

HPLC를 사용한 쌀 중 잔류농약 동시분석법

최재천·이영자·김소희·최수영·최희주·정성욱*·박홍재**·김우성***
서울지방식품의약품안전청·한국기능식품연구원·
*인제대학교 환경공학부·**부산지방식품의약품안전청
(2005년 2월 21일 접수; 2005년 4월 13일 채택)

Multiresidue analytical method of pesticides in rice by HPLC

Jae-Chun Choi, Young-Ja Lee, So-Hee Kim, Soo-Young Choi, Hee-Ju Choi,
Seong-Wook Jeong, Heung-Jai Park** and Woo-Sung Kim***

Seoul Regional Food & Drug Administration, Seoul 135-793, Korea

*Korea Health Supplement Institute, Seoul 137-840, Korea

**School of Environmental Science and Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

***Busan Regional Food & Drug Administration, Busan 608-829, Korea

(Manuscript received 21 February, 2005; accepted 13 April, 2005)

A simple and sensitive analytical method based on RP-HPLC with UV detector(225 nm) and mobile phases using 0.1% phosphoric acid and acetonitrile was developed for simultaneous determination of quinclorac, bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl, dymuron, capropamide, pencycuron, ethofenprox. This method was resulted in recovery of 78 ~ 96% with RSD 3.3 ~ 7.5%, LODs 0.12 ~ 0.84 and LOQs 0.34 ~ 1.20 mg/L. Calibration curves were linear with r of 0.9995 ~ 0.9999.

Key Words : Quinclorac, Bentazone, 2,4-D, Bensulfuron-methyl, Dymuron, Capropamide, Pencycuron, Ethofenprox

1. 서론

농약은 농작물 재배시 해충을 구제하여 생산성 향상을 가져옴은 물론 수확후 농작물 저장 단계에서도 중요한 역할을 한다. 하지만 농약은 잔류특성을 지니며 만성독성을 야기하는 것으로 알려져있고 이로 인해 잔류농약(residual pesticide) 문제가 지적되고 있다^{1,2)}. 잔류농약은 토양, 식품 및 음료 등에서 검출되고 있다. 따라서 환경문제를 유발하지 않는 새로운 농약의 개발 뿐만 아니라 잔류농약 검출을 위한 정밀한 분석방법 또한 요구되고 있다^{3,4)}. 동시분석법은 비교적 짧은 시간에 시료 중의 다종의 잔류농약을 동시에 검색할 수 있는 효과적인 방법이다⁵⁾. 대부분의 농약은 휘발성 및 열안정성을 지니고 있어 이들의 분석에는 전자포획검출기(ECD), 질소인

검출기(NPD) 및 질량분석기(MS)와 같은 선택성이 있고 감도가 뛰어난 검출기가 장착된 GC가 주로 사용되어왔다^{6,7)}. 하지만 근래에 비휘발성, 고극성도 및 열불안정성으로 인하여 위험성을 수반하는 유도체화 등의 과정이 없는 GC 분석이 불가능한 농약이 늘어나고 있고 이들의 분석에 있어 GC에서와 같이 위하여 자외선검출기(UV), 형광검출기(FLD) 및 질량분석기(MS)등, 선택성과 감도가 같은 검출기가 장착된 HPLC의 사용이 늘고있는 추세에 있다. Quinclorac, bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl, dymuron, capropamide, pencycuron 및 ethofenprox는 현행 한국 식품공전⁸⁾에 잔류허용기준이 설정되어 있는 농약성분들이다. 이들 농약성분들을 Fig. 1.에 나타내었다. 상기 공전에 의한 이들 농약성분들의 분석방법은 개별적인 전처리를 해야 하고 일부는 GC 분석을 위해 디아조메탄과 같은 유독성 유도체화 시약을 사용한 메틸 에스터(methyl esters)로의 전환이 필수적이어서 각각의 개별분석

Corresponding Author : Jae-Chun Choi, Seoul Regional Food & Drug Administration, Seoul 135-793, Korea
Phone: +82-2-552-6571
E-mail: chjchj63@empal.com

을 요구하였다. 따라서 본 연구에서는 까다롭고 시간 소모적이며 위험한 작업을 수반하는 기존 분석방법을 대체할 수 있고, 위의 물질들을 단시간 내에 전처리 및 분석할 수 있는 RP-HPLC (reverse phase-high performance liquid chromatography)를 사용한 동시분석방법을 확립하여 제시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 분석조건

본 연구에 사용한 각 농약성분들의 분리를 위한 HPLC는 Agilent사 1100 series의 G1311A quaternary pump와 G1314A VWD 및 Shiseido사 nanospace SI2의 UV275/PDA를, 컬럼은 Capcell

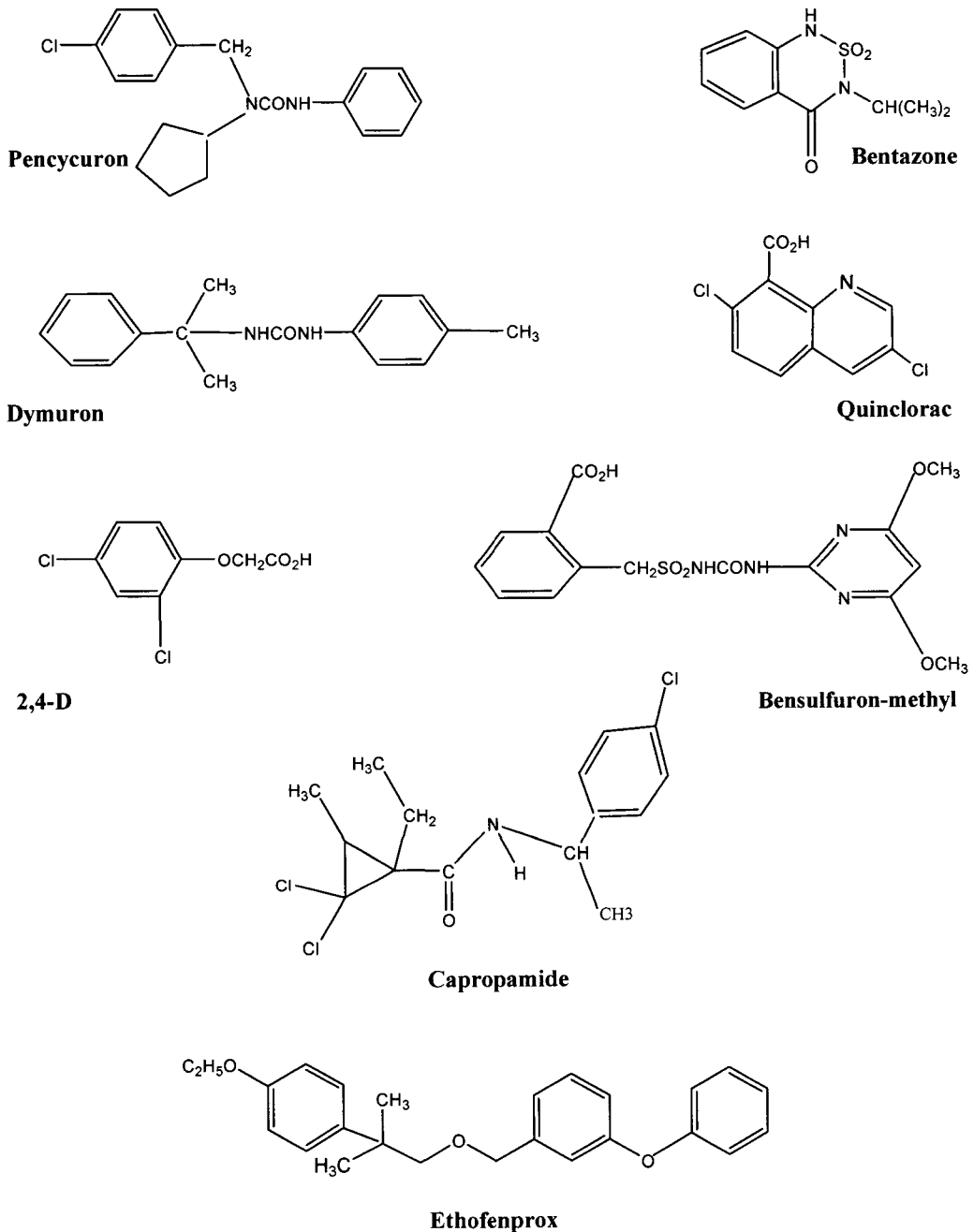


Fig. 1. Chemical structures of the pesticides tested in this study.

pak C₁₈ UG120(4.6 mm ϕ ×150 mm)를, 파장은 VWD 225 nm, PDA 150~300 nm를 각각 사용하였다. 이동상은 컬럼온도 35°C에서 0.1% 인산(A)과 아세트니트릴(B)을 80%(A : 0.0 min)→10%(A : 30~40 min)→100%(B : 42~47 min)→80%(A : 50~55 min)의 농도기울기를 주며 1.0 ml/min의 유속으로 흘렸다. 시료 주입량은 30 μ L 이었다.

2.2. 시약

표준품인 quinclorac, dymuron, capropamide 및 ethofenprox는 Wako pure chemical사(Osaka, Japan), bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl 및 pencycuron은 Dr. Ehrenstorfer Gm -bH사(86199 Augsburg, Germane)사의 제품을 각각 사용하였고, 표준용액과 HPLC 이동상 제조시 및 추출용매로 사용한 HCl, NaOH, 초산에틸, 무수황산나트륨, 메탄올, 아세트니트릴 및 인산은 Fluka사(CH-9471, Buchs, Switzerland), Sigma사(Milwaukee, WI, USA) 및 Merck사(Darmstadt, Germany)의 분석등급을 사용하였다.

2.3. 표준용액의 제조 및 검정곡선의 작성

Quinclorac, bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl, dymuron, capropamide, pencycuron 및 ethofenprox의 표준용액은 100 mg/L의 농도로 메탄올을 사용하여 희석하여 제조하였다. 각 농약성분들의 표준용액을 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/L의 농도로 희석하여 검정곡선 작성에 사용하였다. 검정곡선은 농약성분들의 피크면적에 대한 농도의 관계를 단순 선형 회귀곡선으로 작성하여 사용하였다.

2.4. 쌀 중 회수율 시험

분쇄한 쌀 시료 30 g을 500 mL 분액여두에 취한 후 이에 10 mg/L 농도의 각 화합물 표준용액 2 mL, 1N 염산 100 mL 및 아세톤 150 mL을 첨가하였다. 이를 30분간 진탕하고 흡인여과후 전체액을 60 mL로 농축하였다. 가수분해를 위해 농축액에 메탄올 25 mL과 1N 수산화나트륨 25 mL을 가하여 이를 70°C 드라이 오븐에서 20분간 방치한 후 방냉시킨 뒤 여기에 다시 1N HCl 25 mL을 가하여 5분간 진탕한 후 5% NaCl 용액 100 mL을 가하였다. 이 용액을 에틸에테르 100 mL로 3회 추출하고 추출액을 무수황산나트륨이 함유된 whatman NO.1 PS 여지를 통과시켜 탈수시킨 후 45°C의 증발건조기로 농축하고 이를 메탄올 2 mL로 정용한 뒤 0.2 μ m 한외여과막을 통과시켜 시험용액으로 하였다.

2.5. 정확도 및 정밀도 측정

실험의 정확도와(accuracy)와 정밀도(precision)를 조사하고자 전술한 회수율 시험에 따라 분석한 각 농약성분들의 크로마토그램에서 피크의 면적을 측정 한 후 앞서 작성한 검량선으로부터 얻은 농도

를 기초로 회수율을 계산하였다. 이 과정을 두 사람이 3회 반복하여 얻은 평균 회수율과 상대 표준편차를 토대로 정확도와 정밀도를 측정하였다. 검출한계(limits of detection, LOD)와 정량한계(limits of quantification, LOQ)는 회수율 시험에 사용한 10 mg/L 농도의 각 농약성분 표준용액을 분석하여 얻은 크로마토그램을 기초로 Morrison의 방법(Morrison, 1980)에 따라 각각 다음의 식을 만족하는 As의 면적을 각 농약성분들의 농도로 환산하여 구하였다.

$$\begin{aligned} \text{검출한계} &: A_s - A_b \geq 3 \times S_b \\ \text{정량한계} &: A_s - A_b \geq 10 \times S_b \end{aligned}$$

여기서 A_s는 sample signal의 평균(면적), A_b는 blank signal의 평균(면적), 그리고 S_b는 blank signal(면적)의 표준편차를 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 혼합표준물질의 최대 흡수파장과 분리

RP-HPLC 분석시의 각 농약성분들의 최대 흡수파장은 quinclorac 223 nm, bentazone 211 nm, 2,4-D 228 nm, bensulfuron-methyl 233 nm, dymuron 227 nm, capropamide 219 nm, pencycuron 202 nm 및 ethofenprox 210 nm로 200 nm~250 nm사이에 고르게 분포함을 볼 수 있었다. 225 nm의 파장에서 각 농약성분들은 quinclorac 12.74 min, bentazone 15.23 min, 2,4-D 16.03 min, bensulfuron-methyl 17.13 min, dymuron 19.17 min, capropamide 24.05 min과 24.17 min, pencycuron 25.63 min 및 ethofenprox 33.83 min에서 중첩없이 잘 분리됨을 볼 수 있었고, 쌀 시료에 첨가한 각 농약성분들의 경우에도 쌀 성분에 기인하는 간섭물질의 방해가 거의 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2, Fig. 3).

3.2. 검정곡선, 정확도 및 정밀도

RP-HPLC 분석에 의해 얻은 quinclorac, bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl, dymuron, capropamide, pencycuron 및 ethofenprox의 검정곡선, 정확도 및 정밀도에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 볼 수 있는바와 같이 상관계수(correlation coefficient, r)가 모든 농약성분들에 대하여 0.9995이상으로 각 농약성분들의 크로마토그램에서 얻은 면적과 농도가 검정농도 범위 내에서 일직선의 상관관계가 있음을 알 수 있었고, 회수율은 78~96%, 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 3.3~7.5%, 검출한계는 0.12~0.84 μ g/mL, 정량한계는 0.34~1.2 μ g/mL의 결과를 얻었다. 이는 본 연구의 방법이 쌀중 quinclorac, bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl, dymuron, capropamide, pencycuron

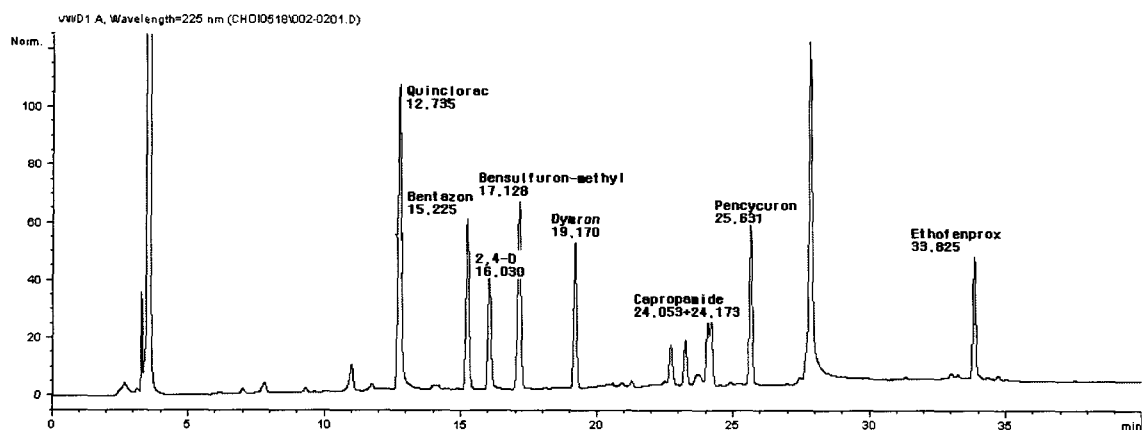


Fig. 2. Chromatograms of the pesticides tested in this study.

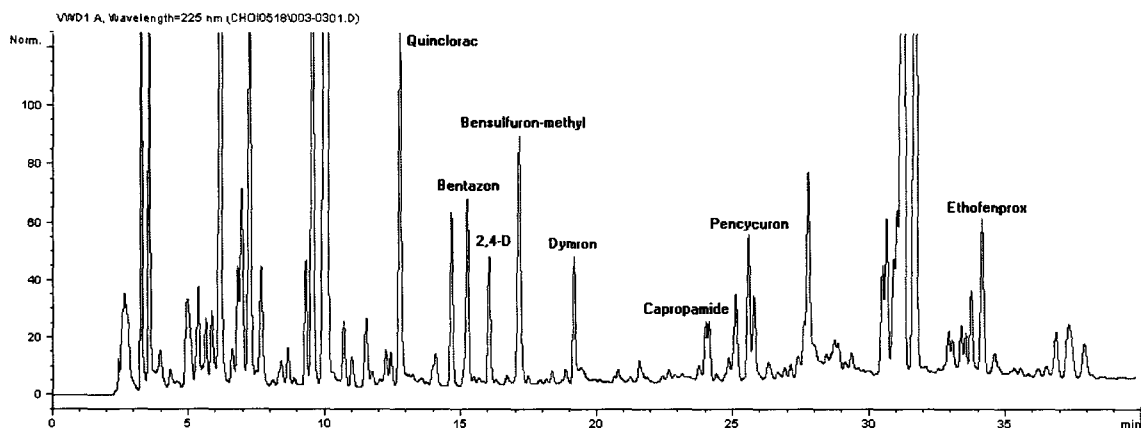


Fig. 3. Chromatograms of the pesticides spiked in rice matrices.

Table 1. Linearity, LODs, LOQs, recovery and repeatability for the pesticides tested in this study

Pesticides	r^a	LODs(mg/L)	LOQs(mg/L)	R(%) ^b	RSD(%)
Quinclorac	0.9998	0.12	0.34	96	3.3
Bentazone	0.9998	0.35	0.78	86	5.8
2,4-D	0.9998	0.43	0.83	88	4.3
Bensulfuron-methyl	0.9999	0.20	0.48	92	4.1
Dymron	0.9997	0.52	0.78	82	7.5
Capropamide	0.9995	0.84	1.20	78	5.1
Pencycuron	0.9997	0.60	0.75	87	6.1
Ethofenprox	0.9999	0.57	0.79	84	5.1

^aConcentration levels between 0.2 and 3.2 mg/L

^bSpiked with 10 mg/L of each pesticides(n=3)

및 ethofenprox의 분석에 적합한 방법임을 보여주는 것이라 하겠다.

4. 요약

Quinclorac, bentazone, 2,4-D, bensulfuron-methyl, dymuron, capropamide, pencycuron 및 ethofenprox를 동시에 분석할 수 있는 전처리 방법과 0.1% 인산 및 아세토니트릴을 이동상으로하고 225 nm를 측정파장으로 사용한 RP-HPLC(reverse phase-high performance liquid chromatography)법을 개발하였다. 동 농약성분들의 검출 및 정량한계는 각각 0.12~0.84 ppm 및 0.34~1.20 ppm이었고, 회수율은 78~96%이었다. 본 방법을 통하여 시료 전처리에서 분석까지 기존 13시간이 소요된 총 분석시간을 3시간 이내로 줄일 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Pyysalo, H., 1983, Pesticide Chemistry, Pergamon New York, 4, 123-128,
- 2) Woodwell, G. M., 1967, Toxic Substances and Ecological Cycles, Scientific American, 216, 31,
- 3) Kanazawa, J., 1981, Method in Pesticide Science, J. Fukami, ed., Soft Science, Tokyo, 202-217pp.
- 4) Edwards, C. A., 1971, Persistent Pesticides in the Environmet. Cleveland, CRC Press, 380-395pp.
- 5) Mills, P. A., J. M. Onley and R. A. Gaither, 1963, Simultaneous Analysis of Residues Pesticides, J. Assoc. of Anal. Chem., 46, 186-191.
- 6) Sannio, A., M. Bandini and L. Bolzoni, 1999, J. AOAC Int., 82, 1229,
- 7) A. Sannio, M. Bandini and L. Bolzoni, 2003, Analytical Method of Gas Chromatography, J. AOAC Int., 86, 101,
- 8) 식품의약품안전청, 2002, 식품 중 농약잔류시험법, 식품의약품안전청, 114-286pp.