

HPLC/DAD를 이용한 림술푸론, 에타메트설푸론메틸, 트리베누론메틸, 클로리무론에틸 4종 성분의 잔류농약 분석법 개발

- 연구노트 -

구윤창¹ · 양성용¹ · 왕 증¹ · 안은미³ · 허 경² · 김형국² · 신한승³ · 이진원⁴ · 이광원^{1*}

¹고려대학교 생명과학대학 식품공학부, ²농협 식품안전 연구원

³동국대학교 바이오시스템대학 식품생명공학과, ⁴한경대학교 식품생물공학과

Development of Method for Analysis of Four Sulfonylurea Pesticides, Rimsulfuron, Ethametsulfuron-methyl, Tribenuron-methyl, Chlorimuron-ethyl Residues by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection

Yun-Chang Koo¹, Sung-Yong Yang¹, Zeng Wang¹, Eun-Mi An,³ Kyoung Heo², Hyengkook Kim², Han-Seung Shin³, Jin-Won Lee⁴, and Kwang-Won Lee^{1*}

¹Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

²Nonghyup Food Safety Research Institute, Seoul 137-130, Korea

³Dept. of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

⁴Dept. of Food Biotechnology, Hankyong National University, Gyeonggi 456-749, Korea

Abstract

The method for residue analysis of four sulfonylurea pesticides, rimsulfuron, ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl and chlorimuron-ethyl was examined and analyzed by HPLC with ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm diameter particle size) which was maintained at 35°C. Mobile phase consisted of solvent A (20 mM KH₂PO₄, pH 2.5) and solvent B (acetonitrile). Isocratic elution of the column with 45% solvent A and 55% solvent B at a flow rate of 1 mL/min resulted in retention times of 5.92, 6.54, 9.28, and 14.35 min for rimsulfuron, ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, and chlorimuron-ethyl, respectively. All injection volumes were 20 μL. The limit of quantitation was 0.02, 0.01, 0.001, and 0.004 mg/kg for rimsulfuron, ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, and chlorimuron-ethyl, respectively. Recovery rate test was performed with three farm products, rice, apple and soybean. Four sulfonylurea pesticides were spiked at concentrations of 0.05, 0.1 and 0.5 mg/kg. The recovery rates were ranged from 86.12% to 116.26% and the standard deviations of all experiments were within 10%.

Key words: pesticide, residue analysis, HPLC, sulfonylurea

서 론

농약은 현대 농업에 있어서 농산물의 증산 및 품질향상을 위한 필수영농자재로서 매우 중요한 역할을 하고 있으며 그 종류와 생산량 및 소비량이 급증하고 있다. 농약은 잔류하지 않고 자연계에서 쉽게 광분해 및 생물학적으로 분해되는 것이 이상적이지만 대부분이 유기합성물질로서 쉽게 분해되지 않고 농산물에 잔류하게 된다. 이러한 경우 아이들의 체력저하 및 인지력 저하(1), 기형아 출산의 증가, 남아의 잠복고환증 유발(2-4) 등 인간의 건강에 좋지 않은 영향을 준다는 보고가 있으며 따라서 각 국가에서는 농산물에 사용하는 농약 성분들에 대하여 최대잔류허용기준을 두어 잔류농약

을 법적으로 제한하는 등 농약이 식품에 잔류하는 것을 막고자 노력하고 있다.

Sulfonylurea계 제초제는 1975년에 Du Pont 사에 의해서 개발된 이래 많은 종류의 화합물들이 연구 개발되어 시판되었다(5,6). Sulfonylurea 계열의 화합물의 작용기작은 식물에 존재하는 branched-chain amino acid 생합성 과정의 acetolactate synthetase(ALS) 효소를 저해함으로써 세포분열과 식물의 생육을 억제하는 것이므로 ALS 효소가 없는 인간과 동물에는 거의 해가 없다는 장점이 있으며(7), 더불어 제초활성이 탁월하기 때문에 기존의 제초제에 비하여 단위면적 당 약제의 사용량이 매우 낮아 환경부하를 줄이는 장점이 있다(8,9).

*Corresponding author. E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Phone: 82-2-3290-3027, Fax: 82-2-925-1970

우리나라는 WTO 회원국 중 대표적인 농산물 수입 국가이다. WTO 체제 출범 이후 우리나라의 농산물 수입이 빠르게 증가하였으며 2007년 기준 농산물 수입량은 2,600만 톤, 수입액은 101억 달러로 늘어났다. 농산물 중에서도 과일과 채소와 같은 청과물에 대한 수입은 특히 빠르게 증가하였는데, 1995년 이후 청과물 수입량은 4배, 수입액은 3배 이상 수준으로 늘어났다. 특히, 중국으로부터 수입하는 농산물의 양은 2001년 이래로 꾸준히 증가하고 있다. 현재 우리나라에는 농산물의 경우 418가지 성분에 대해서 잔류농약 기준이 설정되어 있다(10). 하지만 중국에서 사용하고 있는 농약 중에서 22종이 우리나라에는 사용 등록되지 않은 농약으로 이들 22종의 농약성분에 대한 분석법 및 잔류농약 기준이 설정되어 있지 않은 상태이기 때문에 이들 농약성분들에 대한 안전성 확보가 시급한 실정이다.

본 연구에서는 이들 22종의 성분들 중에서 sulfonylurea 계열 농약성분인 rimsulfuron, ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorimuron-ethyl 4종에 대하여 HPLC를 이용한 분석조건을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

네 종류의 농약 표준품은 Dr. Ehrenstorfer(Augsbug, Germany)에서 구입하였다. 표준품은 acetonitrile에 각각 100 mg/kg으로 용해하여 냉동보관하며 사용하였다. HPLC 분석 및 잔류농약 추출에 사용한 용매인 acetonitrile, hexane, methanol 등은 Honeywell(New Jersey, USA)의 제품을 사용하였고, monopotassium phosphate는 Sigma(Missouri, USA), phosphoric acid는 Showa Chemical(Tokyo, Japan), formic acid는 Junsei chemical(Tokyo, Japan)로부터 구매하여 사용하였다. 물과 유기용매의 극성차를 높여 분리가 용이하게 하기 위한 NaCl은 Kanto chemicals(Tokyo, Japan)로부터 구매하였다. 정제 과정에 필요한 solid phase extraction은 역상이며 친수성-친유성 균형 흡착제인 HLB 카트리지를 Waters(Massachusetts, USA)로부터 구매하였다. 회수율 실험을 위한 백미가루, 사과, 콩가루는 농협 하나로마트에서 구매하였다.

분석 기기와 조건

Diode-array detector와 autosampler가 장착된 Varian HPLC(California, USA) system을 사용하였다. 분석에 사용한 칼럼은 Shiseido 사의 Capcellpak UG120(C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm)이며 칼럼오븐의 온도는 35°C로 유지하였다. 분석에 사용한 용매는 phosphoric acid를 이용하여 pH 2.5로 맞춘 20 mM KH₂PO₄와 acetonitrile을 55:45로 섞어 유속 1 mL/min의 isocratic 조건으로 분석하였다.

LOQ 결정시험

100 mg/kg으로 만든 stock solution을 각각 0.05, 0.1, 0.5

및 1 mg/kg 농도로 희석한 후 HPLC를 이용하여 분석하여 표준곡선을 얻었다. 각 농도별 peak의 S/N비를 구하여 그 비율이 10이 될 때 정량한계(limits of quantitation; LOQ, S/N=10)를 계산하였다.

확인시험(LC-MS)

본 연구를 통해 확립된 분석법의 신뢰성을 확보하기 위해서 LC-MS를 통한 재확인을 수행하였다. Agilent G6410A Triple Quadrupole mass spectrometer(California, USA)가 장착된 Agilent 1200 Series LC system을 사용하였다. 분석에 사용한 칼럼은 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)이며 칼럼오븐의 온도는 30°C로 유지하였다. 분석에 사용한 용매는 0.1% formic acid(용매 A)와 acetonitrile(용매 B)이며 용매 A와 용매 B의 비율은 0분에서 1분까지 70:30, 1분에서 7분까지 5:95, 7분에서 9분까지 5:95, 9분에서 9.1분까지 70:30, 9.1분에서 15분까지 70:30의 비율로 유속 0.3 mL/min으로 흘려주었다. MS의 경우 이온화방법은 EI mode(positive)를 사용하였고 gas temperature는 350°C, gas flow는 8 L/min, nebulizer는 45 psi, capillary는 4000 V, fragmentor voltage는 100~120 V 조건 하에서 수행하였다.

회수율 측정

회수율 측정 실험은 식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서를 참조하였다(11). 지방성 농산물인 콩의 경우 검체(약 1 kg을 표준체 420 μm를 통과하도록 분쇄한 25 g)를 정밀히 달아 균질기 용기에 넣고 시료 g당 각각 0.05, 0.1, 0.5 mg/kg의 농도의 표준품을 spiking 하였다. 시료의 전처리는 다음과 같은 방법으로 하였다. 증류수 25 mL를 가하여 10분간 정치 후 acetonitrile 100 mL를 넣어 3분간 균질화 한다. 이를 여지가 깔려있는 부호너갈때기로 감압여과하고, 여액을 40°C에서 감압 농축하여 acetonitrile을 날려 보낸다. 잔류 지방성분을 제거하기 위해 농축물을 acetonitrile이 포화된 n-hexane에 재용해하고 분배추출을 하여 n-hexane 층과 함께 지방성분을 제거한다. 지방이 제거된 acetonitrile 추출물은 acetonitrile/phosphate buffer 혼합액(10/90, v/v) 2 mL에 녹인다. 비지방성 농산물인 백미와 사과의 경우는 감압농축 후 잔류 지방성분을 제거하기 위한 과정을 생략하고 바로 acetonitrile/phosphate buffer 혼합액(10/90, v/v) 2 mL에 녹인다. 단, 사과의 경우는 수분함량이 높기 때문에 증류수 25 mL를 가하여 정치하는 과정을 생략한다.

Acetonitrile/phosphate buffer 혼합액(10/90, v/v)에 녹인 시료용액 2 mL을 HLB 카트리지로 정제한다. HLB 카트리지에 메탄올 5 mL로 용출시켜 활성화 한다. 여기에 위의 시료추출액 2 mL를 가한 후 2 mL/min의 유속으로 용출시킨다. 카트리지의 상단이 노출되기 직전 메탄올 10 mL로 용출시켜 받는다. 용출액을 40°C 이하에서 질소농축 한다. 잔류물을 acetonitrile 2 mL에 잘 녹이고 0.45 μm syringe filter를 통해 불순물을 제거한 후 시험용액으로 한다.

HPLC 분석을 통해서 얻은 각각의 peak area는 표준품을 이용하여 얻은 표준곡선에 대입하여 농도를 산출하였고 이를 실제 spiking한 농도 대비 몇 %인 지를 계산하였다. 모든 실험은 3번의 반복실험을 수행하였으며 결과는 평균±표준오차로 나타내었다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용된 네 가지 농약 성분의 HPLC 분석조건 하에서 각 성분의 retention time은 rimsulfuron이 5.92분, ethametsulfuron-methyl이 6.54분, tribenuron-methyl이 9.28분, chlorimuron-ethyl이 14.35분이며 여러 농도에서도 비슷한 retention time을 보였다. 정량한계는 농약 표준품을 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/kg의 네 가지 농도로 희석한 후 HPLC 분석을 통하여 얻어낸 피크 면적을 이용하여 검량선을 그린 후 각 농도별 peak의 S/N 비를 구하여 그 비율이 10이 될 때 정량한계를 계산하여 얻어내었다. 이렇게 얻어진 정량한계는 rimsulfuron이 0.02 mg/kg, ethametsulfuron-methyl이 0.01 mg/kg, tribenuron-methyl이 0.001 mg/kg, chlorimuron-ethyl이 0.004 mg/kg이며, 검량선의 R² 값은 모든 물질에서 0.99 이상의 값을 얻어냄으로써 매우 높은 직선성을 나타냈다.

농산물에서의 잔류농약 검사는 신선도의 유지와 빠른 유통을 위해서 신속하게 이루어져야 한다. 또한 사용되는 농약의 종류는 매우 다양하기 때문에 모든 농약성분에 대하여 개

별검사를 진행하는 것은 시간과 노동력이 너무 많이 소요되므로 사실상 불가능하다. 더욱이 분석결과가 나올 때면 이미 유통과 소비가 이루어지고 난 후이기 때문에 잔류농약이 검출되더라도 대처할 수가 없게 된다. 따라서 여러 가지 농약성분을 동시에 분석할 수 있는 다성분 동시분석법이 많이 사용되고 있다. 본 연구에서 사용한 4종의 농약 성분들의 다성분 동시분석법 여부를 알아보기 위해서 4종의 농약성분을 혼합하여 분석해본 결과 ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorimuron-ethyl의 세 가지 물질은 혼합물을 분석하여도 peak가 충분히 분리되기 때문에 동시분석이 가능하였지만, rimsulfuron과 ethametsulfuron-methyl의 경우 retention time이 비슷하여 두 가지 물질의 peak가 충분히 분리되지 않은 관계로 이 두 가지 물질은 동시분석이 불가능하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 회수를 실험에서는 ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorimuron-ethyl 세 가지 물질을 혼합하여 동시분석을 하였고 rimsulfuron은 단일성분으로 분석을 진행하였다.

확인시험을 위한 LC-MS분석조건을 통해서 분리된 각 물질의 retention time은 rimsulfuron이 6.297분, ethametsulfuron-methyl이 6.499분, tribenuron-methyl이 7.451분, chlorimuron-ethyl이 8.181분이었으며 Table 1에 retention time과 분자량을, Fig. 1에 mass chromatogram을 나타내었다.

실제 식품에 적용하였을 때의 회수율을 얻기 위해서 비지방성 식품으로는 사과와 백미를, 지방성 식품으로는 콩을

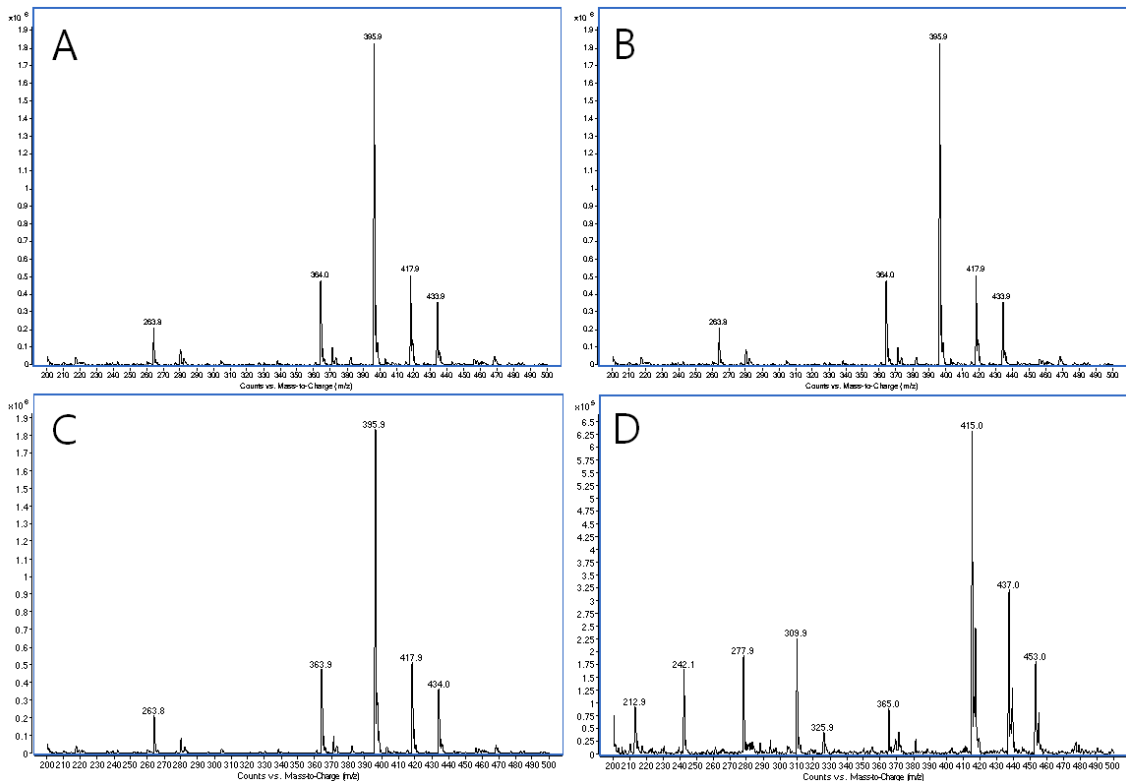


Fig. 1. HPLC-MS chromatograms of four sulfonylurea pesticides.

Table 1. Retention time and molecular weight of four sulfonylurea pesticides in HPLC-MS analysis

Compound	Retention time (min)	Molecular weight
Rimsulfuron	6.297	431.4
Ethametsulfuron-methyl	6.499	410.4
Tribenuron-methyl	7.451	395.4
Chlorimuron-ethyl	8.181	414.8

선택하여 회수율 실험을 진행하였다. 각 농약 표준품의 spiking 농도는 0.05, 0.1, 0.5 mg/kg의 3개 농도로 결정하였으며 3반복을 하여 얻어낸 피크 면적의 평균 및 표준편차를 정량한계와 함께 Table 2에 정리하였다. 모든 샘플에서 회수율은 86% 이상이었고, 표준오차는 10% 미만의 결과를 얻어 내었다. 농약 표준품을 spiking 하지 않은 백미, 사과, 콩의 공시험 크로마토그램에서 각각의 농약성분과 겹치는 피크

는 관찰되지 않았으며 반복실험 중 대표결과를 Fig. 2에 나타내었다.

본 연구결과를 통해 확립한 분석법은 향후 중국으로부터 수입한 농산물의 잔류농약 검사에 이용함으로써 우리나라 국민들이 안전성이 검증된 먹거리를 이용할 수 있도록 하는 기반을 다질 수 있고 우리나라의 수입농산물 잔류농약 관리 수준을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 향후 본 시험법의 감도를 높이고 분석시간을 단축시킬 수 있는 방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

Sulfonylurea계 제초제인 rimsulfuron, ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorimuron-ethyl의 네 가지 물질의 잔류농약 분석을 위해 HPLC를 이용한 분석방법을

Table 2. Recoveries, precision, and LOQ

Compound	Spiked conc. (mg/kg)	Recovery (%) and SD			LOQ (mg/kg)
		Rice	Apple	Soybean	
Rimsulfuron	0.05	92.66 ± 8.10	113.59 ± 4.49	105.20 ± 7.62	0.02
	0.1	90.72 ± 4.90	87.43 ± 2.05	88.09 ± 3.88	
	0.5	87.51 ± 1.22	86.12 ± 1.70	87.65 ± 0.67	
Chlorimuron-ethyl	0.05	88.70 ± 2.62	116.11 ± 4.22	98.49 ± 0.80	0.004
	0.1	97.65 ± 1.73	102.63 ± 5.83	93.74 ± 5.48	
	0.5	101.65 ± 2.52	99.35 ± 4.40	102.40 ± 0.71	
Ethametsulfuron-methyl	0.05	107.17 ± 8.06	107.27 ± 6.40	102.85 ± 9.67	0.01
	0.1	103.25 ± 8.45	100.37 ± 5.25	111.61 ± 4.68	
	0.5	101.66 ± 1.78	99.43 ± 1.87	97.07 ± 1.34	
Tribenuron-methyl	0.05	116.26 ± 4.49	115.63 ± 1.23	116.03 ± 5.19	0.001
	0.1	104.39 ± 4.11	101.02 ± 7.15	109.23 ± 4.60	
	0.5	99.21 ± 2.03	96.80 ± 4.40	97.74 ± 1.10	

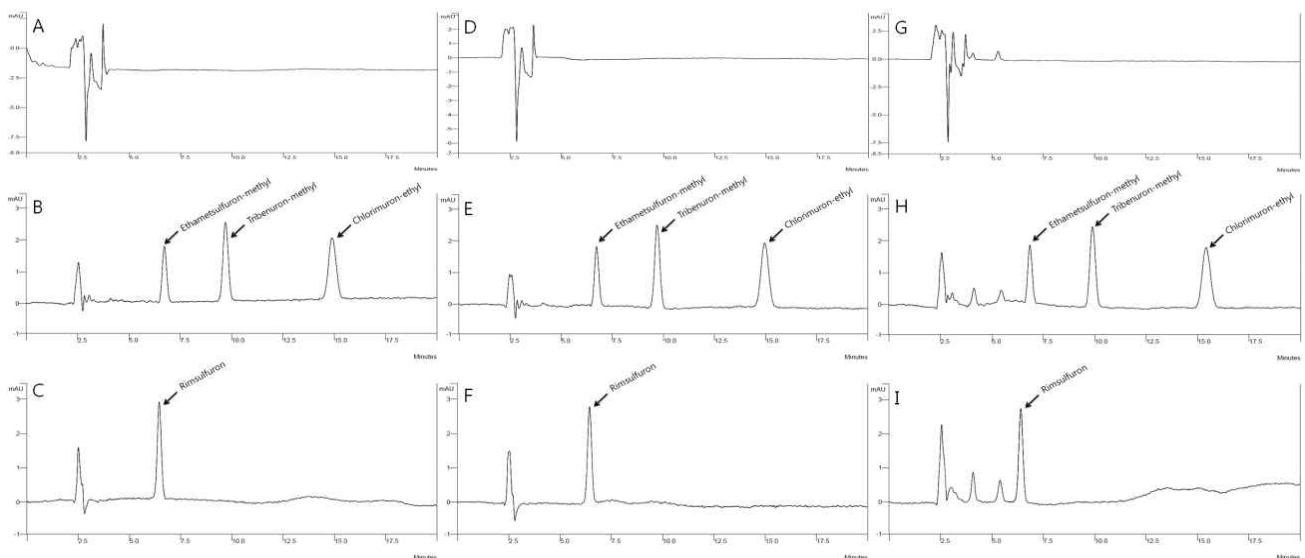


Fig. 2. HPLC-UVD chromatograms of four sulfonylurea pesticides and its recovery test. Recovery tests of four pesticides were performed with apple (A, B, C), rice (D, E, F), soybean (G, H, I). Representative chromatograms of blank (A, D, G), 0.5 mg/kg of ethametsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorimuron-ethyl mixture (B, E, H) and 0.5 mg/kg of rimsulfuron (C, F, I).

개발하였다. ODS 칼럼(250 mm×4.6 mm, 5 µm diameter particle size)를 사용하였으며 칼럼온도는 35°C로 유지하고 용매 A(20 mM KH₂PO₄, pH 2.5)와 용매 B(acetonitrile)를 45:55의 비율로 1 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 시료 주입량은 20 µL였으며 분석조건 하에서 rimsulfuron, ethamet-sulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorimuron-ethyl의 retention time은 각각 5.92, 6.54, 9.28, 14.35분이었고 정량한계는 각각 0.02, 0.01, 0.001, 0.004 mg/kg이었다. 회수율 실험은 백미, 사과, 콩에 4종의 농약 표준품을 각각 0.05, 0.1, 0.5 mg/kg의 세 가지 농도로 spiking하여 수행하였으며 86.12~116.26%의 회수율을 얻었고 표준오차는 모든 실험에서 10% 이하였다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(09072식품안049)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 고려대학교 CJ식품안전관의 장비 및 시설을 사용하였으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Guillette EA, Meza MM, Aquilar MG, Soto AD, Garcia IE. 1998. An anthropological approach to the evaluation of pre-school children exposed to pesticides in Mexico. *Environ Health Perspect* 106: 347-353.
- Hanify JA, Metcalf P, Nobbs CL, Worsley KJ. 1981. Aerial spraying of 2,4,5-T and human birth malformations: an epidemiological investigation. *Science* 212: 349-351.
- Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, Nogueras-Ocana M, de Dios Luna-del-Castillo J, Espigares Garcia M, Olea N, Lardelli-Claret P. 1996. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 104: 1090-1095.
- Garry VF, Schreinemachers D, Harkins ME, Griffith J. 1996. Pesticide applicators, biocides, and birth defects in rural Minnesota. *Environ Health Perspect* 104: 394-399.
- Brown HM, Cotterman JC. 1994. Recent advances in sulfonylurea herbicides. In *Chemistry of Plant Protection*. Stetter J, ed. Springer-Verlag, New York, USA. p 49-77.
- Bryant R, Bite M. 2002. *Ag Chem New compound review*. Agranova, UK.
- Schloss JV. 1994. Recent advances in understanding the mechanism and inhibition of acetolactate synthase. In *Chemistry of Plant Protection. Herbicides Inhibiting Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis*. Stetter J, ed. Springer-Verlag, New York, USA. p 3-14.
- Scranò L, Bufo SA, Perucci P, Meallier P, Mansour M. 1999. Photolysis and hydrolysis of rimsulfuron. *Pesticide Science* 55: 955-961.
- Sarmah AK, Sabadie J. 2002. Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *J Agric Food Chem* 50: 6253-6265.
- Korea Food & Drug Administration. 2008. Food code.
- National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. 2009. *Practical handbook of pesticide residue analysis in food code*.

(2010년 4월 20일 접수; 2010년 5월 20일 채택)