

Micro-HPLC에 의한 Carbendazim과 Carbaryl의 분석

최경숙[†] · 이호연 · 이덕희 · 변윤기

영인과학기술연구소

(1994. 6. 23. 접수)

Analysis of Carbendazim and Carbaryl by Micro-HPLC

Kyoung-Sook Choi[†], Hoe-Yeon Lee, Duck-Hee Lee, and Woon-Ki Byun

Young-In Research Institute of Science and Technology

Young-Hwa Bldg. 547, Shin Sa-Dong, Kang Nam-Ku, Seoul 135-120, Korea

(Received Jun. 23, 1994)

식물 재배 및 저장 등에 사용되는 유기합성 농약은 병충해를 구제하는 데 있어 적용범위가 넓고 방제효과가 확실하여 식량증산에 크게 기여하고 있으나 환경오염에 의한 생태계의 파괴, 환경 중 독성물질의 잔류, 특히 농산물의 오염 등으로 인하여 인체에 직접적인 위해를 가할 수 있기 때문에 각 농약마다 적용 대상 및 적용 시기를 정하고 있다. 또한 농약의 안전사용기준을 만들어 적정 사용을 유도하고 있으나 무분별한 사용으로 인해 문제가 되고 있다.¹

Benomyl [methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole-carbamate]은 비교적 독성이 낮고 식물체에 대한 적용범위가 넓어 미국내에서 1979년부터 1986년까지 연간 200만 파운드 이상 사용되는 농약이다. 1987년 미국 환경청(EPA)에 의해 중앙유발 가능성이 있는 농약 53종 중의 하나로 확인되었으며, 미국 국립연구소(NRC)의 정량적 위해평가 대상의 28종 중의 하나로 확인되는 등 benomyl의 과량 사용에 대한 재평가가 이루어지고 있다.² Benomyl은 물에 대한 용해도가 매우 낮으며 유기용매상에서도 매우 불안정하여 중산성에서는 carbendazim [methyl 2-benzimidazole-carbamate]으로, pH 13에서는 STB [3-butyl-2, 4-dioxo-s-triazino [1, 2-a] benzimidazole]로 상온에서 매우 빠르게 분해되고 있어³ 많은 연구가들이 benomyl

의 정량분석을 carbendazim^{4,5} 이나 STB³로 가수분해시켜 하고 있다. Carbendazim은 미국에서는 등록되지 않은 농약이나 널리 사용되므로 국제무역시 문제가 되며 benomyl과 methyl thiophanate의 분해물이므로 carbendazim의 정량분석이 필요하다.

Carbaryl [1-naphthalenol methyl carbamate]은 강한 살충효과에 비해 포유동물과 인체에 대한 독성이 낮아 과일과 채소에 널리 사용하고 있는 methylcarbamate 농약이나 최근에 만성중독 유발 가능성이 보고되면서⁶ USDA에 의해 위해 정도가 더 높은 group으로 분류되었다. 식품 중의 carbaryl은 carbaryl 또는 carbaryl의 가수분해물인 1-naphthol로써 UV검출기^{8,9}, 형광검출기⁹ 및 전기화학검출기(electrochemical detector)^{10,11}로 검출하고 있으며, 역상 크로마토그래피법으로 분리하고 있다.

Benomyl과 carbaryl은 국내에서도 잔류농약기준을 초과한 예가 여러 번 보고된 농약이며¹, 보건사회부 고시 91-88호에 의하면, carbaryl은 적용 대상에 따라 최고 2.0ppm(땅콩)까지 허용되나 일반적인 과일, 채소에는 0.5 또는 1.0ppm의 허용기준을 가지고 있으며, benomyl은 호프에 3.0ppm까지 허용되나, 대부분의 과일에는 1.0ppm의 허용기준을 나타내고 있다. 일반적으로 식품 중의 미량성분을 분석하기 위한 전처리방법

으로는 액체-액체추출법이 널리 이용되고 있으며, 분리된 미량의 carbendazim과 carbaryl의 정성, 정량분석은 HPLC 분석을 많이 사용하고 있다. 그러나 액체-액체추출법은 다량의 용매 사용으로 시료가 오염될 확률이 높고, 전처리시간이 긴 단점이 있으며, 기존의 분석용 HPLC 컬럼으로 분석하기 위해서는 감도를 높이기 위해 유도채화를 하거나, 전처리과정에서 더 농축시켜야 하는 점이 있으며, 여러 가지 농약들의 동시분석을 위해서는 분리도가 높은 HPLC 분석조건이 필요하다.

최근에 시료전처리를 단순하고 손쉽게 하기 위한 고체상 흡착제가 상용화되어 널리 사용되고 있으며, Micro-HPLC는 작은 충전입자를 내경이 작은 컬럼에 충전하여 분리, 분석하는 방법으로 1974년 처음 제안되었으나, 1992년 미국 Pittsburg 분석기기 전시회에서 Microtech사에 의해 처음 소개된 분석기기이다.¹² Micro-HPLC를 기존의 분석용 HPLC와 비교하면, 분리능과 검출능이 화합물에 따라 각각 10배, 400배까지 향상되었으며^{13,14}, 용매의 절감효과는 100배가 되며, splitter 없이 mass detector와 연결 가능하며, GC detector인 FID도 Micro-HPLC에서는 사용이 가능하다.¹⁴

1. 재료 및 방법

본 연구에서 분석한 주스(A제품 사과주스, B제품 사과주스, 포도주스)와 음용수는 모두 시중에서 구입하여 곧 사용하였다. 용매로는 HPLC급 methanol (Burdick & Jackson, U.S.A.)과 Milli-Q reagent water system(U.S.A.)의 HPLC급의 초순수를, 표준물질 benomyl [19804-35-2]은 Sigma사(U.S.A.)에서, carbendazim [10605-21-7]은 Aldrich사(U.S.A.)에서, carbaryl [63-25-2]은 Dr. Ehrenstorfer(Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 고체상 추출용 흡착제는 Waters사(U.S.A.)의 Sep-Pak C₁₈ 카트리지를 사용하였다.

Micro-HPLC의 분리능과 고감도를 기존의 분석용 HPLC와 비교해 보기 위해 사용한 Micro-HPLC system은 Microtech사의 Prodigix-4P Micro Pump, Stainless steel C₁₈ microbore packed column (1mm×150mm, d_f = 5μm), Model MT201 time

programmable variable wavelength UV / VIS absorbance detector와 영인 D520B integrator였다. 분석용 HPLC System은 Waters 510 pump, Novapak C₁₈ column (3.9mm×150mm, d_f = 4mm), Waters 486 Tunable Absorbance Detector와 영인 D520B integrator를 사용하였다.

검량선 작성을 위한 표준용액으로 carbendazim 농도는 2.50ppm, 5.00ppm, 7.50ppm, 10.0ppm이며, carbaryl 농도는 1.25ppm, 2.50ppm, 3.75ppm, 5.00ppm의 혼합액을 사용하였다.

Sep-Pak C₁₈ 카트리지의 두 화합물에 대한 흡착능을 시험해 보기 위해서 carbendazim 10μg과 carbaryl 5μg을 5ml 초순수에 첨가한 후, Sep-Pak C₁₈ 카트리지에 천천히 흘려보냈다. 두 화합물들을 용출시키기 위해 methanol을 1.0ml씩 5.0ml 사용하였으며, 1ml methanol 내의 농도를 표준 검량선으로 계산함으로써 Sep-Pak C₁₈ 카트리지를로부터 두 화합물에 대한 회수율을 얻었다. Carbendazim 5.0μg과 carbaryl 2.5μg을 주스 10ml, 음용수 100ml에 첨가하여 초순수 100ml로 세척한 후, 2.0ml methanol로 용출하여 두 화합물을 정량하였다.

2. 결과 및 고찰

Fig. 1은 carbendazim과 carbaryl의 표준용액에 대한 Micro-HPLC 크로마토그램과 분석용 HPLC 크로마토그램을 보여 주고 있다. 두 화합물에 대한 표준 용액의 분석용 HPLC 크로마토그램은 그림에서 보듯이 바탕선에서 분리되지 않았으며($\alpha=1.27$, $R_s=0.76$), 검출한계도 각각 20ng, 2.0ng인데 비해 Micro-HPLC의 경우는 감도가 20~40배 증가되었으며(0.5ng, 0.1ng), 두 화합물이 분리가 이루어져($\alpha=2.94$, $R_s=4.71$), 두 화합물의 미량정성분석에 적합하였다. 따라서 다음의 실험들은 모두 Micro-HPLC로 행하였다.

Sep-Pak C₁₈의 carbendazim과 carbaryl에 대한 흡착능을 시험해 본 결과, Table 1의 결과를 얻었으며 10μg carbendazim과 5μg carbaryl을 100% 회수하기 위해서는 3.0ml의 methanol이 필요하였다(Fig. 2). 그러나 2.0ml methanol로 각각 93.0%, 95.5% 이상 회수 가능하였으며, 3.0ml methanol 용출시의 시료농축효

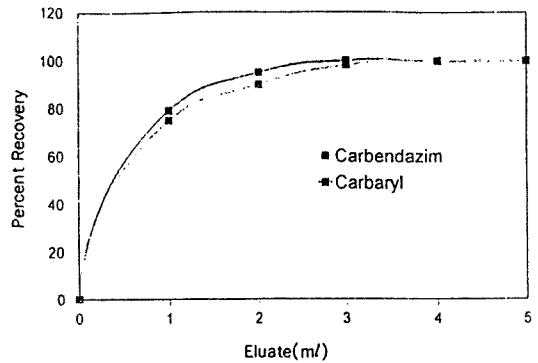
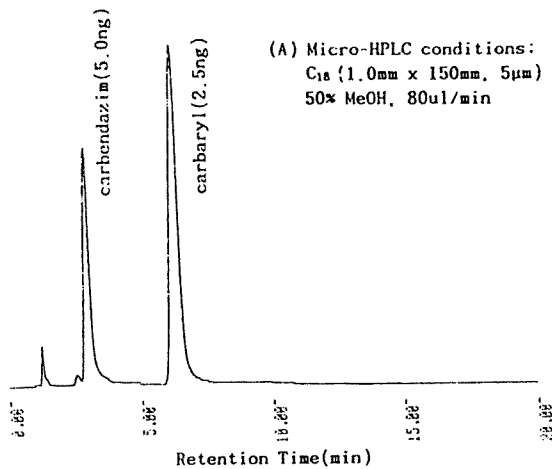


Fig. 2. Recovery of carbendazim(10 μ g) and carbaryl (5 μ g) from Sep-Pak C_{18} with methanol.

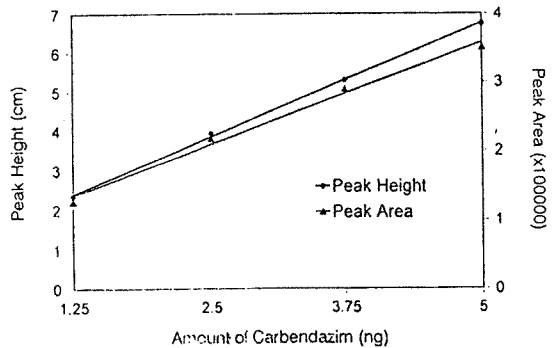
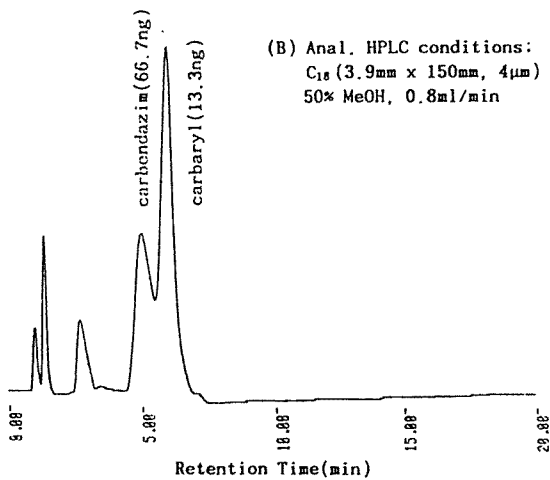


Fig. 3. Calibration curve of carbendazim

Fig. 1. Micro-HPLC chromatogram and analytical HPLC chromatogram of carbendazim and carbaryl.

과 감소로 인해 용출량을 2.0ml로 선정하였다.

시험시료의 농약을 정량분석하기 위하여 각각의 검량선을 작성하였으며(Fig. 3과 Fig. 4), 표준용액이 첨

Table 1. Effect of carbendazim(10 μ g) and carbaryl(5 μ g) aqueous solution(5ml) on adsorptivity and desorptivity of Sep-Pak C_{18} catridge

Percent Recovery				
Carbendazim		Carbaryl		
Water Eluate(5.0ml)	MeOH Eluate(1.0ml)	Water Eluate(5.0ml)	MeOH Eluate(1.0ml)	
1	0.80	75.9	0.50	80.2
2	1.00	70.0	0.30	83.1
3	0.50	73.0	0.20	80.1
Mean	0.77	73.0	0.33	81.1

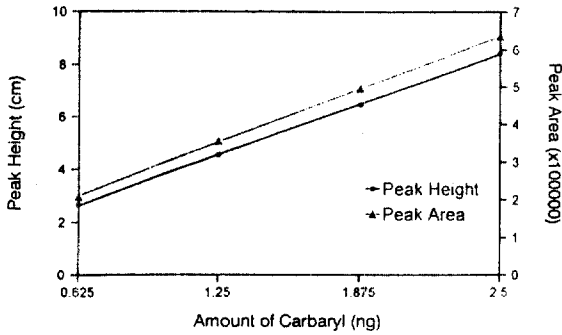


Fig. 4. Calibration curve of carbaryl

가된 사과주스 A시료를 본 실험방법에 적용하였을 때, carbendazim은 85.7%, carbaryl은 83.2%의 회수율을 보였다. 사과주스 B는 87.9%, 78.3%의 회수율을 나타내었으며, 포도주스는 UV 220nm에서의 방해물질이 거의 없었으며 77.7%, 85.0%의 회수율을 나타내었다. 표준용액이 첨가되지 않은 상품화된 음용수의 경우 carbaryl과 같은 머무름시간의 봉우리가 나타났으며, 음용수 중의 농도로 환산해 본 결과 0.25ppb의 농도였다(Fig. 5).

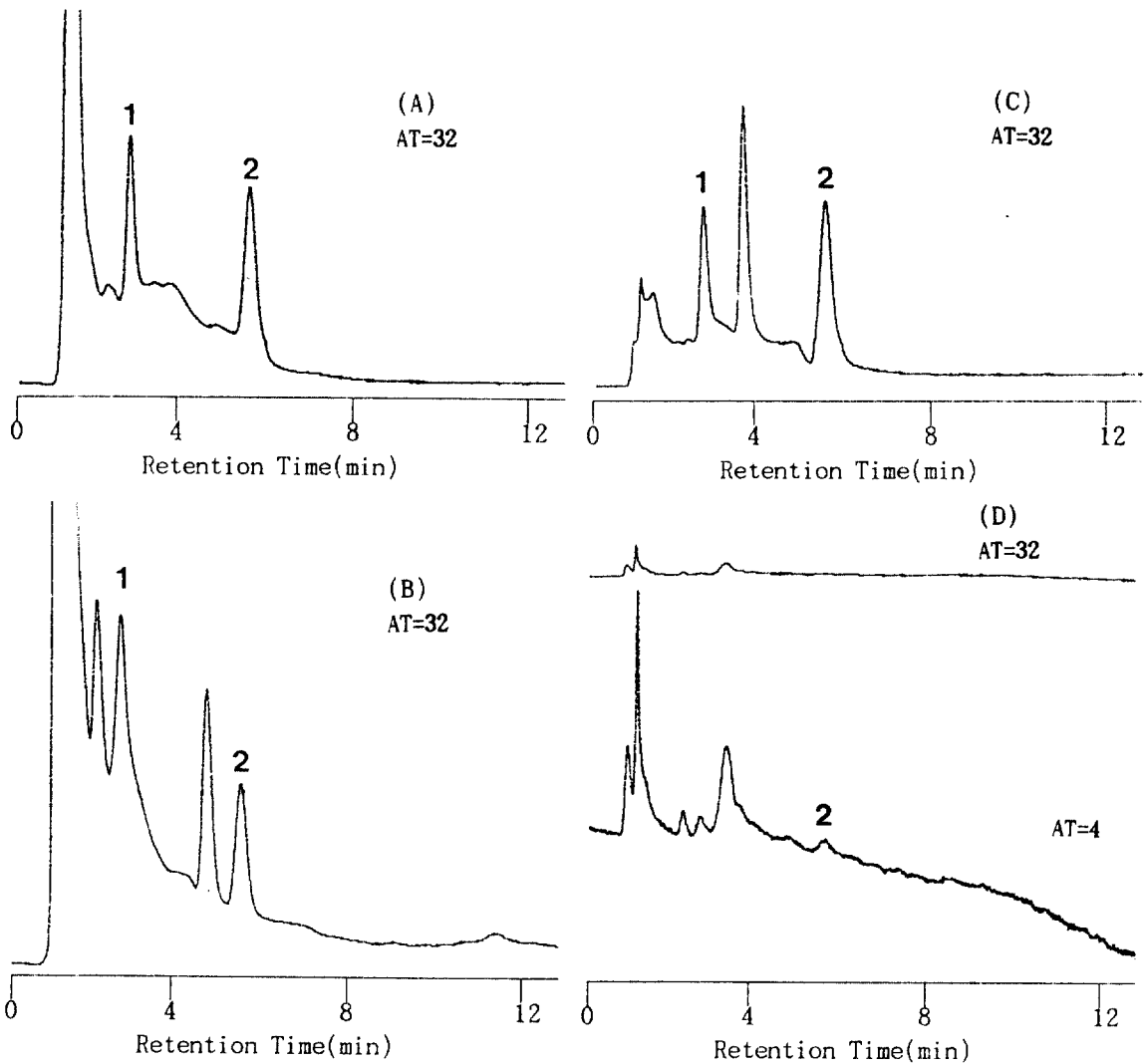


Fig. 5. Micro-HPLC chromatograms of (A) apple juice A, (B) apple juice B, and (C) grape juice spiked with carbendazim(1) and carbaryl(2) before extraction, and (D) unspiked drinking water.

참고문헌

1. 이서래, "식품의 안정성 연구", pp. 91-140, 이화여자 대학교 출판부, 대한민국, 1993.
2. National Research Council, "Regulating Pesticides in Food, The Delaney Paradox", p. 89, National Academy Press, Washington, DC., U.S. A., 1987.
3. M. Chiba and R. P. Singh, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 108-112(1986).
4. P. Cano, J. Plaza, and L. Munoz-Delgado, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 144-147(1987).
5. C. H. Liu, G. C. Mattern, X. Yu, and J. D. Rosen, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 167-171(1990).
6. R. J. Bushway, *J. Chromatogr.*, **457**, 437-441(1988).
7. Anonymous, *Food Chemical News*, **30**(26), 48 (1998).
8. J. G. Brayan, P. R. Haddad, G. J. Sharp, S. Dilli, and J. M. Desmarchelier, *J. Chromatogr.*, **447**, 249-255(1988).
9. K. M. Hill, R. H. Hollowell, and L. A. D. Cortivo, *Anal. Chem.*, **56**, 2465-2468(1994).
10. S. Kawai, K. Goto, K. Kano, and T. Kubota, *J. Chromatogr.*, **442**, 451-454(1988).
11. R. T. Krause, *J. Chromatogr.*, **442**, 333-343(1988).
12. W. Bertsch, *Anal. Chem.*, **65**(19), 846-851(1993).
13. P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **198**, 93-109(1980).
14. V. L. McGuffin and M. Novotny, *J. Chromatogr.*, **218**, 179-187(1981).

Abstract : A micro-high performance liquid chromatography(Micro-HPLC) technique with solid phase extraction was reported which detected carbendazim and carbaryl at picogram levels. They were separated on microbore packed C₁₈ column(1.0mm I. D×150mm, d_f=5μm) using a 50% methanol mobile phase and detected at UV 220nm(α=2.94, R_s=4.71), while they were not resolved on analytical HPLC system(α=1.27, R_s=0.76). The detection thresholds of carbendazim and carbaryl were 0.5ng and 0.1ng on Micro-HPLC, therefore Micro-HPLC system was 20~40 fold more sensitive than analytical HPLC system. Sep-Pak C₁₈ cartridge was found to be efficient in enriching carbendazim and carbaryl from dilute aqueous solution with 97.0% and 97.8% recoveries of them. The Sep-Pak C₁₈ cartridge followed by the Micro-HPLC had been applied to the quantitative analysis of carbendazim and carbaryl in spiked juices and a commercial drinking water.

Key words : Micro-HPLC, microbore packed C₁₈ column, carbendazim, carbaryl, Sep-Pak C₁₈ cartridge.
