



## 주요 약용작물에 대한 Cyanazine 제초제의 잔류 분석법

황영선\* · 임정대\*\* · 정명근\*\*†

\*텍사스주립대 알링턴캠퍼스 생물학과, \*\*강원대학교 생약자원개발학과

## Analytical Method for Triazine Herbicide Cyanazine Residues in Major Medicinal Crops

Young Sun Hwang\*, Jung Dae Lim\*\* and Myoung Gun Choung\*\*†

\*Department of Biology, University of Texas-Arlington, Arlington, TX 76019, USA.

\*\*Department of Herbal Medicine Resources, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea.

### ABSTRACT

**Background:** Cyanazine is used as a pre-emergent herbicide once during the growing season to control weeds of many upland crops worldwide. This study aimed to establish a method to determine cyanazine residue levels in major medicinal crops by using high performance liquid chromatography-UV detection/mass spectrometry (HPLC-UVD/MS).

**Methods and Results:** Cyanazine residue was extracted with acetone from the raw products of four representative medicinal plants - *Scutellaria baicalensis*, *Paeonia lactiflora*, *Platycodon grandiflorum* and *Angelica gigas*. The extract was diluted with a large volume of saline water and directly partitioned into dichloromethane to remove polar co-extractives in the aqueous phase. It was then purified using optimized Florisil column chromatography. HPLC analysis conducted using an octadecylsilyl column allowed the successful separation of cyanazine from co-extractives of the samples, and the amount was sensitively quantified by ultraviolet absorption at 225 nm with no interference. The accuracy and precision of the proposed method were validated by conducting recovery experiments on each medicinal crop sample fortified with cyanazine at two concentration levels per crop in triplicate.

**Conclusions:** The mean recoveries ranged from 91.2% to 105.3% for the four representative medicinal crops. The coefficients of variation were less than 10%, irrespective of the sample types and fortification levels. The limit of quantification of cyanazine was 0.02 mg/kg as verified by the recovery experiment. A confirmatory method was performed by liquid chromatography/MS using selected-ion monitoring technique to clearly identify the suspected residue.

**Key Words:** *Angelica gigas*, *Paeonia lactiflora*, *Platycodon grandiflorum*, *Scutellaria baicalensis*, Cyanazine, HPLC-UVD/MS, Medicinal Crops, Residue

### 서 언

최근, 동서양을 막론하고 한약에 대한 관심이 증가함에 따라 동아시아 국가들은 한약재의 원료가 되는 약용작물의 생산에 주력하고 있으며, 우리 국민들의 건강에 대한 관심 또한 높아져 약용작물은 한약의 원료로서도 식품으로서도 그 수요는 점차 증가하고 있는 추세를 보이고 있다 (Lee *et al.*, 2010a). 이러한 한약재 및 식품원료로 사용가능한 식물성 원료의 사용이 증가함에 따라 야생채취보다는 생산량 확보를 위해 약용작물로서 재배가 이루어지고 있으며, 재배과정 중 발

생하는 병해충 및 잡초를 제거할 목적으로 농약을 사용함으로써 수확된 약용작물의 잔류농약 관리가 필요한 실정이다 (Seo *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2008). 또한, 국내에 등록되어 있지 않거나 분석법이 확립되어 있지 않은 농약의 경우, 수입 농산물 혹은 한약재에 특정 농약 성분이 잔류하고 있어도 수입식품 및 한약재의 잔류농약 검사기관에서는 해당 농약성분의 분석법 미비로 인해 검출이 불가능할 수 있으므로, 국내 미등록 농약이지만 외국에서 사용빈도가 높은 농약에 대해서는 신규 분석체계 확립을 통한 수입식품 및 한약재의 안전성 확보가 범국민적으로 중요한 사안이 될 것이다 (Lee *et al.*,

†Corresponding author: (Phone) +82-33-540-3321 (E-mail) cmg7004@kangwon.ac.kr

Received 2016 April 21 / 1st Revised 2016 May 16 / 2nd Revised 2016 May 31 / 3rd Revised 2016 June 7 / Accepted 2016 June 7

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2010b). 특히, 약용작물에 대한 미등록 농약의 사용, 국내사용 금지농약 사용, 안전사용기준의 미준수 및 안전성 검사결과 부적합 발생 등 여러 측면에서 문제점들이 나타나고 있고, 수입되는 한약재 및 약용작물에 대해서도 사용되고 있는 농약의 종류가 각 나라마다 상이하므로 약용작물에 대한 잔류농약 평가는 반드시 이루어져야 할 과제이다 (Lee *et al.*, 2010b; Hwang *et al.*, 2011).

약용작물 중 황금과 작약은 국산 한약재 유통의 투명화·활성화 및 안정적인 한약재 생산기반을 유지할 위해 선정된 수급조절품목에 속하며 한약재 중 생산현황 및 품질과 등급의 확립을 위해 유통이력 대상품목으로 지정되어 있는 품목이다 (KCS, 2016). 또한 당귀와 길경과 같은 약용작물은 재배면적 및 생산량이 국내 점유 비율이 높고 가격경쟁력이 높지만 이에 따라 식품으로서의 수입된 품목이 원산지 위변조, 불법유통에 대한 우려가 증가하고 있다 (Lee *et al.*, 2013).

식품의약품안전처 고시 제2011-27호에 의하면 작약의 경우 나프로파마이드 [napropamide, 허용기준치 (MRL, maximum residue limit) 0.1 mg/kg], 트리아디메폰 (triadimefon, MRL 0.5 mg/kg), 트리프루미졸 (triflumizole, MRL 1.0 mg/kg) 등 12 개의 농약에 대하여, 당귀의 경우 메톡시클로르 (methoxychlor, MRL 1.0 mg/kg), 엔토설판 ( $\alpha$ -endosulfan MRL 0.2 mg/kg) 등 7종의 농약에 대하여, 길경의 경우 나프로파마이드 (napropamide, MRL 0.1 mg/kg), 싸이퍼메쓰린 (cypermethrin, MRL 0.5 mg/kg) 등 3종의 농약에 대한 허용기준치가 제시되어 지고 있으나 (KFDA, 2011) 국내 미등록 농약인 triazine계 제조제에 대해서 농약검출 빈도와 잔류량 조사방법이 구명되거나 그 기준이 마련된 바 없다.

Triazine계 제조제는 1950년대부터 광엽잡초의 방제에 주로 사용되고 있다 (Shaner *et al.*, 2010). Triazine계 제조제인 cyanazine은 발암 가능성이 제기됨에 따라 미국에서는 1990년대 후반부터 점차 사용량을 줄여 2002년부터는 자국에서의 사용을 금지하고 있으나 (Infante-Rivard and Weichenthal, 2007), 중국 및 뉴질랜드 등에서는 다양한 발작물의 잡초를 제거하는 데 사용하고 있으며 (Lynch *et al.*, 2006; MHNZ, 2007; NHFPC, 2014), 중국에서의 MRL은 0.05 mg/kg 수준, 뉴질랜드의 경우 0.01 - 0.02 mg/kg 수준으로 보고되고 있다 (MHNZ, 2007; NHFPC, 2014).

한편, cyanazine [2-(4-chloro-6-ethylamino-1,3,5-triazin-2-ylamino)-2-methylpropionitrile] (Table. 1)의 분석은 chemometric방법을 이용한 분광광도분석법이 보고된 바 있고 (Zhang and Pan, 2011), 분자구조 내에 함유되어 있는 amino기에 의해 HPLC (high performance liquid chromatography)로도 분석된 바 있으나 (Snchez-Rasero and Dios, 1988; Hogendoorn and Goewie, 1989), 이러한 선행 연구결과들은 작물에 적용되기는 하지만 토양 및 수환경계로 방출되어 식품

및 음용수를 통해 생태계를 구성하는 생물체에 위해를 가하는 등 환경적 문제점을 일으키는 cyanazine과 유사한 triazine 제조제인 simazine 등과 같이 그 분석대상이 토양 혹은 지하수에 대한 잔류성 및 오염도를 평가하기 위한 목적으로 제한되어 실행되었기 때문에 (Chung *et al.*, 2011) 약용작물을 대상으로 한 분석조건 확립 및 회수율 등이 검토가 필요한 실정이다. 약용작물은 다양한 형태의 배당체 성분들을 포함하고 있어 이들로 부터 농약성분의 추출 및 분리는 쉽지 않으므로 (Hwang *et al.*, 2011), 액-액 분배과정 및 흡착크로마토그래피 정제 등을 포함한 시료 전처리 및 조제과정의 최적화 와 추가적인 재확인법을 통해 분석법의 신뢰성을 제고하고자 하였다.

따라서, 본 연구는 약용작물인 황금 (*Scutellaria baicalensis*), 작약 (*Paeonia lactiflora*), 길경 (*Platycodon grandiflorum*) 및 당귀 (*Angelica gigas*)를 대상으로 국내에서는 미등록 농약이지만 중국 및 뉴질랜드 등 외국에서 발작물 제조제로 사용하고 있는 triazine계 제조제인 cyanazine에 대해 정확성 및 정밀성이 확보된 약용작물에 적용 가능한 잔류분석법을 확립하여 한약재로 사용되는 국내·외 유통 약용작물에 대한 잔류농약 검사의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기구

본 연구에 사용된 cyanazine은 순도 98.0% 이상의 분석용 표준품을 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 표준품을 methanol에 녹여 1,000 mg/l 의 농도가 되도록 stock solution을 조제하여 -20°C의 냉동고에서 보관하면서 필요 시 마다 methanol로 희석하여 사용하였다.

**Table 1.** Physicochemical properties of cyanazine (WHO, 2003).

Common name	Cyanazine	
IUPAC name	2-(4-chloro-6-ethylamino-1,3,5-triazin-2-ylamino)-2-methylpropionitrile	
Physical chemistry	Molecular weight : 240.7	Molecular formula : C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>
	Melting point : 167.5 - 169.0 °C	Log P <sub>ow</sub> : 2.2
	Water solubility : 171.0 mg/l (20 °C)	Vapour pressure : 2.1 × 10 <sup>-7</sup> to 10.0 × 10 <sup>-7</sup> Pa (20 °C)
Chemical structure		

Florisil (60 - 100 mesh)은 J. T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)로부터 구입하여 130°C에서 하룻밤 이상 가열, 활성화하여 사용하였다 (KFDA, 2012). *n*-Hexane, methanol, acetonitrile, dichloromethane, acetone 및 ethyl acetate는 잔류분석용을, deionized water는 HPLC용을 J. T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 유기용매 및 무기시약은 시약특급 또는 잔류분석용을 사용하였다. 감압농축기는 Eyela NE-1000SW (Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하였고, 시료는 고속 균질기인 Ultra-Turrax T-25 (IKA, Wilmington, NC, USA)를 이용하여 마쇄 및 균질화 하였다.

**2. 약용작물 시료**

본 연구에 사용된 대표 약용작물은 한약 조제 시 사용 빈도 및 활용도가 높은 길경, 당귀, 작약 및 황금을 선정하였다. 대표 약용작물은 서울특별시 서대문구에 위치한 경동시장에서 건재를 구입한 후 식품공전 상 검체 처리방법 (MFDS, 2012)에 따라 전처리하여 사용하였으며, 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인하였다.

**3. HPLC-UVD/MS 기기분석 조건**

Cyanazine은 분자구조 내에 amino기를 포함하고 있어 GLC (gas-liquid chromatography) 분석 시 열분해 등에 의해 분리능이 열등해질 가능성이 있으므로 HPLC 분석법을 적용하고자 하였다. Cyanazine 분자구조 내 conjugation system에 착안하여 비교적 장과장의 자외흡광이 예상되므로 검출기는 자외흡광검출기 (ultra violet detector; UVD)를 이용하였다. 분리용 column은 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> RS (4.6 × 250 mm, 5 μm, YMC Inc., Wilmington, NC, USA)를 사용하여 UVD가 장착된 Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였고, 잔류분의 재확인을 위한 LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) 분석에는 Agilent 6110 Quadruple LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 각각의 자세한 분석 조건은 Table 2에 나타내었다.

**4. 표준검량선 및 분석정량한계 (limit of quantitation, LOQ)**

Cyanazine의 stock solution을 희석하여 0.05 - 5.0 mg/l 의 농도가 되도록 농도별 표준용액을 조제하고, 각 20 μl 를 HPLC에 주입하여 분석된 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다.

분석법의 정량한계는 무농약으로 확인된 건재 상태의 각 약용작물 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 후, 분석기기의 정량한계와 시료량 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계산하여 아래의 계산식에 의해 산출하였으며 (Lee et al., 2011), 동일 수준으로 cyanazine을 처리한 회수를 시험으로 재확인하였다.

**5. 시료의 추출 및 분배**

건재 상태의 각 약용작물 시료 25 g에 acetone 100 ml를 가

$$LOQ (mg/kg) = \frac{\text{기기 정량한계 (ng)}}{\text{주입량 (\mu l)}} \times \frac{\text{시료용액 (ml)}}{\text{시료량 (g)}}$$

하고 고속 균질기상에서 2분간 고속마쇄 (12,000 rpm), 추출하였다. 추출물을 여과지 (Toyo No. 6, Tokyo, Japan)가 장착된 Buchner funnel 상에서 여과하고 시료 및 균질기 컵을 여분의 acetone 40 ml로 씻어 앞서의 여과액과 합하였다. 합친 추출액을 1 l 용량의 분액여두에 옮기고 포화식염수 50 ml와 증류수 450 ml를 첨가한 뒤 dichloromethane으로 50 ml씩 2회 분배 추출하였다. 합친 dichloromethane 추출액은 수분 함유에 의해 40°C에서 감압농축하는 경우 농축 수율이 낮아지기 때문에 무수 sodium sulfate에 통과시켜 탈수한 후 감압 농축 및 건조하였고, 건조된 잔류물에 dichloromethane 10 ml를 첨가하여 재용해한 후 Florisil 흡착 크로마토그래피에 직접 공시하였다 (Lee et al., 2011).

**Table 2.** HPLC-UVD and LC/MS operating parameters for the analysis and confirmation of cyanazine.

HPLC-UVD	
Instrument	Agilent 1200 HPLC system
Detector	Ultra violet detector (UVD)
Column	YMC-Pack Pro C <sub>18</sub> RS (4.6 × 250 mm, 5 μm)
Column temp.	35°C
Mobile phase	Acetonitrile/water (40/60, v/v)
Flow rate	1 ml/min
Wavelength	UV 225 nm
Sample size	20 μl
LC/MS	
Instrument	Agilent 6110 Quadruple LC/MS
Column	YMC-Pack Pro C <sub>18</sub> RS (2.0 × 150 mm, 3 μm)
Column temp.	35°C
Mobile phase	Acetonitrile/water (40/60, v/v)
Flow rate	0.3 ml/min
Sample size	5 μl
Ionization	Electrospray ionization (ESI), positive-ion mode
Drying gas	N <sub>2</sub> , 10.0 l /min
Gas temp.	350°C
Capillary voltage	3.5 kV
Mass range (m/z)	200 - 600

### 6. Florisil 흡착 크로마토그래피

내경 1.5 cm, 길이 40 cm의 유리칼럼에 활성화시킨 Florisil 10 g을 건식 충전한 후, 3 g의 무수 sodium sulfate를 그 위에 첨가하였다. 칼럼에 *n*-hexane 50 ml를 가하여 상단에 소량의 *n*-hexane이 남을 정도로 유출시켜 버린 후 dichloromethane 10 ml에 녹인 시료 용액을 가하여 약 3 ml/min의 유속으로 유출시켰다. 충전제 표면이 노출되기 직전 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액 (95/5, v/v) 150 ml를 용출시켜 버린 후 재차 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액 (85/15, v/v) 150 ml를 용출시켜 받았다. Cyanazine이 용출된 분획은 40°C에서 감압 농축, 건조하고 잔류물을 acetonitrile/water (40/60, v/v) 10 ml에 재용해하여 HPLC로 분석하였다.

### 7. 대표 약용작물에 대한 cyanazine의 회수율 시험

본 연구에서 확립한 cyanazine 잔류분석법의 효율 및 신뢰성을 검증하기 위해 실제 존재 상태의 약용작물 시료에 대한 회수율 시험을 수행하였다. 즉, 분쇄한 각 대표 약용작물 시료 25 g에 LOQ의 10배 및 50배에 해당하는 cyanazine 표준용액을 각각 3반복으로 처리한 다음 상기 분석과정을 수행하여 회수율과 분석오차를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. HPLC 분석조건의 확립

Cyanazine의 최적 HPLC 분석과정을 선정하기 위하여 methanol에 용해한 10 mg/l의 표준품을 on-line HPLC/DAD를 이용하여 190 - 400 nm 범위에서 최대흡수과장 ( $\lambda_{max}$ )을 조사하였다. 그 결과, 220 nm에서 최대 흡광력을 나타내었으나 (Fig. 1), 220 nm는 약용작물 시료 중 함께 추출되는 다양한 배당체 및 매트릭스 성분의 흡광과 이동상 용매로 사용되는 유기용매의 자외선 흡광 (UV cut-off)이 예상되므로, 상대적으로 약용작물의 추출물 및 이동상 용매에 의한 간섭 정도가 작고, cyanazine의 기기 분석 시 220 nm 대비 감도 저하에 영향이 작을 것으로 판단되는 225 nm를 검출과장으로 설정하였다.

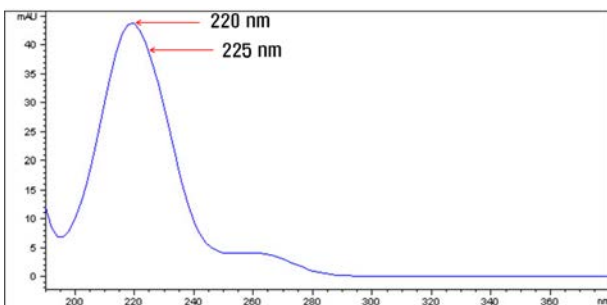


Fig. 1. UV absorption spectrum of cyanazine.

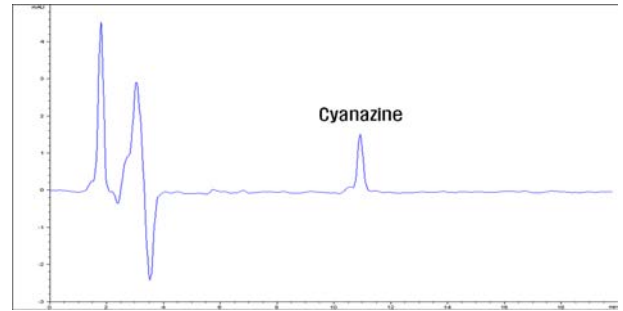


Fig. 2. Chromatogram of cyanazine standard solution (20  $\mu$ l of 0.05 mg/l in methanol).

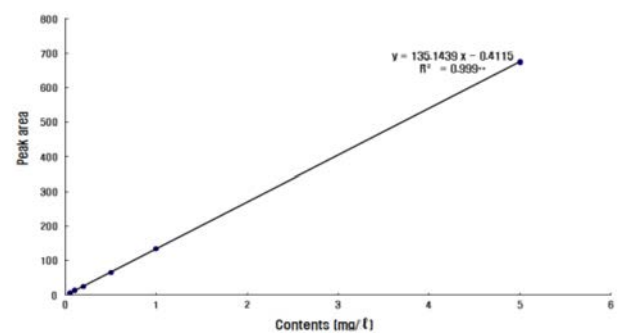


Fig. 3. Calibration curve of cyanazine in HPLC.

HPLC 분석의 분리용 column은 C<sub>18</sub>계열의 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> RS (4.6 × 250 mm, 5  $\mu$ m)를 이용하였고, 이동상은 cyanazine이 해리가 되지 않는 중간극성 화합물임을 감안하여 acetonitrile 수용액을 사용하였다. 이동상 용매 중 acetonitrile의 농도를 달리하여 머무름시간 및 peak의 이론단수 등을 검토한 결과, 등용매용리 (isocratic) 조건에서 acetonitrile/water (40/60, v/v) 혼합용액이 머무름시간과 분리도 측면에서 가장 적합한 양상을 나타내었으며 (Fig. 2), 이때 cyanazine의 머무름시간은 11.0분이었다. 분리능과 감도를 증대시키기 위하여 용매구배법 (gradient elution)을 사용할 수 있으나 이 경우 분석시간이 지연될 수 있고, 머무름시간의 재현성이 등용매용리 조건에 비해 상대적으로 열등할 수 있다. 본 분석법의 개발 목적은 시료 입수 후 단시간 내에 분석 작업이 수행되어야 하는 일상적 공정 분석용이므로 분석법의 안정성 측면에서 보다 유리한 등용매용리 조건을 선정하였다.

분석기기의 정량한계는 크로마토그램에서 peak로써 나타난 대상 성분의 분석 결과를 신뢰성 있게 수치화할 수 있는 한계 농도로써, 크로마토그램 상에서 검출된 peak의 S/N (signal/noise)의 비가 최소 10 이상을 나타내는 성분의 농도를 의미한다 (Fong *et al.*, 1999; Miller, 2005). Table 2의 HPLC 조건에서 cyanazine 표준용액을 분석하여 S/N비를 계산한 결과, 기기상의 정량한계 (S/N  $\geq$  10)는 1 ng 수준이었다.

한편, cyanazine의 농도별 표준용액 (0.05 - 5 mg/l) 20  $\mu$ l를

HPLC에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은  $y = 135.1439x - 0.4115$  ( $R^2 = 0.999^{**}$ )로 우수한 직선성을 나타내었다 (Fig. 3). 즉, cyanazine은 기기 정량한계 수준인 1 ng에서부터 그 100배인 100 ng까지의 표준검량선에 대한 회귀계수가  $R^2 = 0.999^{**}$  이상으로 정량의 직선성이 검정되었으므로 비교적 넓은 농도 범위의 시료 중 잔류량을 비례적으로 산출하는 것이 가능하였다.

**2. 약용작물 시료의 cyanazine 추출 및 분배과정의 확립**

건재 상태의 약용작물 시료로부터 cyanazine 성분을 추출하기 위한 용매로는 acetone을 사용하였다. 약용작물 추출액으로부터 대상 성분과 함께 추출되는 방해물질을 1차적으로 제거하기 위한 조정제법으로는 액-액 분배법을 사용하였다. 즉, 수용성 유기용매 추출액을 다량의 포화식염수/중류수로 희석한 후 직접 비극성 용매로 분배 추출하는 방법을 사용하였는데, 이는 US FDA법이나 AOAC법에서 중간 및 비극성 농약 성분에 대하여 보편적으로 사용되며 (AOAC, 2000; Lee *et al.*, 2008), 번거로운 추출액의 농축과정을 생략할 수 있는 장점이 있다. 분배용매로 *n*-hexane, 2종의 *n*-hexane/ dichloromethane 혼합액, dichloromethane 등 총 4종을 공시하여 cyanazine 성분의 분배효율을 조사하였다 (Table 3).

Cyanazine 성분의 액-액 분배조건에 따른 분배효율을 조사한 결과, *n*-hexane 용액 100 ml로 분획하였을 때의 회수율은 5.2% 수준이었으며, *n*-hexane/dichloromethane 혼합액 (80/20, v/v) 100 ml로 분획하였을 때 회수율은 58.2% 수준, *n*-hexane/dichloromethane 혼합액 (20/80, v/v) 100 ml로 분획하였을 때는 83.7%, dichloromethane 50 ml로 2회 반복한 분획은 96.1%를 나타내어 분배용매의 극성 강도가 강할수록 높은 회수율을 나타내었다. 따라서, 공시된 액-액 분배조건 중 가장 우수한 회수율을 나타낸 dichloromethane 50 ml로 2회 반복하여 분획을 수행하는 분배용매 IV의 액-액 분배조건을 cyanazine의 최종 분배용매로 선정하였다.

**3. Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건 최적화**

약용작물에 함유된 cyanazine의 분석 시 상기 액-액 분배과

**Table 3.** Efficiency of liquid-liquid partition of crude extract by different solvents for cyanazine.

Compound	Recovery ratio (%)			
	Partition I	Partition II	Partition III	Partition IV <sup>1)</sup>
Cyanazine	5.2 ± 0.8	58.2 ± 1.1	83.7 ± 2.3	96.1 ± 1.8

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. <sup>1)</sup>Partition 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).

**Table 4.** Elution profile of cyanazine on Florisil column chromatography.

Elution solvent (v/v)	Recovery ratio (%) <sup>1)</sup>			
	0 - 50 ml	51 - 100 ml	101 - 150 ml	Total
95 : 5 <sup>2)</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0
85 : 15 <sup>3)</sup>	9.6	85.2	0.0	94.8
80 : 20 <sup>3)</sup>	80.2	15.0	0.0	95.2

<sup>1)</sup>10 g of activated Florisil (60 - 100 mesh) was packed without solvent. <sup>2)</sup>*n*-Hexane/ethyl acetate (v/v). <sup>3)</sup>Pre-washed with 150 ml of solvent system, and then eluted *n*-hexane/ethyl acetate (v/v).

정을 통해 상당량의 불순물 및 비극성 간섭물질들이 제거되었을 것으로 판단되나, 약용작물의 종류에 따라 시료로부터 유래되는 다양한 기타 불순물이 존재하므로, 추가적인 정제과정이 필요할 것으로 판단되어 흡착크로마토그래피에 의한 정제법을 검토하였다. 흡착크로마토그래피는 잔류농약 분석 시 가장 많이 이용하는 방법으로, 흡착제로는 silica gel, Florisil 및 alumina 등이 많이 사용된다. 이 중 Florisil은 색소와 지방의 제거가 뛰어나 미국의 FDA나 AOAC등에서도 가장 많이 사용하는 방법으로, 본 연구에서도 cyanazine의 극성을 고려하여 Florisil을 흡착제로 선정 하였고, 용매의 극성 조절을 위해 *n*-hexane/ethyl acetate 혼합용액의 용매체계를 이용하여 최적화하였다 (Table 4).

Florisil 흡착크로마토그래피용 용매의 다양한 극성 조절을 이용하여 cyanazine의 회수율을 조사한 결과, *n*-hexane/ethyl acetate 혼합액 (95/5, v/v) 150 ml로 pre-washing한 후, *n*-hexane/ethyl acetate 혼합액 (85/15, v/v) 150 ml로 용출할 경우 94.8%의 우수한 회수율을 나타내었으며, ethyl acetate의 비율을 20%로 조절하여 용출용매의 강도를 높여도 회수율의 개선정도는 미미하였다. 따라서 Florisil 흡착크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거를 위한 추가적인 정제법은 상기의 방법과 같이 적용하였다.

**4. 약용작물 시료 중 cyanazine의 분석정량한계 및 회수율**

본 연구에서 확립한 시료 추출 및 정제, 그리고 기기분석 과정을 무농약 약용작물 시료에 적용한 결과는 Fig. 4와 같다. 무농약 약용작물의 최종 시료용액에서 대상농약과 동일한 머무름시간에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였고, 분석기기의 정량한계 (LOQ)와 시료량, 그리고 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 분석법의 정량한계를 산출하였다. 본 연구에서 무농약 약용작물 시료에서 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 후 산출된 cyanazine의 정량한계는 0.02 mg/kg 이었으며, 국제기준인 Codex (CAC, 2003) 및 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서 (KFDA, 2012)에서 권장하는 잔류농약분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 허용기준의 1/2 이하의 정량한계

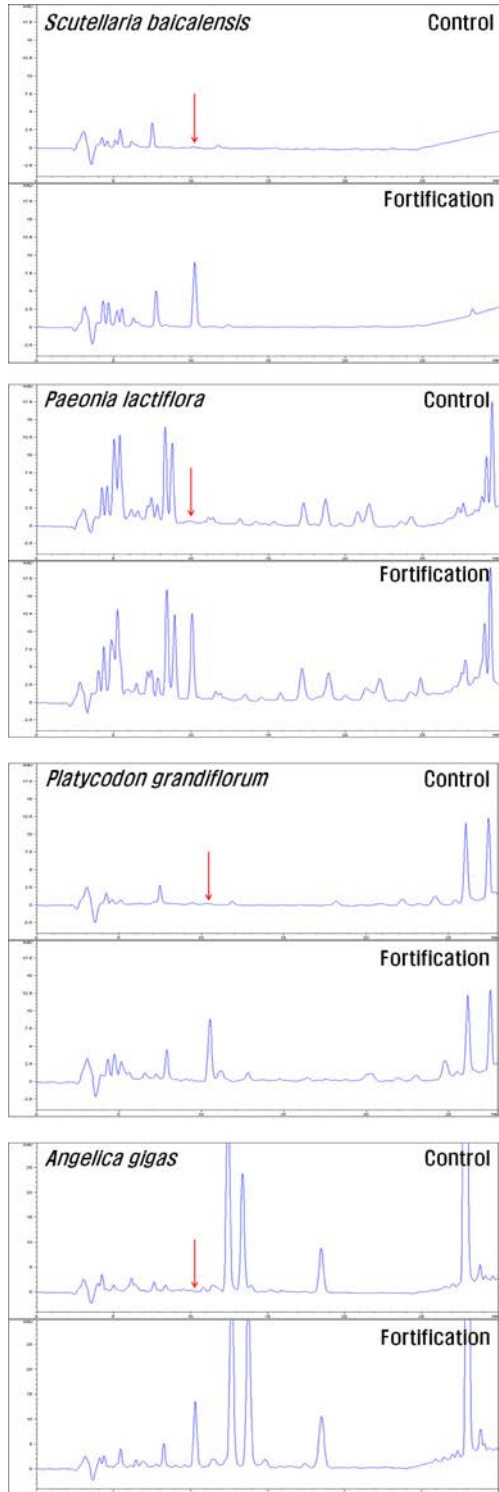


Fig. 4. HPLC chromatograms of major medicinal crops extracts for the analysis of cyanazine, fortified at ten-fold of LOQ level.

기준에 적합하였다.

각각의 약용작물 무처리 시료에 cyanazine 표준용액을 정량

Table 5. Recovery ratio of cyanazine with different medicinal crop samples.

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery ratio (%)	CV (%)	LOQ (mg/kg)
<i>Scutellaria baicalensis</i>	0.2	91.2 ± 1.7	1.9	0.02
	1.0	91.5 ± 0.9	1.0	
<i>Paeonia lactiflora</i>	0.2	105.3 ± 1.7	1.6	0.02
	1.0	100.1 ± 1.0	1.0	
<i>Platycodon grandiflorum</i>	0.2	98.3 ± 2.3	2.4	0.02
	1.0	95.1 ± 1.1	1.1	
<i>Angelica gigas</i>	0.2	94.7 ± 0.4	0.4	0.02
	1.0	96.0 ± 0.7	0.7	

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 첨가하고, 상기 확립된 분석방법에 의하여 대표 약용작물 시료를 3반복으로 분석하여 회수율을 조사한 결과, 정량한계 10배 수준에서는 91.2-105.3%, 정량한계 50배 수준에서는 91.5-100.1%의 양호한 회수율을 보였고, 재현성도 양호하여 분석의 상대표준편차 (CV, %)는 최대 2.4%로 조사되었다. 따라서, 처리수준 및 약용작물 시료 종류에 관계없이 잔류분석기준인 회수율 70-120% 범위와 분석의 상대표준편차 (CV, %) 10% 이내를 만족하였다 (Table 5).

이상의 결과로 볼 때, 본 연구에서 확립된 cyanazine의 분석법은 국내외에서 유통되는 약용작물 시료에 함유된 cyanazine의 잔류농약 분석 및 검사에 충분히 적용 가능함을 확인하였다.

### 5. LC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

상기의 과정으로 개발된 분석법의 신뢰성을 확보하기 위하여 LC/MS에 의한 재확인 과정을 추가하였다. LC/MS 분석 시 분석대상 성분의 분자구조로부터 유도되는 분자이온과 주요 fragment ion을 확인함으로써 보다 신뢰성 있는 정성확인이 가능하다는 장점이 있다 (Kwon *et al.*, 2008).

Cyanazine은 acetonitrile/water의 이동상 용매에서도 비교적 이온화가 잘 이루어져 일반적으로 이온화 향상을 위해 이동상 용매에 추가적으로 유기산 등을 첨가하는 이온화 증진 방법이 필요치 않았으며, HPLC 분석에 적용한 이동상 용매 조건을 LC/MS에도 동일하게 적용하였다. Fig. 5와 6에 나타난 TIC (total-ion chromatogram) 및 mass spectrum으로부터 cyanazine은 ESI (electrospray ionization) positive ion 조건에서 용이하게 protonation 되어  $[M+H]^+$ 인  $m/z$  241.1을 형성함을 알 수 있다. 또한, cyanazine은 한 개의 chlorine을 함유하고 있으므로  $^{35}Cl$ 과  $^{37}Cl$ 간의 동위원소 비율에 따라  $m/z$  241.1과  $m/z$  243.1이 3:1 비율로 형성되는데 (McLafferty and

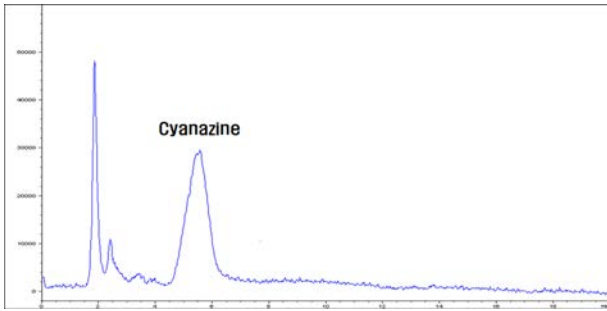


Fig. 5. Total-ion chromatogram (TIC) of cyanazine in LC/MS.

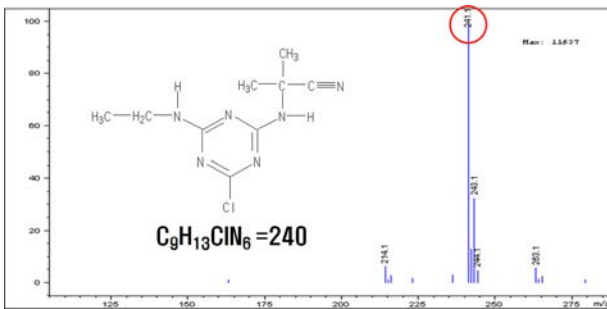


Fig. 6. ESI (+) mass spectrum of cyanazine.

Turecek, 1993), 이러한 비율을 mass spectrum을 통해 명확히 확인할 수 있었다. 본 연구에서 cyanazine의  $[M+H]^+$  peak가 base peak로 나타나므로 selected-ion monitoring (SIM)용 ion으로는  $[M+H]^+$ 인  $m/z$  241.1 ion만을 이용하여도 충분한 정성적 확인이 가능하였다 (McLafferty and Turecek, 1993; Ardrey, 2003).

Fig. 7은 본 실험에 사용된 대표적 약용작물 시료 4종에 대해 cyanazine의 잔류분을 재확인한 SIM (selected-ion monitoring) chromatogram이며, 본 실험에서 사용된 모든 약용작물 무처리 시료에서는 cyanazine 성분의 peak가 전혀 관찰되지 않았고, 인위 첨가된 시료에서는 동일한 머무름시간대에 정확하게 cyanazine의 잔류분만을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용한 LC/MS의 SIM조건을 이용할 경우에도 HPLC-UVD를 이용한 정량법과 더불어 약용작물 시료에 함유된 cyanazine 잔류분의 추가적 정성분석법으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

상기의 검증과정을 통해 주요 약용작물 시료 중 triazine계 제초제 cyanazine의 HPLC-UVD/MS 분석법을 확립하였으며, acetone 추출법, dichloromethane 액-액 분배법 및 Florisil 흡착크로마토그래피법의 적용을 통해 분석법을 최적화 하였다. Cyanazine의 정량적 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건을 확립하였으며, 정량한계 (LOQ)는 0.02 mg/kg 이었다. 각 대표 약용작물 시료에 대해 정량한계의 10배 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과, 모든 처리농도에서 91.2 - 105.3% 수준을

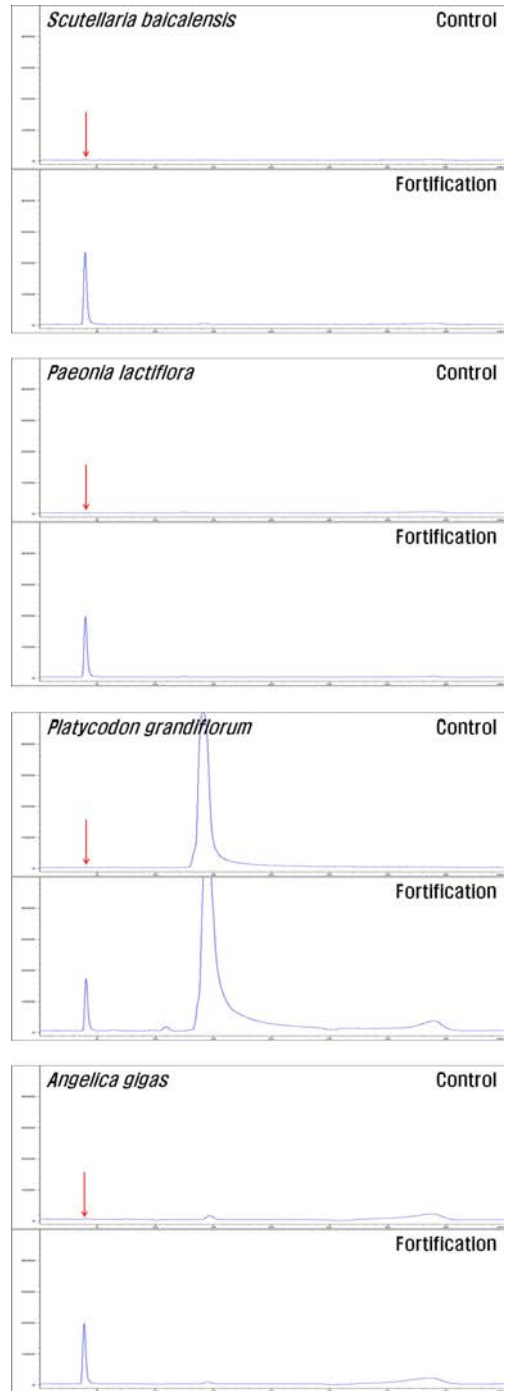


Fig. 7. SIM chromatograms of major medicinal crops for the confirmation of cyanazine, fortified at ten-fold of LOQ level.

나타내었으며, 반복 간 변이계수 (CV)는 최대 2.4%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70 - 120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 만족한 결과를 도출하였으며 (KFDA, 2012), 또한 LC/MS SIM을 이용하여 실제 약용작물 시료에 적용하

여 재확인 하였다. 이상의 결과로 약용작물 시료를 대상으로 한 cyanazine의 HPLC-UVD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용 가능할 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(과제번호: 201510100)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Association of Analytical Chemists(AOAC).** (2000). Pesticide and industrial chemical residues, In Official method of analysis (17th ed.). Association of Analytical Chemists. Arlington, VA, USA. p.1-88.
- Ardrey RE.** (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction. John Wiley and Sons. Chichester, England. p.98-122.
- Choi YH, Park SK, Cho TH, Ha KT, Seung HJ, Kim SJ, Lee KA, Jang JI, Jo HB and Choi BH.** (2008). Pesticide residues in medicinal herbs. Report of Seoul Institute of Health Environment. 44:70-85.
- Chung IM, Park IM and Kim SH.** (2011). Development and comparison of analytical methods for measuring simazine herbicide using gas chromatography/ion trap, gas chromatography/mass selective detector, and high performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometer. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 54:744-749.
- Codex Alimentarius Commission(CAC).** (2003). Guidelines on good laboratory practice in residue analysis: CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003. Codex Alimentarius Commission. Rome, Italy. p.2-36.
- Fong WG, Moye HA, Seiber JN and Toth JP.** (1999). Pesticide residues in food: Methods, technologies and regulations. John Wiley and Sons. Chichester, England. p.3-4, 40-44.
- Hogendoorn EA and Goewie CE.** (1989). Residue analysis of the herbicides cyanazine and bentazone in sugar maize and surface water using high-performance liquid chromatography and an on-line clean-up column-switching procedure. Journal of Chromatography A. 475:432-441.
- Hwang JI, Jeon YH, Kim HY, Kim JH, Lee YJ, Park JY, Kim DH and Kim JE.** (2011). Application of macroporous diatomaceous earth column for residue analysis of insecticide endosulfan in herbal medicines. Korean Journal of Environmental Agriculture. 30:60-67.
- Infante-Rivard C and Weichenthal S.** (2007). Pesticides and childhood cancer: An update of Zahm and Ward's 1998 review. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 10:81-99.
- Korea Customs Service(KCS).** (2016). Notices of management of distribution track record after customs clearance about import items. Korea Customs Service. Daejeon, Korea. <http://www.customs.go.kr/kcshome/law/rule/RuleUserDetail.do?layoutMenuNo=20215&admRul=2&admRulSeq=4251>(Cited by 2016 May 19).
- Korea Food and Drug Administration(KFDA).** (2011). Acceptance criteria and test methods about residual and pollutant in herbal medicine. Korea Food and Drug Administration. Cheongju, Korea. <https://lawwizice.wordpress.com/tag/%EC%A0%9C2011-27%ED%98%B8/>(cited by 2016 Jan 13).
- Korea Food and Drug Administration(KFDA).** (2012). Pesticide analytical residues manual in food code. Korea Food and Drug Administration. Cheongju, Korea. p.3-60.
- Kwon CH, Chang MI, Im MH, Choi H, Jung DI, Lee SC, Yu JY, Lee YD, Lee JO and Hong MK.** (2008). Determination of mandipropamid residues in agricultural commodities using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. Analytical Science and Technology. 21:518-525.
- Lee AR, Jang S, Kim TH, Lee AY, Choi G and Kim HK.** (2013). Monitoring of residual sulfur dioxide in herbal medicines distributed at domestic. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:124-129.
- Lee JH, Park HW, Keum YS, Kwon CH, Lee YD and Kim JH.** (2008). Dissipation pattern of boscalid in cucumber under greenhouse condition. The Korean Journal of Pesticide Science. 12:67-73.
- Lee JH, Shin KS, Jeon YH, Kim HY, Hwang JI, Lee BH, Kang IH, Kang SJ, Kim TH and Kim JE.** (2010a). Suggestion for establishment of temporary MRLs and safe use guideline of the organophosphorus insecticides in Jinpi. Korean Journal of Environmental Agriculture. 29:66-71.
- Lee SJ, Hwang YS, Kim YH, Nam MY, Hong SB, Yun WK, Kwon CH, Do JA, Im MH, Lee YD and Chung MG.** (2010b). Determination of fomesafen residue in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. The Korean Journal of Pesticide Science. 14:95-103.
- Lee SJ, Kim YH, Song LS, Hwang YS, Lim JD, Sohn EH, Im MH, Do JA, Oh JH, Kwon KS, Lee JK, Lee YD and Chung MG.** (2011). Development of analytical method for fenoxycarb, pyriproxyfen and methoprene residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. The Korean Journal of Pesticide Science. 15:254-268.
- Lynch SM, Rusiecki JA, Blair A, Dosemeci M, Lubin J, Sandler D, Hoppin JA, Lynch CF and Alavanja MC.** (2006). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to cyanazine in the agricultural health study. Environmental Health Perspectives. 114:1248-1252.
- McLafferty FW and Turecek F.** (1993). Interpretation of mass spectra. University Science Books. Sausalito, CA, USA. p.19-50.
- Miller JM.** (2005). Chromatography: Concepts and contrasts(2nd ed.). John Wiley and Sons. Chichester, England. p.286-287.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2012). Korea food code. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. [http://fse.foodnara.go.kr/residue/mobile/menu\\_01\\_03.jsp?idx=10265](http://fse.foodnara.go.kr/residue/mobile/menu_01_03.jsp?idx=10265)(cited by 2015 Oct 9).
- Ministry of Health New Zealand(MHNZ).** (2007). The investigation and surveillance of agrichemical spraydrift incidents: Guidelines for public health units(revised edition). Ministry of Health New Zealand. Wellington, New Zealand. p.84.
- National Health and Family Planning Commission(NHFPC).**

- (2014). Maximum residue limits for pesticides in food. National Health and Family Planning Commission. Beijing, China. p.130.
- Sanchez-Rasero F and Dios GC.** (1988). Liquid chromatographic method for the determination of cyanazine in the presence of some normal soil constituents. *Journal of Chromatography A*. 447:426-431.
- Seo JS, Son SG, Kim KS, Seo SM and Kim DH.** (1994). Chemical control of weed for *Angelica gigas* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2:187-192.
- Shaner DL, Jason Krutz LJ, Brien Henry WB, Hanson BD, Poteet MD and Rainbolt CR.** (2010). Sugarcane soils exhibit enhanced atrazine degradation and cross adaptation to other s-triazines. *Journal American Society of Sugar Cane Technologists*. 30:1-10.
- World Health Organization(WHO).** (2003). Cyanazine in drinking-water, background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, Switzerland. p.1.
- Zhang G and Pan J.** (2011). Simultaneous spectrophotometric determination of atrazine and cyanazine by chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 78:238-242.