

두류와 콩나물에서의 BENOMYL의 검색과 그 분리에 관한 연구

한일근[†] · 채정영 · 이자영 · 여익현
풀무원 식품(주) 기술연구소 분석연구실
(1994. 8. 26. 접수)

DEVELOPMENT AND COMPARISON OF RESIDUE ANALYSIS FOR BENOMYL IN BEAN AND BEAN SPROUTS

Ilkeun Han[†], Jeungyoung Chai, Jayoung Lee, Ikhyun Yeo
R & D Center, Pulmuone, Co., Ltd, Seocho-dong, Seocho-ku, 137-070, Seoul
(Received Aug. 5, 1994)

요약 : 본 연구에서는 두 종류의 기존 HPLC 베노밀 분석법 및 한 종류의 새로이 설정한 GC PFB 유도체화 베노밀 분석법을 도입하여 시중에 유통되는 국산 및 수입작물을 수거한 후 그 잔류도를 검색함과 동시에 각 분석법의 정확성, 정밀도, 회수율, 그리고 감도 등을 비교 평가하였다. 그 결과 GC PFB 유도체화분석법의 경우 회수율 및 검출 한계가 각각 95% 이상, $0.001\mu\text{g}/\text{g}$ 이었다. 그리고 각종 작물의 분석시 기존의 HPLC법의 경우 베노밀의 peak가 나타나는 retention time 시간대에 시료의 성분에 의한 peak도 동시에 나타날 수 있는 확률이 높아 오검출되는 사례가 많았으나 GC PFB 유도체화분석법은 베노밀을 유도체화한 후 GC에서 분석함으로써 오검출 판정결과를 보이는 시료는 없었다.

Abstract : Benomyl(Methyl-1-(Butyl Carbamoyl)-Benzimidazole-2-yl-Carbamate) is widely used as pre- and post-harvest pesticide. It converts into MBC(Carbendazime; Benzimidazole-2-yl-carbamate) and butyl-isocyanate in mild condition. In this study, three analytical methods for MBC were compared in view of detectability, correctness, and sensitivity. The first and second are HPLC analytical method employing the UV detection of MBC. Our new third method was modification of PFBB(pentafluoro-benzylbromide) derivatization method with GC-ECD & MSD. The average recoveries and detection limit of MBC in the newly modified method are 95% and $0.001\mu\text{g}/\text{g}$ in whole bean and bean sprouts respectively. This new method prevent pesticide analysis from misdetecting in bean and bean sprouts.

Key words : Benomyl, MBC, Carbendazime, Analysis, Bean sprout, Bean.

1. 서 론

농산물 수입개방에 따른 국내 농수산물 수입량은 증가하고 있는 실정이며, 이러한 수입 농산물의 경우 팥

독성의 농약을 함유하고 있는 경우가 많으므로 국민의 건강과 안전을 위해 보다 정확하고 효율적인 잔류농약 검사법과 경험 있는 인력의 필요성이 절대적으로 대두되고 있다.¹ 농약은 유기염소계, 유기인계, 카바마이트

계, 우레아계, 트리아진계, 질소화합물계, 황화물계, 퀴노이드계, 피레스로이드계, 로테노이드계, 쿠마론계, 바이페닐류계, 항생제계, 그리고 자연 유래의 농약 등 크게 13가지로 분류되고 있으며, 이러한 농약 전반에 대한 많은 연구가 진행되어지고 있다.²⁻¹⁰ 한편, 과학기술의 발달로 잔류 농약분석용 첨단분석 장비 및 분석법¹¹이 개발 보급되고 있으나 잔류 농약을 추출하여 분석검출하기란 용이한 일이 아니다. 이러한 어려움 때문에 실제 잔류하고 있는 농약을 검출하지 못한다거나 검사시료 속의 고유성분을 농약으로 오인하는 사례가 많다.

Benomyl(Methyl-1-(butyl carbamoyl)-benzimidazole-2-yl-carbamate)은 신경전달체계의 효소인 acetylcholine esterase의 reversible inhibitor로서 작용하는 carbamate계 농약의 일종이다.^{12, 13} 일반적 환경(mild condition) 조건하에서는 first-order kinetic에 따라 Fig. 1과 같이 carbendazim(MBC: Benzimidazole-2-yl-carbamate)과 butyl isocyanate로 쉽게 자연분해되며 온도, 수분, 산, 그리고 열에 불안정하여 그 분해 속도는 더욱 증가된다.¹⁴ Benomyl의 경우 현재 대량 소비되고 있으며 현재까지 충분한 잔류도 모니터링 데

이타가 없고 인체에 유해할 가능성(ADI:0.02mg/kg for man)이 매우 높아 그 위해성은 높은 것으로 알려져 있다.^{15, 16, 17}

Benomyl은 fungicide로서 효과가 널리 인정되어 국내에서는 살균제로서 등록 사용되어지고 있고¹⁸ 외국의 경우에는 작물 재배중이나 종자소독에 사용되기보다는 수확 후 저장, 수송, 유통중에 더욱 널리 통용되고 있는 추세이며 1987년 National Research Council (NRC)에 조사한 결과 1979년부터 1986년까지 benomyl의 연평균 사용량은 2,000,000 Ib of AI/year로서 이는 각종 작물에 사용되는 post harvest pesticide로 비교적 널리 알려진 thiophanate-methyl (TPM)의 연평균 사용량 30,000 Ib of AI/year에 비해 60배 이상의 소비량을 나타내고 있다.¹²

Benomyl은 위에서 기술한 바와 같이 반감기($T_{1/2}$)가 35일로 시간이 경과함에 따라 Carbendazim (MBC)으로 대부분 분해되므로 식품, 원료 등에서 benomyl 자체로서 분석하지 않고 일반적으로 MBC로 전환한 다음 추출, 정제과정을 거쳐 HPLC-UV로 MBC를 정량분석한 후 역으로 분자량을 환산하여 잔류도를 검사한다.^{11, 19-23} 그러나 정형화된 하나의

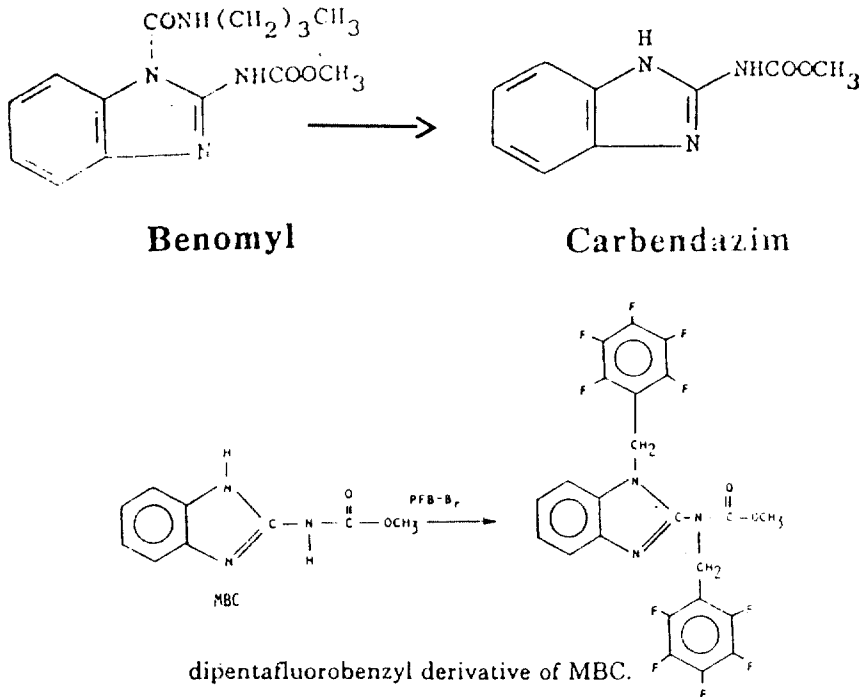


Fig. 1. Schematic diagram of degradation of benomyl in mild condition spontaneously and PFB-MBC derivatization.

HPLC 분석법을 여러 시료에 적용할 경우 시료구성물질에 의한 간섭현상이 발생하므로, 시료에 따라 추출정제처리법을 달리하지 않으면 시료의 구성물질과 베노밀이 분리되지 않음을 본 연구실에서 수 차례 관찰한 바 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 Gwan H. Tjan과 John T. A Jansen 등이 1979년 MBC-PFBB(Pentafluoro-benzylbromide) 유도체화 분석법을 보고한¹³ 이래로 많은 유도체화 분석법이 보고되어져 왔다. 이러한 유도체화 분석법은 유도체반응이 불완전하게 진행되어 부정확한 결과를 얻거나 또는 미반응 유도체화 시약이 검출기에 무리(overload)를 주는 단점이 있어 왔다.¹³

본 연구실에서는 HPLC benomyl 분석법이 가지는 오류를 검색 수정 보완하고 Jansen PFBB 유도체화법을 수정 개선한 새로운 방법을 설정하였다. 그리고 시중에서 유통되고 있는 작물 60종을 수거한 후 베노밀에 대한 잔류도를 측정하고 새로운 PFB-MBC 유도체화 GC분석법의 응용성을 검증하였다. 그 결과 새로이 설정된 PFB-MBC 유도체화 GC 분석법을 benomyl 분석 도입할 경우 benomyl 검사에 있어서 발생할 수 있는 오류를 방지할 수 있고 검출감도 및 회수율이 좋아 많은 응용이 기대된다.

2. 실험방법

2.1. 기기 및 시약

베노밀 분석에 사용된 기기는 Photodiode array detector-HPLC(Waters 994 E, USA), Gas-chromatography(HP 5890 Series II, USA), 그리고 GC-mass selective detector(HP 5971A, USA)를 사용하였다. Ethyl acetate 등 유기용매는 PR(pesticide analysis) grade를, 표준시약은 독일 Riedel-Dehaen사의 순도 99% 베노밀(Benomyl: Methyl-1-(buthyl carbamoyl)-benzimidazole-2-yl-carbamate)과 MBC(Carben-dazim: Benzimidazole-2-yl-carbamate)를 사용하였으며, 유도체화 시약은 미국 Sigma사의 PEBB(Pentafluoro-benzylbromide)를 사용하였다. 그외의 시약류는 ACR grade를 사용하였다.

2.2. 실험 재료

실험 재료로서 일반 시중에서 유통되는 콩나물류 5

종, 두류 6종(준저리 2종, 오리알태 2종, 백태 2종), 참깨 2종, 상추 2종, 그리고 미곡 2종 등 총 60여종의 실험재료를 시장 및 백화점에서 직접 구입하여 시료로 사용하였다.

2.3. 현행 베노밀 분석법

현재 사용되고 있는 잔류농약분석법의 검증을 위해 먼저 현재 가장 많이 사용되는 베노밀 잔류농약분석법의 전처리 방법 및 기기분석법에¹¹ 따라 실험을 진행하였다. HPLC상에서 검출된 카벤다짐(MBC)의 양에 1.53을 곱하여 베노밀량으로 환산하였다.

2.4. Rosen 베노밀 분석법

과일, 야채, 곡물 등에 잔류하는 베노밀을 카벤다짐화하여 분석하는 Rosen 분석법에¹² 따라 진행하였으며 HPLC상에서 검출된 카벤다짐(MBC)의 양에 1.53을 곱하여 베노밀량으로 환산하였다.

2.5. GC-PFB, GC-MSD-PFB 유도체화 베노밀 분석법

기존의 Jansen 베노밀 분석법의^{13, 15} 추출법, 유도체화법, 정제법, 그리고 기기분석조건을 개선하여 새로이 설정한 분석법은 다음과 같다.

추출법 : 마쇄된 시료 20g에 30% acetone 20ml와 ethyl acetate 60ml를 넣고 30분간 진탕한 후 감압여과한다. 다시 ethyl acetate 50ml로 잔사에서 재추출하여 여액을 합친 후 0.1N HCl 25ml를 가한다. 40℃, 감압건조하여 acetone, ethyl acetate를 제거하고 다시 ethyl acetate 25ml로 세척한 후 1N NaOH 수용액으로 pH 6.5로 조정한다. 그리고 dichloromethane 50ml로 2회 추출한 후 40℃, 감압건조한 후 MeOH 1ml로 정용한다.

유도체화법 : 정용한 MeOH 1ml에 acetone 2ml, potassium carbonate 10mg, PFBB 10 μ l를 첨가하여 70℃에서 3시간 반응시킨 다음 N₂ 가스로 완전히 건조한 후 isooctane 1ml로 정용한다.

정제법 : 3g deactivate alumina와 1g Na₂SO₄ anhydrous로 충전된 glass column(10mm×30mm)을 5ml hexane으로 적시고 유도체화된 시료액 isooctane 1ml를 loading한다. 그리고 2ml hexane으로 elution하고 다시 10% benzen-hexane 10ml로 elution한다. 그 후 15ml methylen chloride로 elution한 용액을 35℃에서 감압건

조하여 3ml/화하고 N₂ 가스로 건조하여 1ml isooctane에 정용한다. 이 정제액 2 μ 를 GC에 injection한다.

기기조건 : GC-ECD와 GC-MSD의 기기조건으로서 column은 Ultra-1(25m \times 0.2mm \times 0.33 μ m, Hewlett-packard, USA), Flow rate는 0.5ml/min, Carrier 가스는 Helium, 주입구온도는 250 $^{\circ}$ C, Oven 온도는 240 $^{\circ}$ C에서 1분간 둔 후 3 $^{\circ}$ C/min의 속도로 300 $^{\circ}$ C까지 올린 후 4분간 유지한다. 그리고 검출기온도는 300 $^{\circ}$ C였다. 검량선의 작성은 100ppm의 MBC stock solution을 희석하여

1, 0.1, 0.01, 그리고 0.001ppm의 농도의 표준용액을 제조한 후 PFBB로 유도체화시켜 GC-ECD로 분석하여 작성하였다. 그리고 GC-MSD의 기기분석조건에서 SIM(selective ion monitoring) mode의 target ion molecule(m/z)은 551, 532(-F), 492(-COOCH₃), 370(-CH₂C₆F₅), 339(-CH₂C₆F₅, -OCH₃) 292(-CH₂C₆F₅, -OCH₃, -CO, -F)로 설정하였으며 표준품을 분석하여 SIM-mode용 library를 만든 후 분석하여 정성, 정량 판정하였다.

Table 1. Benomyl residue in farm products three analysis methods: Conventional, Rosen, and GC-PFB derivatization.

(Unit: ppm)

Items	Conventional	Rosen	GC-PFB derivative
Bean sport	0.61	ND	ND
A	0.94	ND	ND
B	0.82	ND	ND
C	1.00	ND	ND
D	2.15	ND	ND
E			
JJR Bean	0.62	ND	ND
F	0.71	ND	ND
G			
ORA Bean	0.72	ND	ND
H	0.65	ND	ND
I			
BT Bean	0.35	ND	ND
J	0.41	ND	ND
K			
Seasame	8.00	0.72	0.63
L	11.40	0.35	0.25
M			
Lettuce	ND*	ND	ND
N	ND	ND	ND
O			
Rice			
P	2.56	0.04	ND
Q	2.10	0.01	ND

ND* : Not Detected

JJR, Junjery : ORA, Orialtae : BT, Baektae.

2.6. 전처리 회수율실험 및 검출한계실험

새로이 설정한 GC-PFB 유도체화 분석법의 전처리 회수율을 검증하기 위하여 시료 20g에 ethyl acetate 60ml와 30% aceton 20ml를 가하여 추출한 추출액에 1, 3, 9ppm 농도의 benomyl 용액 2ml를 첨가한 후 GC-PFB 유도체화 분석법과 동일하게 진행한 후 마지막 정제과정에서 iso-octane 2ml로 정용하여 GC에서 최종 분석한 후 투입량과 검출량의 비를 백분율로서 구하여 전처리 회수율로 구하였다. 기존의 베노밀분석 방법 및 Rosen 분석법의 경우에도 동일한 방법으로 회수율을 검증하였다. 그리고 검출한계의 S/N ratio는 peak to peak 방식으로서 2/1, root mean square 방식으로는 1/10로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 현행 기존 분석법과 Rosen 분석법에 의한 베노밀 분석 결과

기존 베노밀분석법으로 60종이 시료에서의 베노밀

잔류도를 분석한 결과는 콩류 등 15종의 작물에서 0.35에서 18ppm의 범위로 베노밀이 검출되었으며, 그 중 검출된 시료를 중심으로 한 분석결과를 Table 1에 나타내었다. 60종의 시료 중 15종의 작물에서 베노밀이 검출되는 것은 의외의 분석결과로서 오판독 검출되었을 가능성이 매우 큰 것으로 추측되었다. 이러한 기존 베노밀분석법에서 검출된 15종의 시료에 대하여 비교 확인분석을 위하여 Rosen 베노밀 분석법으로 분석한 결과를 Table 1에 나타내었으며, 그 결과에서 기존 베노밀분석법의 결과와는 다르게 참깨 2종과 쌀 2종에서만 0.01에서 2.72ppm 농도 범위로 검출되었다. 이와 같이 두 가지 분석방법 차이에 따른 분석결과의 편차가 매우 심한 원인을 규명하고 베노밀 분석에 가장 적절한 베노밀분석의 전처리 조건과 HPLC 분석조건을 설정하기 위하여 기존 베노밀분석법과 Rosen 베노밀분석법의 전처리법을 이용하여 콩나물 등 5종의 시료군(5 Genus)에서 베노밀을 각각 추출, 정제한 다음 이 시료를 위의 2종류분석법의 HPLC 분석조건에 따라 분석을 진행한 결과 회수율이 95% 이상인 전처리

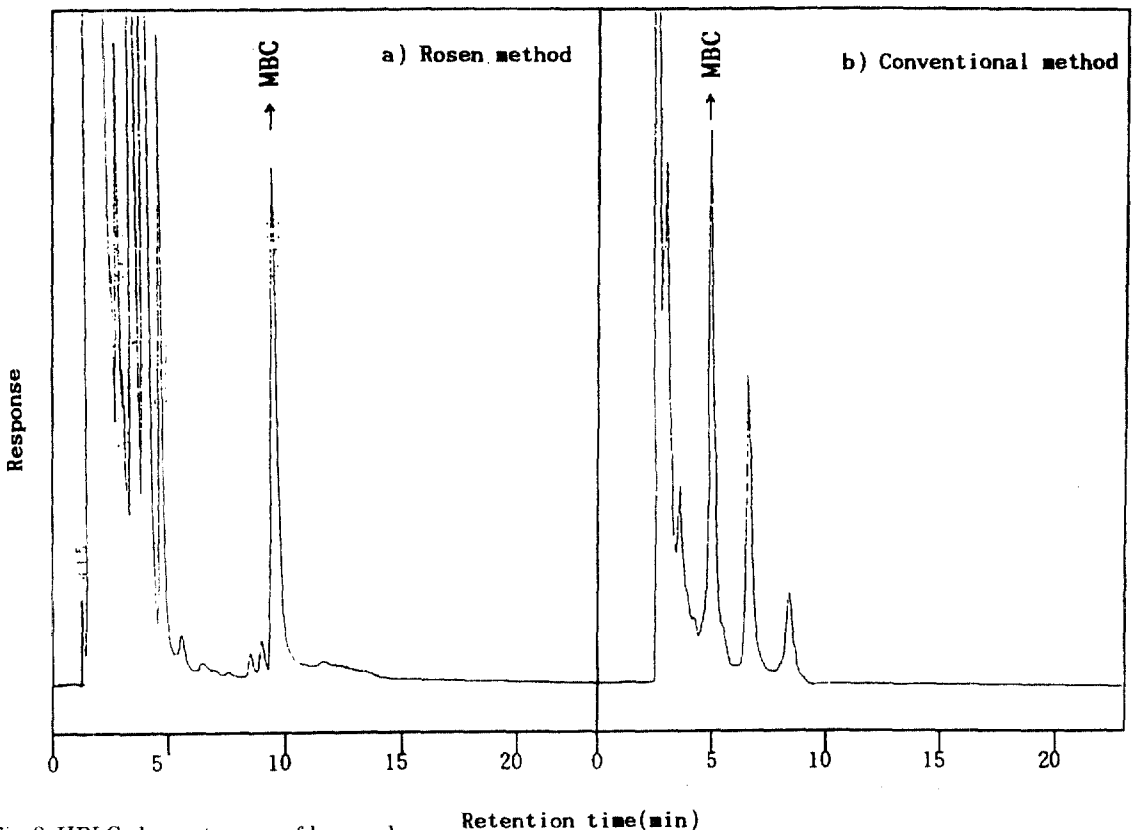


Fig. 2. HPLC chromatogram of benomyl

법은 기존 베노밀분석법이었고 분리도가 우수하여 간섭현상이 보다 적게 발생하는 HPLC 분석조건은 Rosen 분석법으로 검출한계 0.01ppm이었다. 이러한 결과에서 볼 때 HPLC를 활용하여 베노밀을 분석할 경우 전처리법은 기존 분석법을 사용하고 기기분석법은 Rosen 분석법을 도입할 경우 보다 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 판단된다. Fig. 2는 Rosen법과 기존 분

석법으로 각각 베노밀을 분석한 결과를 패턴비교하여 나타낸 것으로서, Rosen법의 경우에는 시료의 구성성분과 베노밀의 피크가 확연히 분리되나 기존 분석법의 경우 베노밀의 피크가 시료구성성분과 같은 retention time에서 분석됨을 알 수 있으며 이러한 결과에서 볼 때 Rosen법의 HPLC 분석조건이 해리도가 우수함을 알 수 있다.

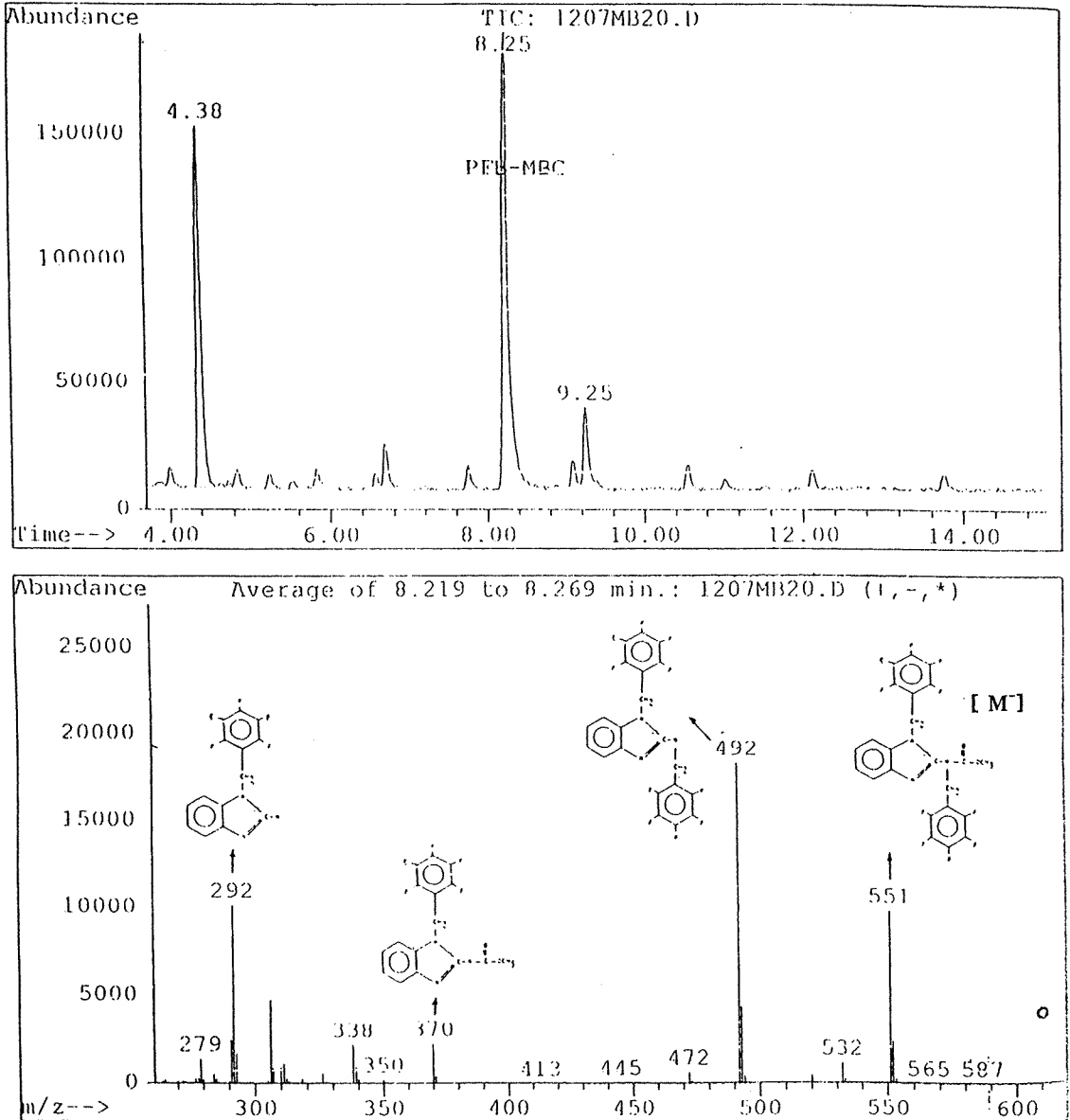


Fig. 3. GC-MSD chromatogram of PFB-MBC.

3.2. GC-ECD-PFB 유도체화 베노밀 분석법에 의한 실험결과

GC-PFB 유도체 베노밀분석법의 검량선을 작성한 결과 상관계수 1.0의 직선상의 농도구배를 보여 유도체화반응이 일어나지 않고 잔류하는 MBC는 없는 것으로 판단되며 PFBB 유도체화 분석법의 전처리 회수율은 95% 이상이었고 검출한계는 1ppb(peak to peak, S/N ratio=1/2) 수준이었다. GC-ECD상에서 GC-PFB 유도체화 분석시 주의할 사항은 주입구 온도는 250℃ 이상, oven 온도는 240℃ 이상이 좋으며, 검출기 온도는 300℃ 이상이어야 하며, 그 이하의 온도에서 분석할 경우에는 재현성이 떨어지는 것으로 관찰되었다. 기존 베노밀분석법 및 Rosen법에서 검출된 17종의 시료에 대하여 분석한 결과 GC-PFB 유도체화 분석법으로 분석한 결과는 Table 1과 같다. Rosen 분석법과는 달리 쌀에서는 불검출이었고 참깨에서만 베노밀이 검출되었으며 그 검출량은 Rosen 분석법 분석결과치와 동일하였다. Table 1의 결과에서 유추할 때 HPLC법에 비해 오판정 검출이 적은 것으로 판단되며 다른 방법에 비해 보다 정확한 방법으로 사료된다.

3.3. GC-MSD-PFB 유도체화 베노밀 분석법에 의한 실험결과

일반적인 HPLC 분석법으로 콩, 밀, 쌀, 참깨, 그리고 과채 등에서 benomyl을 분석할 경우 간섭현상이 발생하여 benomyl로 오판정 검출되는 빈도가 매우 높다는 것은 상기의 결과에서 관찰한 바와 같다. 반면 GC-ECD에서 PFB-MBC 유도체 분석법의 경우 간섭현상은 거의 없으나 정확한 정성 판정을 하기 위하여 GC-MSD를 이용, PFB-MBC 유도체를 scan mode로 정성 분석한 chromatogram은 Fig. 3과 같다. GC-MSD scan mode 분석시 검출한계는 0.02ppm (peak to peak, S/N ratio=1/2)이었으며, 그 이하의 농도에서는 PFB-MBC 유도체에 대하여 Target ion molecule(m/z)을 551, 532(-F), 492(-COOCH₃), 370(-CH₂C₆F₅), 339(-CH₂C₆F₅, -OCH₃), 292(-CH₂C₆F₅, -OCH₃, -CO, -F)로 설정하고 SIM-mode용 library를 만든 후 sim-mode에서 분석하여 정성판정하였으며, 이때의 검출감도는 1ppb였다. GC-ECD상에서 베노밀이 검출되었던 참깨 2종에 대하여 GC-MSD상에서 분석한 결과 베노밀이 참깨에 잔류하는 것으로 정성판정할 수 있었다. 이러한

GC-MSD 확인 분석결과에서 볼 때 베노밀을 PFBB로 유도체화한 후 GC-ECD상에서 분석하는 GC-PFB 유도체화법은 정확성 및 정밀도가 매우 높은 것을 알 수 있으며, 향후 베노밀 검색시 많은 응용성이 기대된다.

4. 참고문헌

1. 農林水産部, 農藥의 安全性 및 殘留豫防, (1993).
2. J. Hsu, H. Schattenberg and M. Garza, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**(5), 886~982(1991).
3. A. Monico-Pifarre and M. Xirau-Veyreda, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**(3), 596~598(1987).
4. A. Monico-Pifarre, and M. Xirau-Veyreda, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**(4), 553~556(1990).
5. FDA Pesticide Program, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**(5), 127A~146A(1990).
6. M. Cano, J. De la Plaza, and L. Munoz-Delgado, *food Chemistry*, **25**, 135~144(1987).
7. Yasuhido Tonogai, Yukari Tsumura, Yumico Nakamura and Yoshio Ito, *食衛誌*, **33**(1), 23~30(1992).
8. G. Blaicher, W. Pfannhauser, and K. Evenson, *Chromatographia*, **13**(7), 438~446(1980).
9. E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**(5), 745~765(1991).
10. B. Goulart, P. Hammer and K. Evenson, *J. of Amer. Soc. Sci.*, **117**(2), 265~270(1992).
11. 食品公典(1991).
12. C. H. Liu, G. Maltern, X. Yu and J. Rosenu, *J. Agri. food. Chem.*, **38**, 167~171(1990).
13. G. Tjan and J. Jansen, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**(4), 769~773(1979).
14. R. Singh and I. Brendle, *J. Agri. food. Chem.*, **38**, 1758~1762(1990).
15. S. Cline, A. Felsot, and L. Wei, *J. Agri. food. Chem.*, **29**(5), 1087~1088(1981).
16. 農藥工業協會, 農藥使用指針 42, 311p(1992).
17. R. Bushway and S. Savage, *food Chemistry*, **35**, 51~58(1990).
18. C. Worthing, *The Pesticide Manual*, 9th edit., 59~60(1991).
19. W. Newsome and P. Collins, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**(6), 1025~1027(1987).
20. R. Bushway, J. Kogabalsooriar and L. Perkins, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem. International*, **75**(2), 323~327(1989).

21. P. Cano, J. Plaza, and L. Munoz-Delgado, *J. Agri. food. Chem.*, **35**, 144~147(1987).
22. D. Gilvidis and S. Walters, *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**(5), 753~761(1989).
23. U. Kiigemagi, R. Inman, W. Mellenthin and M. L. Deinzer, *J. Agri. food. Chem.*, **39**, 400~403 (1991).