

GC-MS를 이용한 바지락 중 prometryn 잔류분석법 확립

채영식 · 조운제 · 장경주 · 김재영 · 이상목 · 장문익*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

Establishment of an Analytical Method for Prometryn Residues in Clam Using GC-MS

Young-Sik Chae, Yoon-Jae Cho, Kyung-Joo Jang, Jae-Young Kim, Sang-Mok Lee, and Moon-Ik Chang*

*Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Department of Food Safety Evaluation,
National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety*

Abstract We developed a simple, sensitive, and specific analytical method for prometryn using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Prometryn is a selective herbicide used for the control of annual grasses and broadleaf weeds in cotton and celery crops. On the basis of high specificity, sensitivity, and reproducibility, combined with simple analytical operation, we propose that our newly developed method is suitable for use as a Ministry of Food and Drug Safety (MFDS, Korea) official method in the routine analysis of individual pesticide residues. Further, the method is applicable in clams. The separation condition for GC-MS was optimized by using a DB-5MS capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with helium as the carrier gas, at a flow rate of 0.9 mL/min. We achieved high linearity over the concentration range 0.02-0.5 mg/L (correlation coefficient, $r^2 > 0.998$). Our method is specific and sensitive, and has a quantitation limit of 0.04 mg/kg. The average recovery in clams ranged from 84.0% to 98.0%. The reproducibility of measurements expressed as the coefficient of variation (CV%) ranged from 3.0% to 7.1%. Our analytical procedure showed high accuracy and acceptable sensitivity regarding the analytical requirements for prometryn in fishery products. Finally, we successfully applied our method to the determination of residue levels in fishery products, and showed that none of the analyzed samples contained detectable amounts of residues.

Keywords: prometryn, GC-MS, clam, herbicide, analytical method

서 론

농업에서의 병, 해충, 잡초 방제를 위한 농약의 사용은 농산물의 품질향상과 식량생산 증대를 이루어 인류의 생활 여건에 많은 기여를 해왔다. 그러나 이러한 농약의 유익성에 반해 농약은 그 자체가 독성을 가진 화합물이기 때문에 사용할 때, 철저한 주의가 필요하며, 잔류량이 엄격하게 관리되지 않은 식품이나 농산물을 섭취할 경우 부작용이 나타날 가능성이 있다. 뿐만 아니라, 일정한 장소와 공간에서 생산되어 사용되고 처리되는 다른 산업용 화학물질과는 달리 농약은 채소나 과일 등의 작물은 물론 토양, 물, 대기와 같은 야외 환경에 직접 살포되기 때문에 생태계의 오염도 간과할 수 없는 부분이다(1).

농약의 대부분은 인공적으로 만들어진 합성 화학물질들이기 때문에 살아있는 생물체에 1차적으로 독성을 나타내며, 2차적으로 인간이 섭취하는 식품 등에 잔류하게 된다. 이와 같이 환경 중에

살포된 농약은 식물체에 전이되고, 이는 생태계 및 인간에게 노출됨에 따라 인류 환경의 직·간접적인 피해와 환경오염의 주원인이 된다. 특히, 살충제 및 제초제와 같은 생체 이물질 화합물에 의한 수질 오염은 심각한 환경문제로 부각되고 있으며, 수중계에서는 축적, 이동 및 생물학적 농축(biomagnification)으로 인한 인간의 건강, 야생 생물 및 환경을 위협하고 있다(2-4).

프로메트린(prometryn)은 터부틸라진(terbuthylazine), 시마진(simazine), 아트라진(atrazine)과 같은 트리아진계 제초제(2,3)로서, 이미 반세기 전부터 사용되었으며, 그 효능은 일년생 쌍자엽 식물로 분류되는 잡초의 제거에 탁월하다. 하지만, 환경보전 측면으로 보면, 토양에서 장기간 잔류되는 문제를 일으킬 수 있으며, 물에 잘 용해되는 물리화학적 특성을 가지고 있어 수질오염의 문제 또한 발생할 수 있다(5). 이러한 토양 또는 수질 오염을 통해 전이된 식품의 섭취는 인간에게 강한 독성을 나타내며, 먼지 등을 통해 인체에 노출될 경우 피부병과 호흡기 질환 등을 유발할 수 있다(2,3,5). 이에 따라 EU에서는 아트라진과 시마진의 사용을 전면 금지하였고, 사용량도 50,000 kg/year로 규제하는 등(6,7) 농약에 대한 안전 관리 방안을 강화하는 추세이며, 미국 EPA에서도 어류와 수생 식물을 대상으로 독성 및 잔류시험을 실시한 결과를 통해 농약에 대한 위험도를 알리고 있다(8). 또한, 인접 국가가 중국의 경우에도 트리아진계 제초제에 대한 식품의 피해를 제시하여 광합성 억제 등을 통한 먹이사슬 문제도 언급하고 있다(7,9). 우리나라에서는 농산물에 대한 prometryn의 잔류허용기준을 면실 및 옥수수의 경우 0.2 mg/kg, 기타농산물에는 0.05 mg/

*Corresponding author: Moon-Ik Chang, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Department of Food Safety Evaluation, National Institute of Food and Drug Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Chungbuk 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4204
Fax: 82-43-719-4200
E-mail: 1004@korea.kr
Received March 18, 2013; revised July 2, 2013;
accepted July 30, 2013

kg으로 설정하여 관리하고 있으며(10), 잔류 분석법은 축산물에 대한 다성분 분석법(11) 및 농산물에 대한 다성분 분석법(12)이 고시되어 있다. 하지만, 앞서 언급한 바와 같이 prometryn을 포함한 트리아진계 농약에 의한 문제점이 다수 발생될 수 있음에도 불구하고, 수산물에 대한 기준과 이를 위한 잔류 분석법은 현재까지 확립되어 있지 않다.

식품 중 prometryn에 대한 분석 방법은 이미 많은 선행연구에서 HPLC (high performance liquid chromatograph), GC (gas chromatograph) 또는 질량분석기(mass spectrometry)를 적용하여 분석하였지만, 수산식품에 적용한 분석법은 극히 드물며, 국내 실정에 적용된 사례도 전무한 상황이다. 이에 국내의 실정에 맞는 분석법 개발이 요구되는 상황이며, 분석법의 현대화와 국제화에 맞추어 Codex 및 EU 등의 엄격한 기준에 따라 식품 중 잔류 물질에 대한 낮은 농도의 정량한계와 효율성 및 신뢰성을 증대시킨 분석법 개발이 요구되고 있다(13).

본 연구는 바지락에 사용이 허가되지 않은 prometryn이 검출되었다는 국외 위해정보에 따라 GC-MS를 이용한 잔류분석법을 개발하여 수산물의 안전관리를 도모하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

시중에서 유통되는 바지락을 구입하여 대상 시료로 하였으며, 공시료 시험을 거쳐 prometryn이 잔류되지 않음을 확인한 후 시료로 사용하였다. 대상 시료는 폐각을 제거한 가식부 부분을 믹서기로 마쇄하여 균질화 하였다. 또한, 균질화한 시료는 20 g 단위로 소분하여 분석 전까지 냉동실(-20°C)에서 보관하였다.

시약 및 재료

Prometryn (Assay: 99.3%) 표준품은 Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany)로부터 구입하여 사용하였으며, prometryn에 대한 물리화학적 특성은 Table 1에 나타내었다.

전처리 시약으로는 아세트니트릴, 아세트 및 n-헥산을 사용하였고, Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, 수산화나트륨 및 염화나트륨 등은 특급 시약(Wako, Osaka, Japan)을 구입하여 사용하였다. 분석에 사용한 고상 추출 카트리지(SPE)는 Florisil 카트리지(3 mL, 500 mg, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하였으며 활성화 과정을 거친 다음 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였다.

표준용액의 조제

표준물질 적당량을 정밀히 달아 아세톤에 녹여, 이를 100 mg/L 표준원액으로 조제하였다. 표준용액은 실험 전에 표준원액을 20% 아세톤 함유 헥산에 희석하여 사용하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 -20°C 냉동실에 보관하면서 사용하였다.

시료 전처리

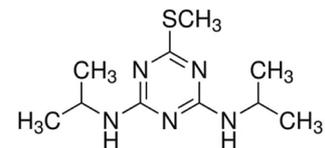
균질화한 시료 5 g을 100 mL 유리병에 취하여 아세트니트릴 50 mL를 가하고 5 M 수산화나트륨 수용액을 이용해 pH 12로 조정 한 후 5분간 진탕하여 추출하였다. 추출된 시료는 여과지가 깔려있는 뷰흐너 깔때기로 감압 여과하였다. 얻어진 여액을 염화나트륨 8 g이 들어있는 분액깔때기에 담고 마개를 막은 후 2-3분간 격렬하게 진탕하였다. 이를 약 1시간 정치하여 얻어진 아세트니트릴 추출액의 절반을 취하여 40°C 이하 수욕 상에서 감압 농축하여 용매를 휘발시켰다. 농축에 의해 얻어진 잔류물은 20% 아세톤 함유 헥산 4 mL로 재용해하여, 헥산 5 mL와 20% 아세톤 함유 헥산 5 mL로 미리 활성화시킨 Florisil 카트리지에 흡착시켰다. 흡착된 카트리지에 초당 1-2방울 속도로 용출시켜 유리 시험관에 받은 후, 용매가 젖어있는 상태에서 20% 아세톤 함유 헥산 5 mL를 용출하여 동일 유리 시험관에 합쳤다. 용출액은 40°C 이하의 수욕 상에서 질소 또는 공기를 낮은 유속으로 통과시키면서 용매를 날려 보낸 후, 20% 아세톤 함유 헥산 2 mL에 재용해하여 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

기기 분석 조건

Prometryn의 분석은 질량검출기가 장착된 gas chromatograph-mass spectrometry (Agilent 6890N GC-5973 mass selective detector (MSD), Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 분석용 칼럼으로는 DB-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, 운반 기체로는 순도가 99.99% 이상인 헬륨 가스를 사용하여 유속을 0.9 mL/min으로 하였다. 또한, 주입부 온도는 260°C로 설정하여 split mode에 의해 1 μL (split ratio, 10:1)를 주입하였다. 오븐 온도는 초기 온도 100°C에서 2분간 유지하고 280°C까지 분당 10°C의 속도로 승온하여 22분간 등은 시키는 조건을 사용하였다. 질량분석기의 이온화 방법은 전자 이온화 방법(electron ionization mode: EI-mode)를 사용하였고, 이온화 에너지는 70 eV로 하였다. 가스크로마토그래피와 질량검출기의 연결 인터페이스 온도는 280°C로 하였으며, 이온원의 온도는 230°C로 설정하였다. 질량 분석은 full scan 모

Table 1. Physicochemical properties and structure of prometryn

IUPAC name	6-(methylsulfanyl)-2-N,4-N- bis(propan-2-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine
CAS No.	7287-19-6, 83653-07-0
Classification	Herbicide
Melting point	132.03°C
Molecular weight	241.36 (C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S)
Boiling point	346.68°C at 760 mmHg
Density	1.13
Log Pow ¹⁾	3.51
Vapor pressure (25°C, mPa)	0.165 mPa (25°C)
pKa ²⁾	4.1
Solubility	In water 33 mg/L (25°C). In acetone 300, ethanol 140, hexane 6.3, toluene 200, n-octanol 110 (all in g/L, 25°C)



¹⁾n-Octanol/water partition coefficient, ²⁾Dissociation constant for conjugate acid of prometryn at 25°C.

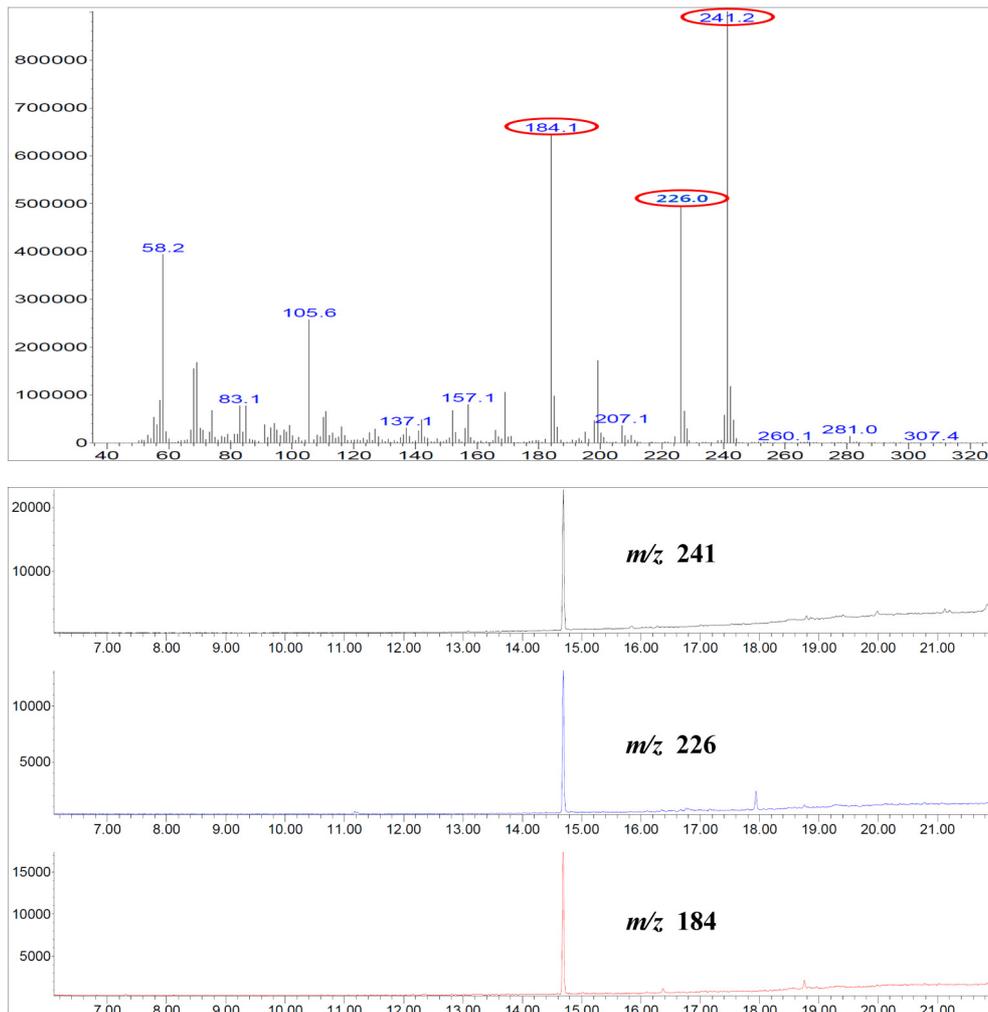


Fig. 2. Selective ion chromatogram and mass spectrum by full scan mode of prometryn standard at 0.01 ng.

류 농약 추출 방법에 보편적으로 사용하는 수용성 유기 용매인 아세토니트릴을 사용하였다(15,16). 또한, 짝산의 pKa가 4.1인 prometryn의 pH를 12정도까지 수산화나트륨 용액으로 조절하여 중성분자 상태를 만들어, 검체로부터 prometryn의 추출효율을 증가시켰으며, 염화나트륨을 첨가함에 따라 이온 세기를 높여 액-액 분배효율을 더욱 증가시켰다(17).

하지만, 액-액 분배법을 거친 추출액은 여전히 상당한 간섭 물질이 존재하였기 때문에 기기 분석에 앞서 추가적인 정제 과정이 필요하였다. 본 연구에서 사용한 florisil 카트리지는 색소 또는 유지의 제거에 가장 뛰어나 보편적으로 사용되는 흡착제이기 때문에(15,16) 바지락의 지방 성분 제거를 위해 선정되었다. 또한, 분석 대상 성분의 극성을 고려하여 아세톤 및 n-헥산의 혼합 용매를 이용하여 용출조건을 조사한 결과, 아세톤/n-헥산 (20/80, v/v) 혼합액으로 1 g 당 10 mL의 표준 용출조건에서 가장 좋은 회수율을 나타냈으며, Fig. 2와 같이 간섭 물질도 최소화 되었다.

분석 칼럼은 대상성분의 극성을 고려하여 DB-5MS를 선택하였으며, 주입 방식은 split 모드를 사용하여 10:1의 비율로 칼럼에 주입되었다. 이상과 같이 확립된 분석 조건으로 분석한 prometryn 표준물질은 Fig. 3의 (B)와 같이 어떠한 간섭물질의 방해도 받지 않았으며, 분리된 prometryn의 TIC로부터 full scan EI mass

spectrum을 얻었다(Fig. 2). 또한, EI mass spectrum의 결과에서 가장 높은 감도를 보인 질량 대 전하비(m/z) 값은 241 이온으로 나타나 정량 이온으로 선택하였고, 분석법 검증에 필요한 최적 조건으로 확립하였다.

본 연구에서 수행한 수산식품 중 prometryn의 잔류분석법은 기존 식품공전의 축산물에 대한 다성분 분석법(11) 및 농산물에 대한 다성분 분석법(12)을 수산식품에 최적화한 후 적용하였다. 식품공전 시험법에 명시되어 있지 않았던 염화나트륨의 양(volume)이나 수산화나트륨 수용액을 사용하여 전처리법을 확립하였으며, 분석기기를 GC-NPD 또는 FPD에서 정량 및 정성 분석이 모두 가능한 GC-MS로 변경하여 감도 및 선택성을 매우 증대시켰다. 본 분석법의 확립으로 바지락을 비롯한 수산식품 중 prometryn의 잔류나 오염에 대한 검사법으로 적절히 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

특이성 및 검량곡선

본 연구의 분석 조건에 대한 특이성(specificity)을 검증하기 위해 공시험을 수행한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 prometryn의 머무름 시간대에 blank 검체의 경우에는 어떠한 방해 물질도 검출되지 않은 결과를 나타내어 본 분석법의 높은 분리능과 선택성을 확인하였다.

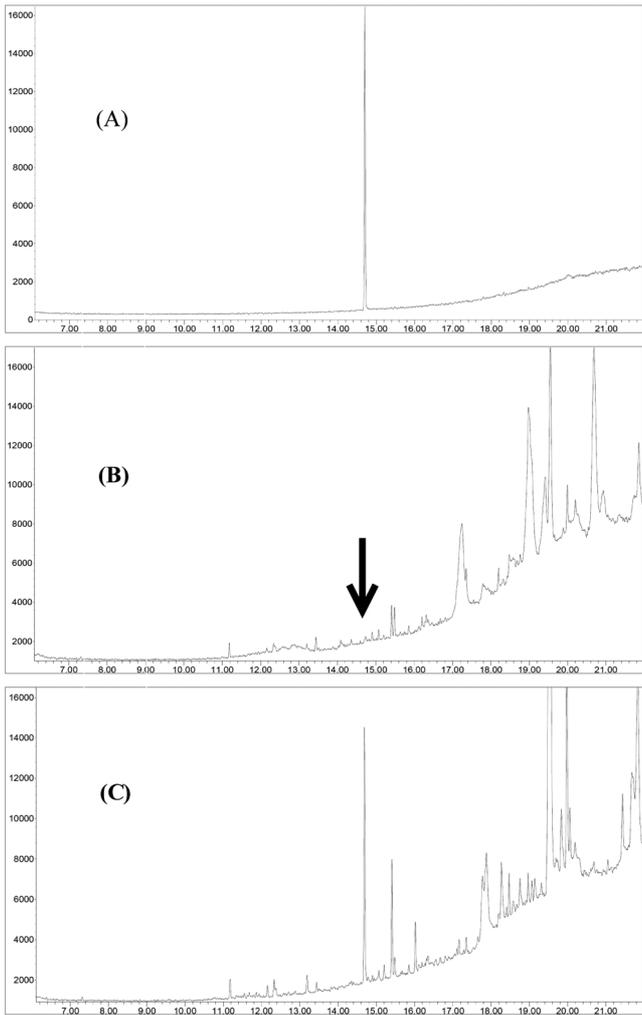


Fig. 3. Selective ion (m/z 241) chromatogram of prometryn standard at 0.1 ng (A), blank clam sample (B) and fortified clam at 0.1 ng (C).

Prometryn의 직선성(linearity)을 구하기 위하여 LOQ 및 $2\times$ LOQ 농도를 포함해 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.5 mg/L 범위가 되도록 표준물질을 희석하여 분석을 수행하였다. 그 결과, prometryn에 대한 상관계수(r^2)가 0.998의 수치를 보였으며(Table 3), 이는 Codex에서 권장하는 $r^2 > 0.95$ 에 적합한(14) 수준의 결과임을 확인하였다.

정량한계 및 회수율

Prometryn의 정량 한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하였다. 분석법의 정확성을 평가하기 위하여 바지락 시료 5g에 prometryn을 각각 LOQ 및 $2\times$ LOQ (0.04 및 0.08 mg/kg) 농도가 되도록 표준물질을 첨가하고 시험용액 조제 과정을 거쳐 분석하였다. 분석 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, 피크에 대한 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선에 시험용액 중 prometryn의 면적을 대입하여 회수율을 구하였으며, 6 반복 실험을 통해 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과, 회수율이 84.0-98.0%이었으며, 변동계수는 3.1-7.1%로 나타나(Table 4), Codex 잔류동물용의약품 분석 가이드라인에서 권장하는 회수율 및 변동계수(14)에 충족하는 결과를 나타내어 수산물 중 잔류 농약 분석법으로서 적합함을 확인하였다.

농약의 경우, 수중으로의 유입을 인위적으로 알 수 없기 때문에(4) 비의도적으로 수산식품에 유입되어 오염시킬 수 있는 농약을 포함한 유해물질 등을 지속적으로 조사해야 할 필요성이 요구된다. 본 연구의 목적으로 수계오염을 야기시킬 수 있는 트리 아진계 제초제인 프로메트린은 수산식품에도 노출되어 안전성이 위협받고 있는 실정에서 현행 식품공전에 농, 축산물에만 등재되어 있는 프로메트린 분석법을 수산식품에 맞게 최적화된 분석법을 개발하였다. 본 연구에서 확립된 prometryn의 잔류분석은 전처리 및 정제법(SPE)이 수산식품에 대해 최적화 되었으며, 그에 따른 높은 수준의 정밀성, 정확성 및 재현성을 확인하였다. 따라서 본 연구는 국내·외 잔류동물용의약품 가이드라인에 맞추어 설정되었기 때문에, 수산식품의 안전 관리 뿐만 아니라 안전 확보에도 기여할 것으로 판단된다.

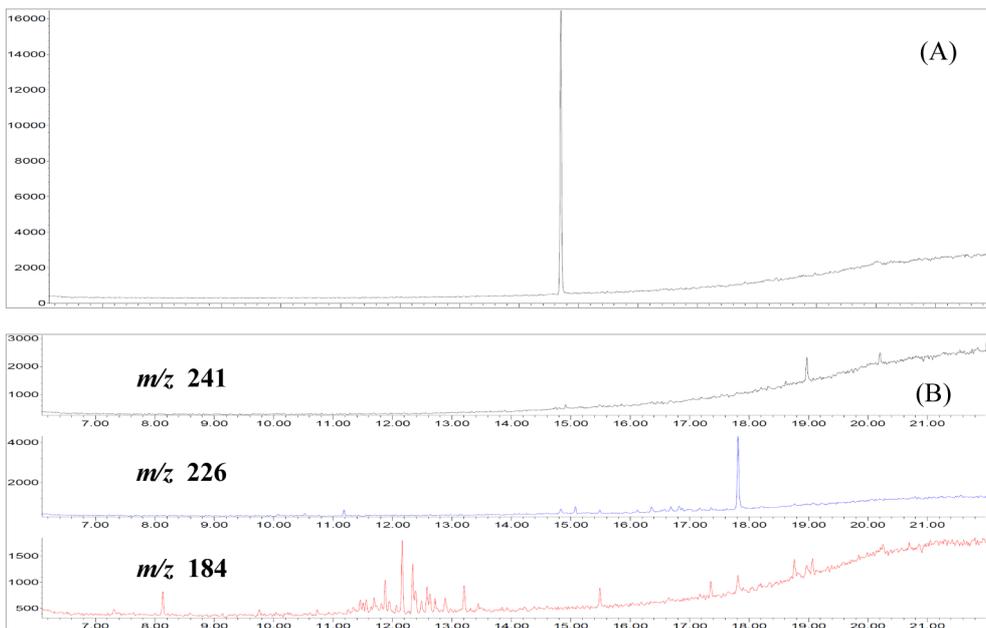


Fig. 4. Chromatogram of prometryn standard at 0.1 ng (A) and blank clam sample (B).

Table 3. Standard curve range, linearity and correlation coefficients (r^2) of prometryn

Compound	Matrices	Standard curve range (mg/L)	Linearity	r^2
Prometryn	Clam	0.02-0.5	$y=36765x-461.9$	0.998

Table 4. Recoveries, CVs and LOQ of prometryn in clam

Sample	Prometryn			
	Fortified conc. (mg/kg)	Recovery ¹⁾ (%)	CV(%)	LOQ (mg/kg)
Clam	0.04	98.0±3.0	3.1	0.04
	0.08	84.0±6.0	7.1	

¹⁾Mean values of six replicate with standard deviations.

요 약

Prometryn은 트리아진계 제초제로 일년생 쌍자엽 식물체와 같은 일년생 잡초 제거에 탁월한 효과가 있으나 일부 토양에 약효가 여러 달 지속될 경우 수중계에 스며들어 축적과 이동, 생물학적 농축(biomagnification)등의 심각한 환경문제를 비롯한 수질오염, 야생동물 및 국민건강에 심각한 문제를 일으킬 수 있는 잔류물질이다. 최근 국내에서 중국산 바지락 및 그 가공품에서 prometryn의 검출이 보고된 바 있어 이에 대한 지속적인 모니터링이 필요하기 때문에 바지락 중의 prometryn 분석법 개발이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 수산물 중 바지락을 시료로 사용하였다. 시료를 아세트니트릴로 추출하고 농축한 다음 20% 아세트산 함유 헥산을 첨가하여 용해하였다. 이 용액을 florisil 카트리지로 정제한 후 농축하여 GC-MS로 분석하였다. 기기분석은 SIM 모드로 m/z 241 이온에 대하여 정량하였고, LOQ는 0.04 mg/kg으로 계산되었으며, LOQ, 2×LOQ 농도에서의 회수율 및 분석오차가 각각 84.0-98.0%, 3.1-7.1%로 분석되어 Codex 가이드라인 규정에 만족하였다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전처의 연구개발비(12161MFDS023)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Kim JH. Pesticide and its importance. Vol. 2, pp 48-52. In: Safe Food Forum. The Korean Society of Food Hygiene and Safety, Seoul, Korea (2007)
- Lang DH, Rettie AE, Bocker RH. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbuthyryne in human liver microsomes. Chem. Res. Toxicol. 10: 1037-1044 (1997)
- Brvar M, Okrajsek R, Kosmina P, Staric F, Keps R, Kozelj G, Bunc M. Metabolic acidosis in prometryn (triazine herbicide) self-poisoning. Clin. Toxicol. 46: 270-273 (2008)
- Navarro S, Vela N, Giménez MJ, Navarro G. Persistence of four s-triazine herbicides in river, sea and groundwater samples exposed to sunlight and darkness under laboratory conditions. Sci. Total Environ. 329: 87-97 (2004)
- Sabik H, Jeannot R, Rondeau B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. J. Chromatogr. A 885: 217-236 (2000)
- Dean JR, Wade G, Barnabas IJ. Determination of triazine herbicides in environmental samples. J. Chromatogr. A 733: 295-335 (1996)
- Sanchez-Ortega A, Unceta N, Gómez-Caballero A, Sampedro MC, Akesolo U, Goicolea MA, Barrio RJ. Sensitive determination of triazines in underground waters using stir bar sorptive extraction directly coupled to automated thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 641: 110-116 (2009)
- EPA. Reregistration eligibility decision (RED) prometryn. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA (1996)
- Chunhong Z, Yun L, Wei Y, Xiaogang C, Zhengxing C. Simultaneous determination of residues of triazine herbicides in wheat by ultra performance LCTM. Mod. Sci. Instrum. 4: 70-73 (2007)
- MFDS. Food code. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Korea. pp. appendix.4.52. (2012)
- MFDS. Food code. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Korea. pp. 10.4.478-483 (2012)
- MFDS. Food code. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Korea. pp. 10.4.2-10 (2012)
- Oh JH, Kwon CH, Jeon JS, Choi DM. Management of veterinary drug residues in food. Korean J. Environ. Agric. 28: 310-325 (2009)
- Codex. Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods, CAC/GL 16. Codex Alimentarius Commission, Roma, Italy (1993)
- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 18th ed. Method 2007.01. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (2010)
- U.S. FDA. Pesticide analytical manual, Vol 1: Multi-residue method, 3rd ed. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA (1999)
- Lee YD. Manual of analytical method for residue pesticide on Korean food standards codex. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Korea. pp. 11-25 (2012)