

고체상 추출법에 의한 콩나물 중의 잔류농약 동시 검출

이명훈 · 이태준* · 표동진†

강원대학교 화학과

*강원도 보건환경연구원

(1993. 12. 10. 접수)

Simultaneous detection of residual fungicide in Bean Sprouts by Solid-phase Extraction

Myunghwoon Lee, Taejoon Lee* and Dongjin Pyo†

Department of Chemistry, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

*Institute of Health and Environment, Kangweon-Do, Chuncheon 200-093, Korea

(Received Dec. 10, 1993)

요약 : 콩나물(bean sprouts)에 잔류되어 있는 농약, benomyl, topsin-M과 thiram을 고체상 추출법(solid-phase extraction)과 HPLC를 이용하여 동시에 분석, 정량하는 방법을 개발하였다. 농약성분의 추출로는 ODS 카트리지(cartridge)를 사용하였고, 고정상으로는 C_{18} 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로는 40% CH_3CN 수용액을 1ml/min의 유속으로 276nm에서 검출하였다. 콩나물에서 농약 성분을 추출하기 위한 전처리 방법으로 ODS 카트리지를 이용한 역상 추출방법을 이용하여 각각의 농약성분을 모두 검출할 수 있었다.

Abstract : Benomyl, topsin-M and thiram been known as one of the seed disinfectant. For these studies benomyl, topsin-M and thiram simultaneously had been analyzed by high performance liquid chromatographic method using ODS cartridge. benomyl, topsin-M and thiram was chromatographed using an ODS column and eluent 40% Acetonitrile at a flow rate of 1ml/min. The UV Detector responses at 276nm.

Key words : Bean Sprouts, Solid-Phase Extraction, ODS cartridge, HPLC.

1. 서론

식물 재배시 등에 사용되는 유기 합성 농약은 병충해를 구제하는 데 있어 적용 범위가 넓고 방제효과가 확실하여 식량 증산에 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 적용대상 및 적용시

기를 정하고 있다.¹⁻³ 또한 1971년도에 농약의 안전사용기준을 만들어 적정 사용을 유도하고 있으나 일부 이를 무시한 무분별한 사용의 경우가 있어 문제가 되고 있다.⁴⁻⁶ 콩나물은 종래 가정에서 키워 식용하였으나 사회의 발전과 더불어 지금은 전문업자가 키운 것을 대부분의 가정에서 구입하여 쓰고 있는 바, 업자가 대량생산 및 시설의 미비 등에서 야기되는 변질을 막기 위하여 종자소독제 등^{7, 8}을 사용하는 경우가 있다.

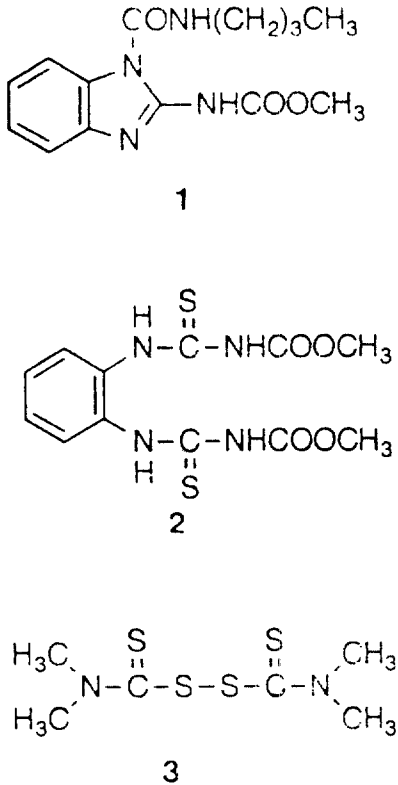


Fig. 1. Structures of Benomyl, Topsin-M and Thiram

1. benomyl, 2. topsin-M, 3. thiram

이런 종자소독제의 대표적인 것으로 benomyl[methyl [1-(butylcarbamoyl)-1H-benzimidazol-2-yl carbamate], topsin-M(thiophanate-methyl) 및 thiram (tetramethyl thiuram disulfide)] 등이 있으며, 이들의 화학적 구조는 Fig. 1과 같다. 이들 농약들의 LD₅₀ (반수 치사량)은 Benomyl이 5g/kg이고, Topsin-M이 3.40g/kg⁹이며, Thiram은 0.64g/kg¹⁰으로 독성이 보통인 농약이다. 이러한 농약성분에 대한 분리 정량법은 benomyl의 경우 MBC(Methyl-2-benzimidazole carbamate)로 유도체화시킨 후 HPLC로 정량하는 법¹¹⁻²⁰ 등이 있으며, topsin-M의 정량법으로는 MBC로 유도체화시킨 후 HPLC로 정량하는 법^{11,21}, chromatotube를 이용한 공정서법²²이 있으며, thiram의 정량법으로는 K. H. Gustofsson 등에 의한 액체크로마토그래피법²³, 흡광도법²⁴ 있으나 전처리 과정 등이

복잡함¹¹⁻²⁶은 물론, 동시분석법이 정립되어 있지 않은 상태이다. 우리는 이러한 물질들을 기존의 방법과는 달리 전처리 과정을 단순화시키고 불순물들을 쉽게 제거할 수 있고 신속하고 정확한 분석을 할 수 있는 장점을 가진 ODS(octadecylsilane) cartridge(C₁₈ cartridge)를 이용한 고체상 추출법(Solid-Phase Extraction)을 택해 역상 HPLC에 의해 분석하는 방법을 시도하여 미량의 잔류농약을 콩나물 중에서 동시에 정량할 수 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

2. 실험

2. 1. 재료

표준물질인 benomyl, topsin-M, thiram은 Sigma사(U.S.A.)와 Riedel-de Haën사(스위스)에서 구입하였고 이동상으로 쓰인 용매는 HPLC용 시약을 사용하였고 다른 시약들은 1등급 시약을 사용하였다. 고체상 추출(Solid-Phase Extraction) 방법에 쓰인 ODS cartridge는 J. T. Baker사(U.S.A.) 제품으로 용량이 3ml인 것을 사용하였다.

콩나물 시료는 시중에서 판매되고 있는 것을 구입하여 사용하였다.

2. 2. 농약성분(Benomyl, Topsin-M, Thiram)의 추출

물기가 제거된 콩나물 시료 10g을 정확히 달아 0.5cm 크기로 잘게 자른 후 5% acetic acid 수용액 20ml로 10분간 교반한 후 거름종이로 걸러 여과액을 ODS(octadecylsilane, C₁₈) cartridge(용량 3ml)에 주입하여 H₂O 10ml로 씻은 후 acetonitrile 15ml로 용리시켰다. 용리액을 진공 회전 증발기로 건조시킨 다음 acetonitrile 1ml로 다시 녹여 역상의 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)로 분리하여 276nm에서 정량하였다.

2. 3. HPLC 조건

본 실험에서 사용한 HPLC 기기는 Beckman사(116 Pump, 126 Detector) 제품이고 컬럼(column)은 분석용으로 Ultrasphere 5μm Spherical 80Å Pore(C₁₈, 4.6×250mm)이었으며, 이동상으로는 acetonitrile 수용액(CH₃CN : H₂O=40 : 60)을 사용하였고, 1ml/min의 유속으로 흘러 주었다. 주입량은 10μl이고,

276nm에서 측정하였으며 피크면적(peak area)에 의하여 정량하였다.

2. 4. 재현성 검사

3개의 균질화한 시료에 같은 양의 표준용액을 각각 10ml씩 넣고 5% acetic acid 수용액 10ml를 가하여 10분간 교반한 후 거름종이에 걸러 ODS 카트리지에 주입한 후 H₂O로 씻은 다음 acetonitrile로 용리시켜 HPLC로부터 각각의 피크면적을 구함으로써 재현성을 검사했다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. HPLC Chromatogram

Fig. 2는 benomyl, topsin-M, thiram의 표준용액

크로마토그램(a)을 보여 주고 있다. benomyl의 머무름 시간(Retention time, t_R)은 3.68분, 피크면적은 4.581이고 topsin-M의 t_R 은 7.25분, 피크면적은 5.897, 그리고 thiram의 경우는 t_R 이 11.96분, 피크면적은 4.553이었다. 그림에서 보듯이 정량하기에 충분한 분리 정도를 보여 주었으며(a) 또한 농약으로 재배하지 않은 시료의 크로마토그램(b)에서 보듯이 세 가지 농약 성분에 방해할 수 있는 어떤 피크도 나타나지 않았다.

Fig. 3은 콩나물 시료를 5% acetic acid 수용액으로 추출한 후 표준물질인 benomyl(11.7 ppm) 1ml, topsin-M(14.5 ppm) 1ml, thiram(18.8 ppm) 1ml를 첨가한 후 ODS cartridge를 통과시켜 역상 크로마토그래피로부터 얻은 크로마토그램이다. 이때 얻은 피크의 면적은 각각 0.455, 0.871, 0.022를 얻었다.

Fig. 4는 원주에서 재배된 콩나물 시료 A, B를 역시



Fig. 2. (a) Typical HPLC Chromatogram of standard solution. : 1. Benomyl 2. Topsin-M 3. Thiram, (b) Typical HPLC Chromatogram of unspiked bean sprouts sample.

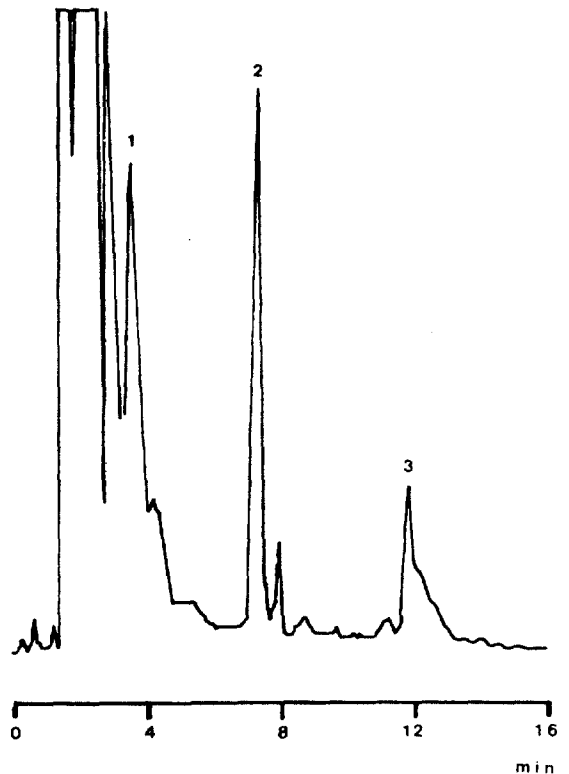


Fig. 3. Chromatogram of spiked standards
1. Benomyl 2. Topsin-M 3. Thiram

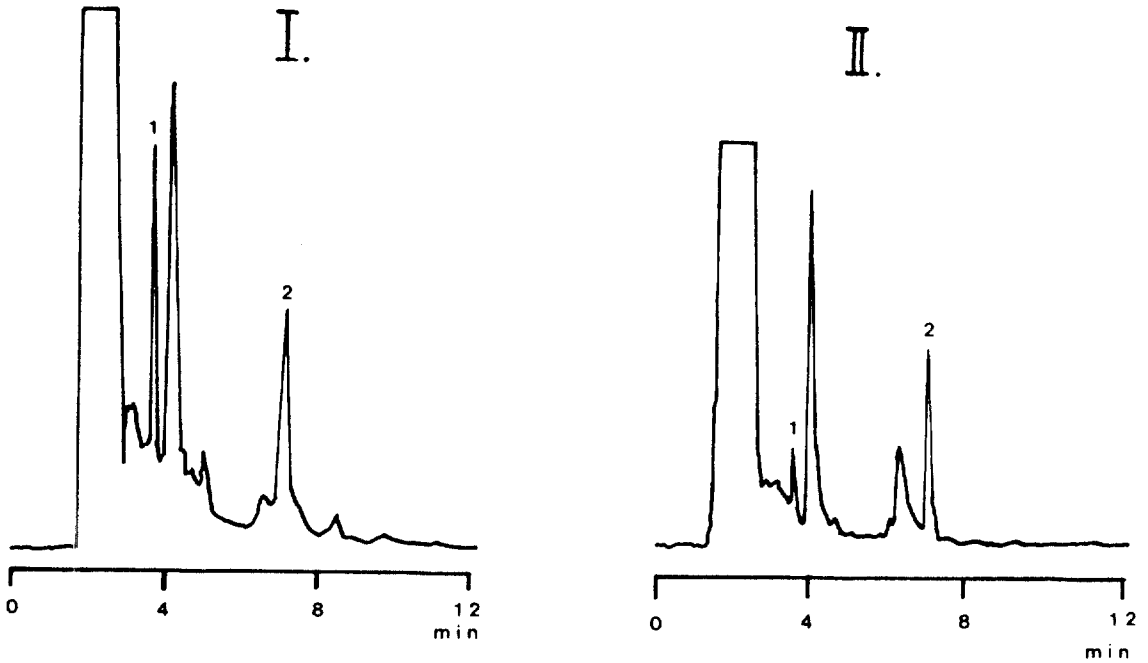


Fig. 4. Chromatograms of Bean Sprouts Sample

I. Bean Sprouts Sample A (1. benomyl, 2. Topsin-M)

II. Bean Sprouts Sample B (1. Benomyl, 2. Topsin-M)

5% acetic acid 수용액으로 추출, ODS cartridge로 정제한 후 HPLC로 얻은 크로마토그램이다. 여기서는 benomyl과 topsin-M만이 검출되었고 thiram은 검출되지 않았다.

3. 2. 재현성 검사

콩나물 시료(원주산 시료 A)를 3회 추출 정제하여 10 μ l씩 주입하여 얻은 크로마토그램에서 각 피크면적의 평균, 평균편차와 평균농도를 Table 1에 나타내었다.

이 자료를 보면 원주산 콩나물 시료 A에서 benomyl이 0.393 피크면적을 보였고 topsin-M은 0.667 피크면적을 보였다. 두 성분에 대해 모두 낮은 표준편차값을 보여 주었다.

Table 2는 HPLC의 재현성을 알아보기 위해 Standard 각각의 물질을 혼합하여 3회 반복 측정하여 얻은 피크면적의 평균값과 표준편차값을 나타낸 결과이다. 이것을 보면 콩나물에 존재하는 잔류농약의 양을 측정하기 위한 HPLC 방법이 뛰어난 재현성을 가진 좋은

Table 1. The amount of residual fungicide in bean sprouts.

	1회	2회	3회	Mean	S. D.	Conc. (ppm)
Benomyl	0.381	0.404	0.393	0.39	0.01	1.09
Topsin-M	0.649	0.668	0.685	0.67	0.02	1.53
Thiram*

*Thiram was not detection

Table 2. Reproducibility of HPLC.

	1	2	3	Mean	S. D.	Conc. (ppm)
Benomyl	4.587	4.632	4.526	4.58	0.05	11.67
Topsin-M	5.893	5.986	5.812	5.90	0.09	14.48
Thiram	4.571	4.610	4.477	4.55	0.07	18.80

방법임을 알 수 있다.

3. 3. 시료의 잔류농약 정량

잔류 농약의 농도를 정량하기 위하여 Fig. 5와 같이 benomyl, topsin-M, thiram의 검량곡선을 작성하였다. benomyl의 경우 1, 2, 3, 4, 5, 6.67ppm 농도의 표준 용액을 가지고 각각 크로마토그램을 얻어 농도와 피크면적 데이터를 최소자승법에 의하여 $\text{농도(ppm)} = (\text{피크면적} + 0.04) / 0.396$ 의 식을 얻었다. topsin-M의 경우 1.15, 2.3, 3.45, 4.6, 5.75, 7.67ppm 농도를 가지고 농도와 크로마토그램에서 얻은 피크면적을 도시한 결과 $\text{농도(ppm)} = (\text{피크면적} - 0.05) / 0.404$ 의 식을 얻었으며, thiram은 2.5, 3.75, 6.25, 8.33ppm 농도를 가지고 도시한 결과 $\text{농도(ppm)} = (\text{피크면적} - 0.02) / 0.241$ 의 식을 얻었다.

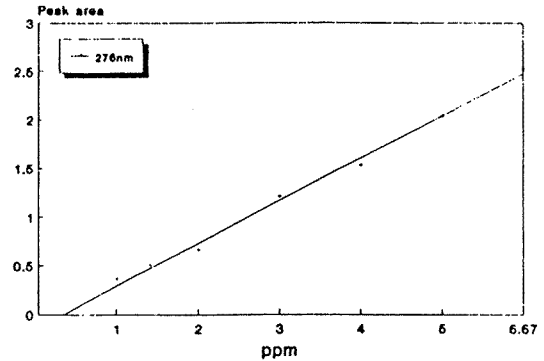
최소자승법에 의하여 얻어진 각각의 식으로부터 계산한 결과 표준용액이 첨가된 시료의 농도는 benomyl이 1.25ppm이었고, topsin-M이 2.03ppm이었으며, thiram은 0.01ppm이었다.

원주산 콩나물 시료 A, B를 정량한 결과 thiram은 모두 검출되지 않았고 시료 A의 경우 benomyl은 1.09ppm이었으며 topsin-M은 1.53ppm이었다. 시료 B의 경우에는 benomyl은 1.07ppm이었으며 topsin-M은 1.58ppm이었다.

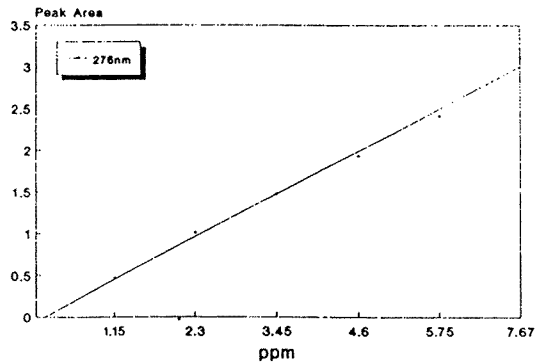
4. 결론

농산물의 잔류농약 분석은 인간의 건강에 위해를 가하는 것을 방지하기 위해 절대적으로 필요하다. 보다 정확하고 손쉬운 분석법의 개발로 여러 물질을 동시에 분석할 수 있는 방법이 더욱 절실하게 요구된다. 지금까지는 benomyl, topsin-M, thiram 등, 이 세 가지 물질이 동시에 분석된 방법이 발표되지는 않았다. 우리는 C₁₈ 카트리지를 사용한 고체상 추출(Solid-Phase

benomyl(calibration curve)



topsin-M(calibration curve)



Thiram(calibration curve)

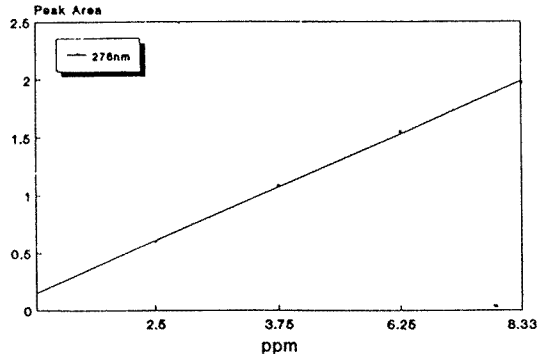


Fig. 5. Calibration Curves of benomyl, topsin-M and thiram

Extraction) 방법을 이용하여 손쉬운 전처리 방법과 함께 세 성분을 동시 검출할 수 있는 분석방법을 개발하였기에 보고하는 바이다.

참고문헌

1. 하영득, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**(5), 538(1990).
2. 조재영, *한국환경농학회지*, **3**(1), 79(1984).
3. 이지백, *환경보전협회보*, **6**(11), 1(1984).
4. 高昌英伍, *食品衛生研究*, **31**(6), p. 447(1981).
5. 小島康平, *食品衛生研究*, **32**(12), 1129-1136(1982).
6. 農藥研究所, *農藥殘留性試驗法*, p. 71(1992).
7. 농약공업협회, *농약과 식물보호*, **12**(3), (1991).
8. Hassal, K. A., "The Biochemistry and Uses of pesticides. Macmillian", 2nd ed, (1990).
9. Hashimoto et al, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 606 (1972).
10. Ganes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **14**, 515(1969).
11. 保健社會部, *食品公典*, p. 499(1991).
12. Herich, K., *AOAC*, 15th ed., 214-215(1990).
13. Calmon, J. -P. and Sayag, D. R., *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 426-428(1976).
14. Chiba, M. and Veres, D. F., *AOAC*, **63**, 1291-1295 (1980).
15. Chiba, M. and Singh, R. P., *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 108-112(1986).
16. Kirkland, J. J., Holt, R. F. and Pease, H. L., *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 368-371(1973).
17. Bardalaye, P. C. and Wheeler, W. B., *J. Chromatogr.*, **330**, 403-407(1985).
18. Spittler, T. D., Marafioti, R. A. and Lahr, L. M., *J. Chromatogr.*, **317**, 527-531(1984).
19. Stringham, R. W. and Teubert, W. E., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 302-303(1984).
20. Zweig, G. and Gao, R., *Anal. Chem.*, **55**, 1448-1451 (1983).
21. 고종명, 김용희, 신부현, 인천시 보건환경 연구원보, **2**, 26-35(1986).
22. 國立農藥資料檢査所, *農藥의 檢査方法*, 216-217 - (1986).
23. Gustafsson, K. H. and Fahlgren, C. H., *J. Agric. Food Chem.*, **31**(2), 461-463(1983).
24. A.O.A.C., "Official methods of Analysis", 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., p. 562(1984).
25. Lawrence, J. F., "HPLC of pesticides", Academic Press, p. 88(1982).
26. Chao-Hong, L., Gregory, C. M., Xiaobing, Y. and Joseph, D. R., *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 167-171 (1990).