

GC/MSD를 사용한 원유 내 잔류농약의 분석법 연구

오남수* · 신용국 · 백승천
서울우유 중앙연구소

Research for the Analytical Method of Various Pesticides in Raw Milk by Gas Chromatography–Mass Spectrometry

N. S. Oh*, Y. K. Shin, and S. C. Baick

Institute of Dairy Food Research, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 425-838, Korea

Abstract

The aim of this study was to optimize a simple, fast, and economical analysis procedure for the determination of 16 different pesticides in raw milk via GC/MSD. Analyses were performed via gas chromatography with electron impact mass spectrometric detection in the selected ion monitoring mode (GC/MSD-SIM) using Pentachloronitrobenzene as the internal standard. The modified sample preparation methodology was based on the Pesticide Analytical Manual (PAM) of the FDA concerning fat extraction, ACN-ether partitioning, and clean-up of the Sep-Pak florisisil cartridge. The modified methodology for the determination of the 16 pesticides was validated. The range of LOQs of the 16 pesticides was likely three times lower than their Maximum Residence Levels (MRLs). The recoveries of most of the pesticides were acceptable at the fortification levels of 0.5 and 1.0 µg/mL and their RSD (%) level was less than 20%. None of the 16 pesticides were detected in the selected raw milk samples.

Key words: pesticides, raw milk, gas chromatography/mass spectrometric detection-selected ion monitoring, limit of quantification, recovery

서 론

농약은 농작물의 병해충 및 말라리아 등과 같은 전염병의 관리를 위해 살충제 등으로 사용되어 왔으며, 대표적으로 aldrin, dieldrin, DDT(dichloro-diphenyl-trichloroethane)와 같은 유기염소계 농약(organochlorine pesticides)이 주로 사용되어 왔다. 특히 축산농가에서는 가축들의 체외기생충 관리를 위해 DDT, endosulfan, lindane 등과 같은 유기염소계 농약들이 많이 사용되고 있다(Fytianos *et al.*, 1985; Curtis, 1994). 대부분의 유기 염소계 살충제는 증기압이 낮아 매우 안정적이고, 물에 매우 낮은 용해도를 가지므로 강한 지용성과 미생물에 의한 분해에 저항성을 나타낸다(UNEP, 2001; Kaushik and Kaushik, 2007). 이들은 환경이나 지방성 동물조직에 축적되어 살아있는 생물에게 1차적으로 독성을 가하게 되며 이와 관련한 식품에서 농약이 잔류하게 된다. 유제품에서의 농약 잔류경로는 축산농

가에서 오염된 사료 및 건초를 섭취한 젖소에서 기인하는데, 젖소의 지방성 조직에 축적된 농약은 체내에서 이동하여 원유 중 지방성분을 통하여 배출되며 우유나 버터와 같은 유제품으로 순차적으로 오염된다(Bentabol and Jodral, 1995; Willes, 1993). 농약의 독성은 단기간의 급성독성으로는 그 수준을 거의 인식하기 어려우며, 장기간의 섭취로 인한 만성독성으로 나타나기 때문에 정부차원에서의 사전 관리감독이 매우 중요하다. 따라서 WHO/FAO에서는 최대잔류량(maximum residue level, MRL)을 설정하여 관리하고 있으며, 국내에서도 식품위생법 제 7조에 348종의 농약에 대해 식품 중 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있다(WHO/FAO, 2006). 축산물 중 농약의 다성분 분석법은 미국의 FDA가 편찬한 PAM(Pesticides Analytical Manual)과 AOAC international의 970.52 method가 대표적이며(MacMahon *et al.*, 1994), 국내의 정부기관 및 민간기관에서도 이와 동등한 방법을 사용하거나 유사한 분석법을 사용하고 있다. 그러나 PAM의 경우 식품시료내의 방해물질을 효과적으로 제거할 수 있는 반면 시간, 용매 등이 지나치게 사용되어야 하는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 GC/MSD를 사용하여 매트릭스에 의한 간섭을 최소화

*Corresponding author : Nam-Su OH, Institute of Dairy Food Research, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 425-838, Korea. Tel: 82-31-491-3867, Fax: 82-31-491-9179, E-mail: ohns@seoulmilk.co.kr

하면서 효과적으로 스크리닝 할 수 있는 16종 잔류 농약의 동시분석 조건을 설정하고 1회용 sep-pak cartridge를 사용함으로써 정제 과정의 시간 및 용매량을 최대한 단축시켜 간편하고 효율적으로 사용할 수 있는 전처리 방법을 최적화하여 원유에 대한 잔류 실태를 조사하여 그 결과를 보고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

실험에 사용한 원유는 경인지역 4곳의 목장에서 공급받아 사용하였다. 16종의 개별 잔류농약은 순도 90% 이상의 분석용 표준품을 Dr. Eherenstofer GmbH(Augsburg, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 내부표준용액인 pentachloronitrobenzene(PCNB)는 Chem sErvice Inc.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외에 전처리 과정 및 분석에 사용된 시약은 모두 잔류분석용이나 특급시약을 사용하였다.

분석 대상물질 및 내부표준물질

분석 대상 물질은 aldrin, p,p'-DDT(dichloro-diphenyl-trichloroethane), o,p'-DDT, p,p'-DDE(dichloro-diphenyl-dichloroethylene), α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate, dieldrin, heptachlor-epoxide, chlordane, diazinon, bifenthrin, methoprene, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate의 16종 농약으로 선정하였다(Table 1).

사용기기

Table 1. Retention times (t_R), relative retention times (t_{RR}) and selected ions of the studied pesticides

Pesticides	t_R (min)	t_{RR} (min)	m/z ¹⁾
1 PCNB ²⁾	13.4	1.0	<u>237</u> , 249
2 Diazinon	14.1	1.1	<u>179</u> , 274, 100
3 Aldrin	17.5	1.3	<u>263</u> , 66, 265
4 Heptachlor epoxide	18.9	1.4	<u>353</u> , 355, 351
5 Chlordane	19.7	1.5	<u>373</u> , 375, 377
6 Methoprene	19.7	1.5	<u>73</u> , 111, 109
7 α -endosulfan	20.3	1.5	<u>241</u> , 195, 239
8 p,p'-DDE	21.1	1.6	<u>264</u> , 318, 316
9 Dieldrin	21.2	1.6	<u>79</u> , 263, 81
10 β -endosulfan	22.4	1.7	<u>195</u> , 237, 241
11 o,p'-DDT	22.8	1.7	<u>235</u> , 237, 165
12 Endosulfan sulfate	23.8	1.8	<u>272</u> , 274, 387
13 p,p'-DDT	24.0	1.8	<u>235</u> , 237, 265
14 Bifenthrin	25.9	1.9	<u>181</u> , 166, 165
15 Cyfluthrin	31.0	2.2	<u>163</u> , 206, 165
16 Cypermethrin	32.3	2.4	<u>163</u> , 181, 165
17 Fenvalerate	35.1	2.6	<u>125</u> , 167, 181

¹⁾Target ions are underlined

²⁾Internal standard

기구

회전감압농축기는 EYELA(Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 사용하고 질소농축기는 TurboVap(Zymark, USA)을 사용하였으며, 1회용 Sep-Pak Florisil Cartridge(10 g, 35cc, Waters, USA)는 Vacuum Manifold Assembly(Agilent, USA)에 장착하여 사용하였다.

분석기기

분석 대상농약을 정성 및 정량분석하기 위하여 7890A Gas Chromatograph에 5975C Mass Spectrometry(Agilent, Santa Clara, USA)를 장착한 GC/MSD를 사용하였다.

실험방법

표준용액의 조제

개별 농약 표준품을 20% acetone/n-hexane에 녹여 1000 μ g/mL 수준의 stock solution을 조제하였다. 5000 μ g/mL의 원액상태인 내부표준물질(PCNB)은 표준품과 동일한 용매를 사용하여 희석하였으며, 혼합 표준용액과 시료에 각각 동일하게 5 μ g/mL이 첨가되도록 조제하였다. 혼합 표준원액은 10 μ g/mL 수준으로 조제하였고, 검량곡선 작성을 위한 혼합 표준 용액은 20% acetone/n-hexane에 희석하여 0.05 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL로 조제하여 분석 전까지 -4°C에서 보관하였다.

추출

검체는 약 50 g을 정밀히 칭량하였고, 지방의 추출은 FDA PAM(MacMahon *et al.*, 1996)의 추출방법에 따라 수행하였다.

정제

추출된 지방을 약 1-2 g 칭량하고 내부표준용액 0.5 mL을 첨가하였다. 이를 petroleum ether 15 mL를 넣은 250 mL 분액여두로 옮기고, petroleum ether로 포화시킨 acetonitrile (ACN)용액 30 mL를 넣어 1분간 진탕 추출하였다. 분리된 ACN 층은 증류수 200 mL 및 NaCl 포화용액 40 mL을 넣은 500 mL 분액여두에 다시 옮겼다. 250 mL 분액여두에 남아있는 petroleum ether 잔류물을 같은 방법으로 3회 추출하여 ACN 층을 500 mL 분액여두에 모두 합친 후 petroleum ether 100 mL을 넣고, 1분간 진탕 추출하였다. 방치하여 분리된 수층은 또 다른 500 mL 분액여두에 옮기고 다시 petroleum ether 100 mL을 넣어 1분간 추출한 후 분리된 petroleum ether 층을 첫 번째 500 mL 분액여두에 합하였다. Petroleum ether 층은 증류수 100 mL로 2회 세척한 후 무수 Na_2SO_4 를 통과시켜 탈수시키고, 이 액을 회전감압농축기(40°C, 수욕조)를 사용하여 약 1 mL까지 농축하였다.

Sep-Pak Florisil Cartridge를 petroleum ether 20 mL로 활성화한 후 사용하였다. 활성화시킨 Sep-Pak Florisil Cartridge에 시험용액을 가한 후 6% diethyl ether/petroleum ether, 15% diethyl ether/petroleum ether, 50% diethyl ether/petroleum ether를 각각 100 mL, 50 mL, 100 mL씩 차례로 용출시켰다. 용출액은 수욕조(40°C)에서 질소가스로 농축한 후 잔사를 20% acetone/n-hexane으로 녹여서 전량을 5 mL로 하고, 이를 0.45 µm membrane filter를 통과시켜 GC/MSD용 시험용액으로 사용하였다.

기기분석

농약 분석을 위한 column은 J&W Scientific(Folsom, USA)에서 구입한 DB5-ms(30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness)를 사용하였다. Carrier gas는 helium을 사용하였고, 주입량은 1 µL(split ratio 10:1), column flow rate는 0.9 mL/min, 주입부 온도는 260°C로 설정하였다. 오븐 온도는 초기온도 80°C에서 2분 30초간 유지하고 140°C까지 분당 50°C의 속도로 승온한 후, 260°C까지 분당 5°C로 승온하여 15분간 등온시키는 조건을 사용하였다. MSD는 ionizing energy 70 eV의 electron impact ionization mode(EI-mode)를 사용하였고, source(Quad) 및 transfer line의 온도는 각각 150°C, 280°C로 하였다. Full Scan-mode(50-350 m/z)를

사용하여 개별 농약의 정보를 조사하였으며, GC/MSD-SIM-mode를 사용하여 정량 분석을 수행하였다.

회수율 시험

시험방법의 회수율을 확인하기 위하여 공시료에 16종의 잔류 농약 표준물질을 첨가하여 실험하였다. 분석법의 회수율은 0.5 µg/mL 및 1 µg/mL의 처리농도에서 각각 3반복으로 측정하고 회수율 및 상대표준편차(RSD, %)를 확인하여 분석방법의 정확도 및 정밀도를 확인하였다.

결과 및 고찰

기기분석 조건

본 연구에서는 16종의 농약을 분석하기 위하여 GC/MSD를 사용하여, 정성 및 정량분석을 동시에 수행하고자 하였다. 분석대상 농약 표준물질 및 내부 표준용액인 PCNB 혼합 표준용액의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 설정된 GC 조건은, 오븐온도프로그램의 최종온도를 280°C 이상으로 승온시킬 경우 peak의 감도는 높아지나 baseline rising 현상이 발생하여 해당 retention time(RT) 범위에서 1 µg/mL 이하의 저농도일 경우 peak의 인식이 간섭을 받으므로 정확한 분석 수행이 어려운 점을 감안하여 최종 온도

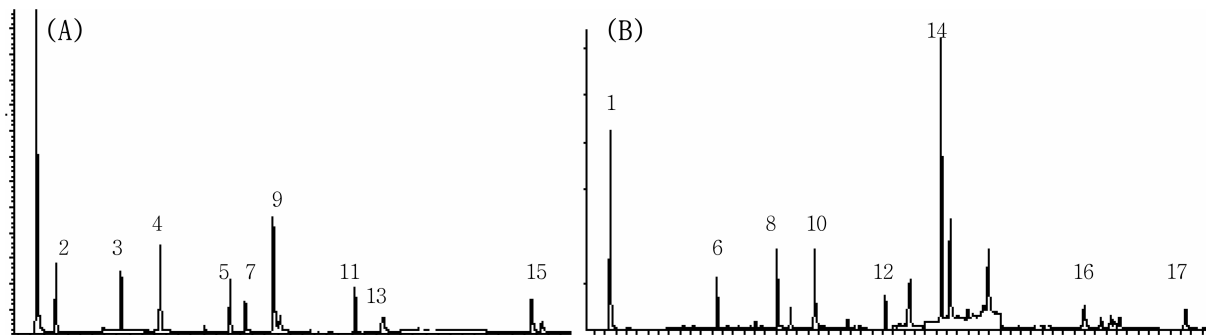


Fig. 1. GC/MS-SIM chromatogram of 16 pesticide standard solution containing 0.5 µg/mL. See Table 1 for peak identification (A) SIM program group 1, (B) SIM program group 2.

Table 2. SIM program used to analyze 16 pesticides

Group	Time (min)	Pesticides	m/z
1	3.00	PCNB ¹⁾	237, 249
	13.80	Diazinon, aldrin	179, 274, 100, 263, 66, 265
	18.20	Heptachlor-epoxide	353, 355, 351
	19.30	Chlordane, α-endosulfan	373, 375, 377, 241, 195, 239
	20.85	Dieldrin, o,p'-DDT, p,p'-DDT	79, 263, 81, 235, 237, 165
	29.00	Cyfluthrin	163, 206, 165
	2	3.00	PCNB ^a
18.00		Methoprene	73, 111, 109
20.35		p,p'-DDE, β-endosulfan	264, 318, 316, 195, 237, 241
23.10		Endosulfan sulfate	272, 274, 387
25.10		Bifenthrin, cypermethrin	181, 166, 165, 163
33.00		Fenvalerate	125, 167, 181

¹⁾ Internal standard

를 260°C로 설정하였다(Campoy *et al.*, 2001). 정성 및 정량분석을 위해 사용된 16종의 농약 성분들을 Full Scan-mode(50-350 m/z)로 분석하여 얻어진 RT 및 relative retention time(RRT)는 Table 1과 같다. 정량분석은 선택이온 검색법(selected ion monitoring, SIM)을 사용하여 분석하였으며, SIM-mode의 사용을 위한 분석조건은 두 group으로 나누어 설정하였다(Table 2). 검량선 작성을 위한 표준물질은 본 연구에서 선정된 대상물질의 잔류기준 범위를 고려하여 0.05-2 µg/mL 농도범위에서 측정, 분석한 결과 상관계수 r^2 은 0.9984-0.9997로서 정량분석 수행에 충분한 수준이었다. 대상물질을 포함하고 있지 않은 공시료에 표준물질을 첨가하여 시료 전처리법으로 정량분석을 시험한 결과 설정된 검출한계 및 정량한계는 Table 3과 같다. 식품위생법상의 해당 농약의 잔류기준과 비교하여 3배 이상 낮게 설정되어 만족하는 수준이었으며, GC/MSD를 사용한 Waliaszewski와 Waliaszewski(1997)의 연구 결과와 비교하여 검출한계는 약 10배정도 높은 수준이었으며, Consuelo 등(2008)의 연구결과보다는 10배 이상 낮은 수준의 정량한계가 설정되었다.

회수율시험

공시료에 표준물질을 첨가하여 3회 반복실험을 수행하여 회수율을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 0.5 µg/mL 처리농도의 16종 대상 농약성분에 대한 평균회수율은 91.3% (62.2-124.4%)으로 나타났으며, RSD는 7.3%(1.5-16.9%)으로 확인되었다. 1.0 µg/mL 처리농도의 평균회수율은 96.0% (70.3-118.0%)였으며, RSD는 5.3%(1.2-9.6%)로 나타났다. 일반적으로 European Union(2007) 등의 guidance에서는 잔

Table 3. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and maximum residue level (MRL) of pesticides

Pesticides	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	MRL (µg/mL)
Diazinon	0.01	0.03	0.5
Aldrin	0.01	0.04	0.15
Heptachlor epoxide	0.01	0.03	0.15
Chlordane	0.01	0.02	0.25
Methoprene	0.01	0.03	1.25
α-endosulfan	0.01	0.04	0.1
p,p'-DDE	0.01	0.02	0.5
Dieldrin	0.01	0.04	0.15
β-endosulfan	0.01	0.04	0.1
o,p'-DDT	0.01	0.03	0.5
Endosulfan sulfate	0.01	0.03	0.1
p,p'-DDT	0.01	0.04	0.5
Bifenthrin	0.04	0.1	0.25
Fenpropathrin	0.01	0.03	2.5
Cyfluthrin	0.04	0.1	0.25
Fenvalerate	0.01	0.03	2.5

Table 4. Average % recoveries and % RSD of pesticides in raw milk

Pesticides	Spiked 0.5 µg/mL		Spiked 1.0 µg/mL	
	Recovery (%) ¹⁾	RSD (%) ²⁾	Recovery (%) ¹⁾	RSD (%) ²⁾
Diazinon	88.9 ± 5.9	6.6	94.3 ± 8.1	8.6
Aldrin	110.0 ± 4.7	4.3	104.5 ± 3.5	3.4
Heptachlor epoxide	97.0 ± 16.4	16.9	94.3 ± 2.1	2.3
Chlordane	101.5 ± 12.6	12.5	99.5 ± 8.4	8.5
Methoprene	100.7 ± 3.4	3.4	111.0 ± 8.0	1.3
α-endosulfan	102.2 ± 9.4	9.2	106.0 ± 1.4	1.3
p,p'-DDE	85.2 ± 5.6	6.6	85.0 ± 3.0	3.5
Dieldrin	62.2 ± 2.2	3.6	70.3 ± 4.9	7.0
β-endosulfan	85.9 ± 1.3	1.5	86.0 ± 1.0	1.2
o,p'-DDT	85.2 ± 5.6	6.6	89.0 ± 6.3	7.0
Endosulfan sulfate	70.1 ± 1.6	2.2	85.7 ± 3.5	4.1
p,p'-DDT	69.6 ± 9.3	13.3	79.3 ± 6.1	7.7
Bifenthrin	96.3 ± 7.8	8.1	107.0 ± 5.6	5.2
Cyfluthrin	82.2 ± 8.0	9.7	88.3 ± 6.7	7.5
Cypermethrin	118.5 ± 5.1	4.3	117.3 ± 7.4	6.3
Fenvalerate	124.4 ± 9.7	7.8	118.0 ± 11.4	9.6

¹⁾ Values are Mean±S.D., n=3

²⁾ Relative standard deviation

류농약 분석 측정값의 허용 회수율 범위는 70-120%이며, RSD는 20% 이내로 권장기준을 제시하고 있다. 본 연구에서 수행된 회수율 시험 결과 대부분의 농약성분이 적정 범위를 충족하고 있으나, 0.5 µg/mL 처리농도의 회수율 시험 중 Dieldrin, p,p'-DDT, fenvalerate 등의 일부 농약성분들은 권장기준에 다소 벗어난 값을 나타내었다. USDA 등의 일부 method validation guideline(2002)에서는 허용 회수율 범위를 50-150%로 확대하여 제시하고 있으며, 확대된 회수율 범위에는 모든 농약성분들이 적합한 회수율을 나타내어 비교적 만족할 만한 결과를 나타낸 것으로 사료되었다. RSD의 경우 각각의 처리농도에서 모든 농약성분이 20% 이내로 적합한 정밀성을 나타내었다.

원유 중 잔류 농약 분석

이와 같이 최적화된 분석방법을 수급되는 원유 중 농약 잔류를 검사하기 위하여 경인지역 목장 중 4곳에서 공급 받은 원유 실제시료 분석에 적용하였다. 분석의 정확성을 높이기 위하여 실제시료에 quality control(QC)시료를 포함한 그룹을 만들어 분석하였다. 분석 결과 대상 시료인 원유 4품목에서 분석대상성분이 검출되지 않았다. 연구결과에서 보는 바와 같이 설정된 방법을 향후 우유 및 기타 유제품의 분석에도 적용하여 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 GC/MSD를 사용한 원유에서의 16종 잔류농약의 동시분석을 위한 최적화된 GC/MSD의 분석 조건을 설정하였으며, MSD는 EI-mode를 사용하여 선택이온 검색법(selected ion monitoring, SIM)으로 정량 하였다. 대상 농약성분 분석을 위한 전처리는 PAM을 변형하여 용매량 및 시간을 단축시켜 신속하고 효율적인 방법을 설정하고자 하였다. 설정된 분석법의 신뢰성을 확보하기 위한 유효성의 검토는 개별 농약성분의 LOD와 LOQ를 설정하여 각 MRL과 비교 확인하였으며, 공시료에 표준물질을 첨가하여 회수율 및 재현성을 확인하였다. 설정된 LOQ는 해당 농약 성분의 MRL과 비교하여 약 3배 이상의 수준으로 낮게 설정되었다. 0.5 µg/mL 및 1 µg/mL의 처리농도에서 16종 대상 농약성분에 대한 평균회수율은 각각 91.3% 및 96.0%였으며, 평균 RSD는 각각 7.3%, 5.3%로 나타났다. 따라서 본 연구에서 설정된 분석법은 반복 분석을 통한 유효성의 검토 결과 시험의 정확도 및 재현성이 만족하는 수준인 것으로 사료되며, 향후 우유 및 기타 유제품의 분석에도 적용하여 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Agricultural Marketing Service (2002) Acceptability Criteria of Process Control and Foltification Recoveries, PDP-QC-04, US. Dept. of Agriculture, Manassas, VA.
2. Bentabol, A. and Jodral, M. (1995) Occurrence of organochlorine agrochemical residues in Spanish cheese. *Pestic. Sci.* **44**, 177-182.
3. Campoy, C., Jimenez, M., Olea, S., Moreno, M., Canabate, F., Olea, N., Bayes, R., and Molina-Font, J. A. (2001) Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Human Devel.* **65**, S183-S190.
4. Consuelo, S. B., Esther, M., and Jose, L. T. (2008) Determination of organochlorine pesticides in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **74**, 1211-1217.
5. Curtis, C. F. (1994) Should DDT continue to be recommended for malaria vector control? *Med. Vet. Entomol.* **101**, 378-384.
6. European Union (2007) Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (Document No. SANCO/10232/2006). Available from : http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf
7. Fytianos, K., Vasilikiotis, G., Weil, L., Kavlendis, E., and Laskaridis, N. (1985) Preliminary study of organochlorine compounds in milk products, human milk and vegetables. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 504-508
8. Kaushik, P. and Kaushik, G. (2007) An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides. *J. Hazard Mater.* **143**, 102-111.
9. McMahon, B., Wagner, M., and Roberta, F. (1996) Pesticide Analytical Manual Volume 1, 3rd ed. US FDA, Washington, DC.
10. UNEP (2001) Act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic pollutants, United Nations Environment Programme, Stockholm, Sweden.
11. Waliszewski, S. M. and Waliszewski, J. M. (1997) Organochlorine pesticides residues in cow' milk and butter in Mexico. *J. Sci. Total Environ.* **208**, 127-132
12. WHO/FAO (2006) Maximum residue limits for pesticides and veterinary drugs. Food and Agricultural Organization of the United Nation (FAO), World Health Organization (WHO), Rome. Available from : <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/DOWNLOAD/bilthoven2005.pdf>.
13. Willes, R. F., Nestman, E. R., and Miller, P. A. (1993) Scientific principles for evaluating the potential for adverse effects from chlorinated organic chemicals in the environment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **18**, 313-356.

(Received 2008.9.23/Revised 1st 2009.3.2, 2nd 2009.6.19/
Accepted 2009.7.16)