. 칼럼에 n-hexane 50mL를 가하고 상단에 소량의 n-hexane만 남을 정도로 유출시

켜 버린 후 n-hexane/ethyl acetate(65/35, v/v) 10mL에 녹인 시료액을 가하여 약 $3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 의 유속으로 흘려버렸다. 충전제의 표면이 드러나기 직전, 다시 n-hexane/ethyl acetate(65/35, v/v) 100mL를 흘려 용출시켜 버리고 재차 n-hexane/ethyl acetate(50/50, v/v) 150mL를 용출시켜 forchlorfenuron 성분을 회수하였다. Forchlorfenuron 분획은 40°C 의 수욕 상에서 감압 농축, 건조하고 잔류물을 acetonitrile 10mL에 재용해하여 HPLC로 분석하였다.

Forchlorfenuron의 회수율 검증

본 연구에서 확립한 forchlorfenuron의 잔류 분석법에 대한 분석 효율과 신뢰성의 검증을 위하여 실제 대표적 과일 및 채소 시료를 이용하여 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 각 무처리 대표 시료를 마쇄하고, 시료 25g에 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배에 해당되는 forchlorfenuron 표준용액을 각 3반복으로 처리하고 상기 일련의 분석과정을 수행하여 회수율 및 분석오차를 측정하였다.

결과 및 고찰

HPLC-DAD 분석조건

Forchlorfenuron의 최적 HPLC-DAD 분석파장을 결정하기 위해 acetonitrile에 녹인 표준품을 on-line HPLC-DAD를 이용하여 190-400nm의 범위에서 최대흡수파장(λ_{max})을 검토하였다. 흡수파장은 204nm 및 265nm에서 관찰되었으며(Fig. 1), forchlorfenuron의 흡수파장 가운데 204nm는 흡광계수가 가장 높아 분석 시 감도는 높게 나타나지만 시료 중 함께 추출되는

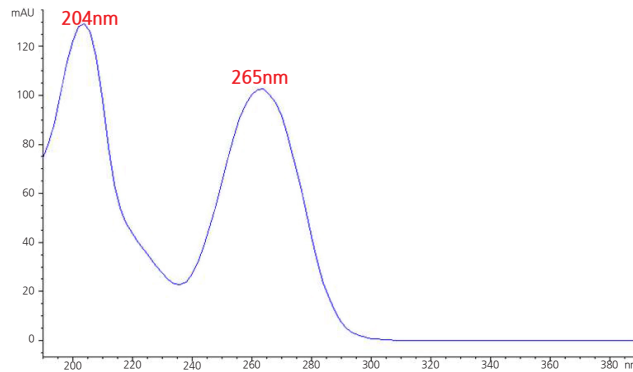


Fig. 1. UV absorption spectrum of forchlorfenuron.

Table 1. Physicochemical properties of forchlorfenuron (US EPA, 2004; APVMA, 2005)

Common name	Forchlorfenuron	
IUPAC name	1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea	
Physical chemistry	Molecular weight: 247.05 Melting point: 165-170°C Water solubility: 39 mg/L (20°C)	Molecular formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$ Log P_{ow} : 3.2 Vapor pressure: $4.6 \text{ our}^{-8} \text{ Pa}$ (25°C)
Chemical structure		

메트릭스 성분의 흡광 및 추출, 분석에 사용되는 용매의 자외선 흡광(UV cut-off)이 예상되므로 상대적으로 시료 추출물 및 이동상 용매에 의한 간섭이 작아 분석 시 forchlorfenuron에 대한 선택성이 우수하여, 204nm 대비 상대적으로 장파장인 265nm를 검출파장으로 선정하였다.

HPLC 분석용 column은 C18계열의 YMC-Pack Pro C18 RS(4.6 × 250mm, 5μm)를 이용하였으며, 이동상 용매는 forchlorfenuron이 해리되지 않는 중간극성의 화합물 임을 감안하여 acetonitrile 수용액을 사용하였다. 이동상인 acetonitrile 농도를 달리하여 RT 및 peak의 이론단수 등을 검토한 결과, 등용매용리(isocratic) 조건에서 acetonitrile/water(50/50, v/v) 혼합용액이 분리도 및 RT 측면에서 가장 적합한 양상을 나타내었으며(Fig. 2), 이때 forchlorfenuron의 머무름 시간은 7.4분이었다. 분리능과 감도를 증대시키기 위해 용매구배법(gradient elution)을 사용할 수도 있으나 이 경우 분석시간이 지연될 수 있고, RT의 재현성이 상대적으로 isocratic 조건에 비해 열등할 수 있다. 해당 분석법의 개발 목적은 시료 입수 후 단시간 내 분석 작업이 수행되어야 하는 일상적인 공정 분석용이므로 분석법의 안정성 측면에서 보다 유리한 isocratic 조건을 선정하였다.

분석기기의 정량한계는 크로마토그램 상에서 peak로 나타나는 대상 성분의 분석결과를 수치화하여 객관화하고 신뢰할 수 있는 한계의 농도로써, 크로마토그램에서 검출된 peak의 signal/noise(S/N) 비가 10 이상인 성분의 농도를 말한다(Fong et al., 1999; Miller, 2005). 상기에서 확립된 HPLC 분석조건(Table 2)에 따라 forchlorfenuron 표준용액을 분석한 후 S/N 비를 산출한 결과, 기기상의 정량한계(S/N ≥ 10)는 1ng이었다. 한편, 안정적인 기기분석 여부 및 재현성을 평가하기 위해 0.5mg·L⁻¹의 표준품을 15번 연속 주입, 분석하여 RT 및 peak 면적의 변이계수(CV, %)를 확인한 결과, 두 크로마토그래피 척도 모두에서 최대 0.88%의 변이를 나타내어 기기분석 시 재현성이 있고 안정적인 분석이 가능함을 확인하였다(Table 4). 한편, 농도별로 조제한 forchlorfenuron의 표준용액(0.01–10mg·L⁻¹)을 각각 20μL씩 HPLC에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 $y=159.9992x+1.0683$ ($R^2=0.999^{**}$)로 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 즉, forchlorfenuron은 기기분석 정량한계의 1/5 수준인 0.2ng에서부터 1,000배인 200ng까지의 표준검량선에 대한 회귀계수가 $R^2=0.999^{**}$ 이상으로 정량의 직선성이 우수하였으므로, 매우 광범위한 농도의 시료 내 잔류량을 비례적으로 산출하는 것이 가능하였다.

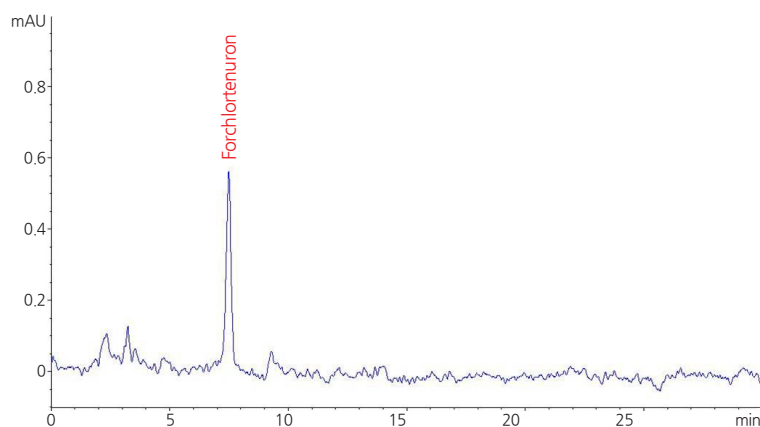


Fig. 2. HPLC chromatogram of a forchlorfenuron standard solution (20 μL of 0.05 mg·L⁻¹ in acetonitrile).

Table 2. HPLC-DAD operating parameters for the analysis of forchlorfenuron

Instrument	Agilent 1200 HPLC system
Detector	Diode array detector (DAD)
Column	YMC-Pack Pro C18 RS (4.6 × 250 mm, 5 μm)
Column temperature	40°C
Mobile phase	Acetonitrile/water (50/50, v/v)
Flow rate	1 mL·min ⁻¹
Wavelength	UV 265 nm
Sample size	20 μL

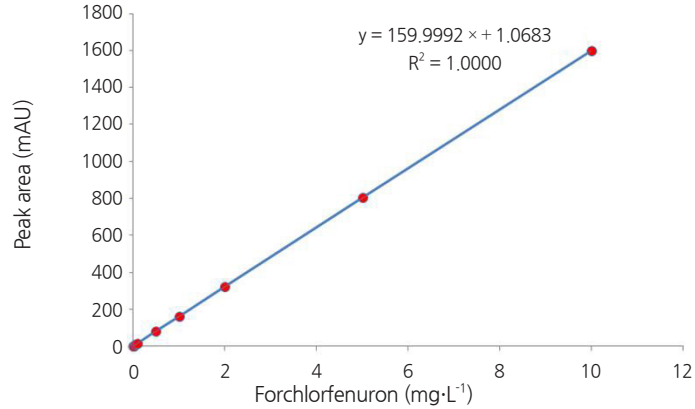


Fig. 3. Calibration curve of forchlorfenuron in HPLC.

Table 3. LC/MS operating parameters for the confirmation of forchlorfenuron

Instrument	Agilent 6110 Quadrupole LC/MS
Column	YMC-Pack Pro C ₁₈ RS (4.6 × 250 mm, 5 μm)
Column temperature	40°C
Mobile phase	Acetonitrile/10 mM ammonium acetate-water (50/50, v/v)
Flow rate	1 mL·min ⁻¹
Sample size	10 μL
Ionization	Electrospray ionization (ESI), positive-ion mode
Drying gas	N ₂ , 10.0 mL·min ⁻¹
Gas temperature	350°C
Capillary voltage	4.0 kV
Mass range (m/z)	50-600

Table 4. Reproducibility of peak area and retention time of forchlorfenuron using HPLC-DAD

Parameter	Retention time (min)	Peak area (mAU)
Minimum	7.541	80.3
Maximum	7.644	82.4
Mean	7.596	81.4
Standard deviation	0.03	0.66
Coefficient of variance (%)	0.46	0.81

시료 추출 및 분배과정의 확립

시료들의 forchlorfenuron 성분은 acetone을 이용하여 추출하였다. 추출액에서 forchlorfenuron 성분 이외에 함께 추출되는 방해물질을 제거하기 위한 1차적인 조정제법은 액-액 분배법을 적용하였다(AOAC, 2000; Lee et al., 2008). 액-액 분배법의 분배용매로는 n-hexane과 2종의 n-hexane/dichloromethane 혼합액 및 dichloromethane의 4종을 공시하여(Lee et al., 2011), 대상 성분에 대한 분배효율을 검토하였다(Table 5). 액-액 분배조건에 의한 forchlorfenuron 성분의 분배효율을 회수율을 통해 확인한 결과, 100mL의 n-hexane으로 분획하였을 때의 회수율은 5.1% 수준이었고, 100mL의 n-hexane/dichloromethane(80/20, v/v)으로 분획에서의 회수율은 64.2%, 100mL의 n-hexane/dichloromethane(20/80, v/v)으로 분획에서는 94.9%, dichloromethane 50mL씩 2회 반복하여 분획하였을 때는 99.3%의 회수율을 나타내어 분배용매의 극성 강도를 높임에 따라 forchlorfenuron의 회수율이 극히 향상되는 양상을 확인하였다. 따라서 가장 우수한 회수율을 나타낸 dichloromethane 50mL씩 2회 반복 분획하는 조건(분배용매 IV)을 forchlorfenuron 분배용매로 최종 선정하였다.

Table 5. Efficiency of liquid-liquid partition of crude extracts by different solvents for forchlorfenuron

Compound	Recovery (%) ^z			
	Partition I ^y	Partition II	Partition III	Partition IV
Forchlorfenuron	5.1 ± 0.0	64.2 ± 0.4	94.9 ± 0.4	99.3 ± 0.7

^zMean values of triplicate samples.^yPartition mixture: 150 mL acetone + 50 mL saturated NaCl + 450 mL distilled water.

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

Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건 최적화

시료에 포함된 forchlorfenuron의 잔류분석 시 상기의 액-액 분배과정을 통해 대부분의 불순물 및 비극성 간섭물질이 제거되었을 것으로 기대되지만 각 과일 및 채소 시료에 따라 유입되는 서로 다른 매트릭스 성분들이 존재하므로, 추가적 정제과정이 필요하다고 판단되어 흡착크로마토그래피에 따른 정제법을 추가적으로 검토하였다. 잔류농약 분석 시 정제과정에 가장 많이 이용되는 흡착크로마토그래피의 흡착제는 florisil, silica gel 및 alumina 등이며, 이 중 florisil은 지방과 색소의 제거에 뛰어난 특성으로 인해 미국 FDA(1999)와 AOAC(2000) 등에서 가장 흔하게 사용하는 흡착제이다. 본 연구 또한 forchlorfenuron의 극성을 고려하여 흡착제로 florisil을 선택하였으며, n-hexane/ethyl acetate 혼합용액의 극성조절을 통해 흡착크로마토그래피법의 용매체계를 최적화하였다(Table 6). 상기의 florisil 흡착크로마토그래피용 용매체계를 이용하여 forchlorfenuron의 회수율을 검토한 결과, n-hexane/ethyl acetate(65/35, v/v) 100mL로 pre-washing한 후, n-hexane/ethyl acetate(50/50, v/v) 150mL로 용출할 경우 forchlorfenuron 성분의 회수율이 96.1%로 우수하였으며, ethyl acetate의 비율을 55%로 조절하여 용출 용매의 강도를 높여도 회수율의 개선정도는 미미하였다. 따라서 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거를 위한 추가적인 정제법은 상기의 방법과 같이 적용하였다.

Forchlorfenuron의 분석 정량한계 및 회수율

본 연구에서 확립한 시료의 추출, 정제 및 기기분석 과정을 무처리 과일 및 채소 시료에 적용한 결과는 Fig. 4와 같다. 최종 과일 및 채소 시료용액으로부터 forchlorfenuron 성분과 동일한 머무름 시간대에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였으며, 분석기기의 LOQ와 시료량 및 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 본 분석법의 정량한계를 산출하였다.

Forchlorfenuron의 정량한계는 0.02mg·kg⁻¹이었으며, 이는 국제기준인 Codex(codex alimentarius commission, 2003)와 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(Lee, 2012)에서 제안하는 잔류농약 분석법 기준인 0.05mg·kg⁻¹ 이하 또는 허용기준의 1/2 이하의 정량한계 기준을 충족하였다.

각각의 무농약 시료에 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 forchlorfenuron 표준용액을 첨가하고, 상기에 서 확립한 분석방법으로 시료에 3반복으로 처리하여 회수율을 조사한 결과, 정량한계 수준에서는 75.2–91.7%, 정량한계 10배 수준에서는 87.8–92.9%, 정량한계 50배 수준에서는 86.0–94.9%의 양호한 회수율을 나타내었고, 재현성 역시 양호하여 분석 오차는 최대 7.1%로 조사되었다. 따라서, 처리수준과 시료의 종류에 상관없이 잔류분석 기준인 회수율 70–120% 범위와 분석

Table 6. Elution profile of forchlorfenuron on Florisil column chromatography

Elution solvent (v/v)	Recovery (%) ^z			
	0 - 50 mL	51 - 100 mL	101 - 150 mL	Total
65 : 35 ^y	0.0	0.0	5.2	5.2
50 : 50 ^x	41.1	43.2	11.7	96.1
45 : 55 ^x	47.6	40.0	9.3	96.9

^z10g of activated Florisil (60-100 mesh) was packed with solvent.^yn-Hexane/ethyl acetate (v/v).^xPre-washed with 100 mL of ^y solvent system, and then eluted n-hexane/ethyl acetate (v/v).

오차 10% 이내를 만족하는 결과를 도출하였다(Table 7). 이상의 결과에서 볼 때, 본 연구에서 확립된 forchlorfenuron의 분석법은 국내의 과일 및 채소의 forchlorfenuron 잔류 분석과 검사에 충분히 적용 가능성을 확인하였다.

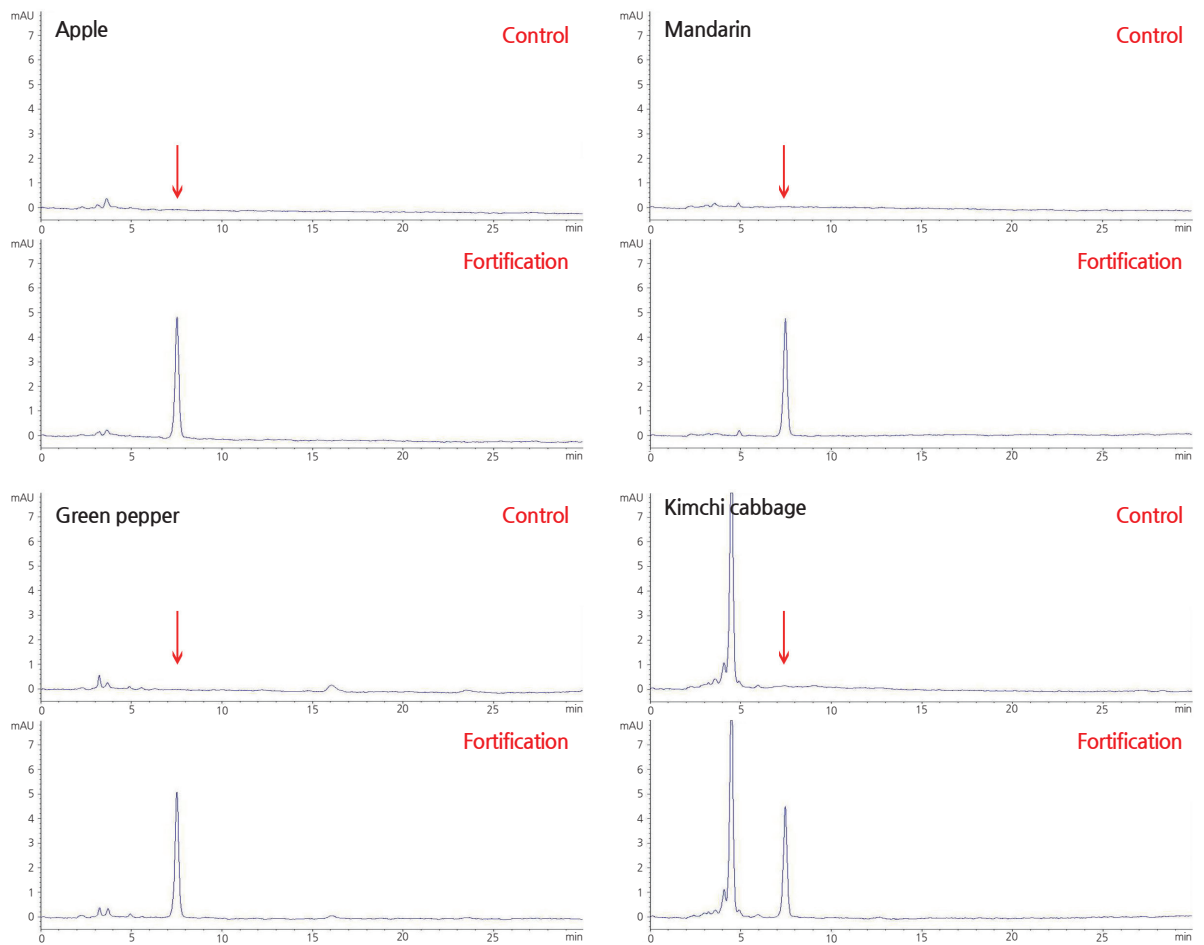


Fig. 4. HPLC chromatograms of sample extracts for the analysis of forchlorfenuron, fortified at ten-fold of the LOQ level.

Table 7. Elution profile of forchlorfenuron on Florisil column chromatography

Sample	Fortification (mg·kg ⁻¹)	Recovery (%)	CV (%)	LOQ (mg·kg ⁻¹)
'Fuji' Apple	0.02	91.7 ± 1.7 ^z	2.7	0.02
	0.2	92.9 ± 2.9	0.6	
	1	94.9 ± 4.9	1.0	
Satsuma Mandarin	0.02	89.3 ± 9.3	6.0	0.02
	0.2	87.9 ± 7.9	0.9	
	1	92.0 ± 2.0	3.0	
Super Manita Green pepper	0.02	75.2 ± 5.2	4.3	0.02
	0.2	91.6 ± 1.6	3.6	
	1	87.6 ± 7.6	5.3	
'Choongwang' Kimchi cabbage	0.02	90.6 ± 0.6	7.1	0.02
	0.2	87.8 ± 7.2	2.3	
	1	86.0 ± 6.0	0.5	

^zMean ± SD (standard deviation, n=3).

*Abbreviations : CV, coefficient of variance; LOQ, limit of quantitation.

LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

최종 확립한 분석법의 추가적 신뢰성을 확보하기 위해 LC/MS를 이용하여 재확인 과정을 추가하였다. Forchlorfenuron 성분의 이온화 향상을 위해 이동상 용매로 사용되는 증류수에 10mM ammonium acetate를 첨가하여 분석을 실시하였으며, Fig. 5와 6에 나타낸 TIC(total-ion chromatogram) 및 mass spectrum으로부터 forchlorfenuron은 ESI(electrospray ionization) positive ion 조건에서 용이하게 protonation 되어 $[M+H]^+$ 를 형성함을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과 forchlorfenuron의 $[M+H]^+$ peak가 base peak로 나타나므로 SIM(selected-ion monitoring)용 ion으로는 $[M+H]^+$ 인 $m/z=248.0$ ion만을 이용하여도 충분히 정성적 확인이 가능하였다(Ardrey, 2003; McLafferty and Turecek, 1993).

Fig. 7은 본 연구에 사용된 대표 과일 및 채소 시료 중 감귤을 대상으로 forchlorfenuron의 잔류분을 재확인한 SIM chromatogram이며, 본 연구에서 사용된 모든 과일 및 채소의 forchlorfenuron 무처리 시료에서는 forchlorfenuron 성분과 동일한 머무름 시간대에 peak가 전혀 관찰되지 않았고, forchlorfenuron이 처리된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에

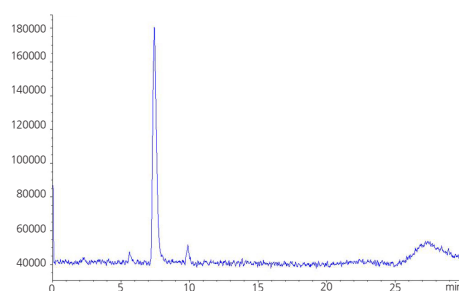


Fig. 5. Total-ion chromatogram (TIC) of forchlorfenuron in LC/MS.

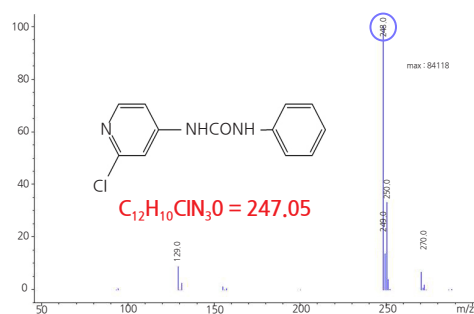


Fig. 6. ESI (+) mass spectrum of forchlorfenuron.

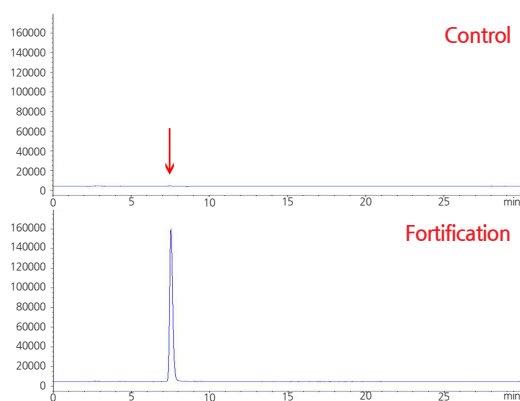


Fig. 7. SIM chromatogram of Satsuma mandarin extract for the confirmation of forchlorfenuron, fortified at ten-fold of the LOQ level.

forchlorfenuron의 잔류분만을 정확하게 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확립한 LC-MS/SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC-DAD를 이용한 정량법과 더불어 forchlorfenuron 잔류분의 추가적 정성분석법으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

일반적으로 잔류농약의 분석법은 분석목적 및 1회당 분석성분수에 따라 다성분동시분석법(multiresidue analytical method)과 개별분석법(individual analytical method)으로 대별된다. 전자의 경우는 분석조작 1회당 검사가 가능한 농약수가 수십 가지 이상으로 분석효율은 매우 높으나, 각각의 성분에 대한 분석의 정밀도나 신뢰성은 다소 열등한 단점이 있다. 즉, 다성분동시분석법에서는 대상성분들을 물리화학적 특성범위별로 그룹화하고, 그룹별 시료추출, 정제 및 기기분석과정에 의하여 시료분석을 수행하므로 개별분석 대상성분마다 최적의 분석법을 적용하는 것이 불가능하다. 따라서 각 대상성분에 대하여 최적화된 시료조제 및 기기분석조건이 적용되는 개별분석법에 비하여 분석감도, 정밀성 및 신뢰도가 다소 떨어진다. 이에 따라 다성분동시분석법은 적절한 분석기준을 만족하면서 분석효율에 중점을 두어 개발되므로 주로 잔류농약검색용(screening) 목적에 적합하다. 그리고 후자의 개별분석법은 개별 농약성분별로 최적화시킨 분석법으로 다성분동시분석법에 비하여 분석의 효율은 낮으나 최고의 분석감도, 정밀성 및 신뢰도가 보장된다. 그러므로 특정시료에 대해 다성분 검색결과 검출된 의심성분의 보다 정확한 정성 및 정량, 특히 법적 및 행정적 목적으로 신뢰성이 요구될 때 주로 개별분석법이 이용된다. 또한 다성분동시분석법에 포함시킬 수 없는 성분들에 대하여는 각각의 개별분석법 확립이 잔류관리를 위하여 필수적이다.

현재까지 국외에서 보고된 forchlorfenuron의 잔류분석법은 개별분석법에 해당하는 방법으로 LC-MS/MS(liquid chromatograph-tandem mass spectrometry) 혹은 LC-TOF/MS(liquid chromatograph-time of flight mass spectrometry)를 이용한 분석법이 보고된 바 있으나, 이 방법은 일반적 범용 분석기기인 HPLC-DAD를 이용한 분석체계가 아닌 고가의 질량분석기를 이용한 분석방법(Valverde et al., 2010; Negre et al., 2014)으로 일상적 분석법으로서의 적용성이 낮다. 한편 국내에서 보고된 대표적 forchlorfenuron의 잔류분석법으로는 식품의약품안전처의 다중농약다성분분석법(4.1.2.2, 제2법)이 보고된 바 있으나, 이 방법은 수백종의 농약을 동시에 분석하는 다성분동시분석법으로서 정량적 분석의 의미보다는 특정 농약의 검색 분석에 적합하다. 이 방법은 특정농약의 정밀한 정량적 분석법으로서의 이용성은 제한되며, 정제과정의 미비와 더불어 다양한 원예작물의 적용성이 평가된 바 없고, 매트릭스별 분석방법의 최적화도 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 그동안 국내에서 정량적 분석이 어려웠던 forchlorfenuron의 HPLC-DAD/MS를 이용한 일상적 분석법을 확립하였고, 국내 주요 원예작물 중 수요가 가장 많은 사과, 감귤, 고추 및 배추를 대상으로 회수율 실험을 진행하여 다양한 원예작물에 효율적으로 적용 가능함을 확인하였다. 본 연구에 의한 신규 forchlorfenuron의 분석방법은 향후 소비자들에게 안전하고 신뢰할 수 있는 원예작물을 제공할 수 있는 기반을 확보하여, 원예산물의 국내 소비확대는 물론 수출 원예산물의 잔류농약 분석의 정확도를 높여 수출활성화에 기여할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

본 연구에서는 HPLC-DAD/MS를 이용하여 사과, 감귤, 고추, 배추 등 원예작물에 함유되어 있는 phenylurea계 생장조절제인 forchlorfenuron의 잔류 분석법을 확립하였다. Acetone에 의해 추출된 forchlorfenuron 성분을 dichloromethane 액-액 분배법과 Florisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 HPLC-DAD/MS의 분석시료로 사용하였다. Forchlorfenuron의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC-DAD 분석 조건을 확립하였으며, 정량한계는 $0.02\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 이었다. 각 사과, 감귤, 고추, 배추에 대해 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과, 모든 처리농도에서 75.2-94.4% 수준을 나타내었고, 반복간 변이계수는 최대 7.1%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 우수한 결과를 도출하였으며, 아울러 LC/MS/SIM을 이용하여 분석성분을 재확인하였다. 이상의 결과로 신규 과일 및 채소류에 적용가능한 forchlorfenuron의 HPLC-DAD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용 가능할 것이다.

추가주요어: 정량한계, 잔류, selected-ion monitoring

Literature Cited

- Ahn KG, Kim GH, Kim GP, Kim MJ, Hwang YS, Hong SB, Lee YD, Choung MG (2014) Determination of amisulbrom residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. *Korean J Pestic Sci* 18:321-329. doi:org/10.7585/kjps.2014.18.4.321
- AOAC (2000) Pesticide and industrial chemical residues. *In* Official method of analysis', 17th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA, pp 1-88
- Ardrey RE (2003) Liquid chromatography-mass spectrometry. West Sussex, UK, pp 98-122. doi:org/10.1002/0470867299.ch2
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (2005) Public release summary on evaluation of the new active forchlorfenuron in the product Sitofex 10 EC plant growth regulator, Kinston, Australia, pp 2-3
- Chung HD, Do HW, Choi YJ (2002) Forchlorfenuron application increases fruit set rate and fruit growth of oriental melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* cv. Geumssaragi Euincheon) plants. *Korean J Hort Sci Technol* 20:302-305
- Codex Alimentarius Commission (2003) Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy
- Fong WG, Moye HA, Seiber JN, Toth JP (1999) Pesticide residues in food: methods, technologies and regulations. John Wiley and Sons, New York, USA, pp 3-4, 40-44
- Hodhson (2004) A textbook of modern toxicology, 3th ed. John Wiley & Sons, INC., USA, pp 414-415
- Hu QC, Nelson WJ, Spiliotis ET (2008) Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *J Biol Chem* 283:29563-29571. doi:org/10.1074/jbc.M804962200
- Korea Crop Protection Association (2015) Using guideline of crop protection agents. KCPA, Seoul, Korea, p 1393
- Kwon CH, Chang MI, Im MH, Choi H, Jung DI, Lee SC, Yu JY, Lee YD, Lee JO, Hong MK (2008) Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *Anal Sci Technol* 21:518-525
- Lee JH, Park HW, Keum YS, Kwon CH, Lee YD, Kim JH (2008) Dissipation pattern of boscalid in cucumber under greenhouse condition. *Korean J Pestic Sci* 12:67-73
- Lee JW, Kim JH, Hong EY, Lee YS (2012) The effects of GA₃ and forchlorfenuron (FCF) on the seedless berry ratio and fruit quality in 'Jarang' grape. *Hortic Sci Technol* 30 (SUPPL I):120
- Lee SJ, Hwang YS, Kim YH, Kwon CH, Do JA, Im MH, Lee YD, Choung MG (2010) Determination of captan, folpet, captafol and chlorothanonil residues in agricultural commodities using GC-ECD/MS. *Korean J Environ Agric* 29:165-175. doi:org/10.5338/KJEA.2010.29.2.165
- Lee SJ, Kim YH, Song LS, Choung MG (2011) Determination of ametryn residue in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. *Korean J Pestic Sci* 15:125-133
- Lee YD (2012) Pesticide analytical residues manual in food code. MFDS, Sejong, Korea
- McLafferty FW, Turecek F (1993) Interpretation of mass spectra, 4th ed. Sausalito, CA, USA, pp 19-50
- Miller JM (2005) Chromatography: concepts and contrasts, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., USA, pp 286-287
- Ministry of Food and Drug Safety (2012) Korea food code. MFDS, Sejong, Korea, pp 10.4.34-10.4.342
- Ministry of Food and Drug Safety (2014) MRLs for pesticides in foods. MFDS, Sejong, Korea, p 131
- Negre M, Passarella I, Vindrola D, Baqlieri A (2014) Determination of forchlorfenuron in fruits by solid phase or QuEChERS extraction and LC-UV or LC/MS/MS. *J AOAC Int* 97:938-941. doi:org/10.5740/jaoacint.13-064
- Um YC, Lee JH, Kang KH, Kang KY, Son TH (1995) Effects of forchlorfenuron application on the induction of parthenocarpic fruit and fruit quality in Watermelon (*Citrullus vulgaris* S.) under greenhouse condition. *Hortic Sci Technol* 36:293-298
- United States Environmental Protection Agency (2004) Pesticide fact sheet for forchlorfenuron. US EPA, Washington DC, USA, pp 1-8
- US FDA (1999) Pesticide analytical manual, Vol 1: Multi-residue methods, 3rd ed. US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA
- Valverde A, Aguilera A, Ferrer C, Camacho F, Cammarano F, Cammarano A (2010) Analysis of forchlorfenuron in vegetables by LC/TOF-MS after extraction with the buffered QuEChERS method. *J Agric Food Chem* 58:2818-2823. doi:org/10.1021/jf904465s