

Research Article



CrossMark

Open Access

GC-ECD/MS를 이용한 농산물 중 Fipronil의 잔류 분석법 개발

안경근¹, 김경하¹, 김기쁨¹, 황영선^{1,2}, 강인규³, 이영득⁴, 정명근^{1*}

¹강원대학교 생약자원개발학과, ²텍사스주립대학교 생물학과

³경북대학교 원예과학과, ⁴대구대학교 생명환경학부

Development of Analytical Method for Fipronil Residues in Agricultural Commodities Using GC-ECD/MS

Kyung-Geun Ahn¹, Gyeong-Ha Kim¹, Gi-Ppeum Kim¹, Young-Sun Hwang^{1,2}, In-Kyu Kang³, Young Deuk Lee⁴, and Myoung-Gun Choung^{1*} (¹Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea, ²Department of Biology, University of Texas-Arlington, Arlington, TX 76019, USA, ³Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea, ⁴Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea)

Received: 14 August 2015 / Revised: 16 October 2015 / Accepted: 23 November 2015

Copyright © 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

BACKGROUND: An analytical method was developed using GC-ECD/MS to precisely determine the residue of fipronil, a phenylpyrazole insecticide used to control a wide range of foliar and soil-borne pests.

METHOD AND RESULTS: Fipronil residue was extracted with acetone from representative samples of five raw products which comprised hulled rice, soybean, Kimchi cabbage, green pepper, and apple. The extract was diluted with saline water, and fipronil was partitioned into *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v) to remove polar co-extractives in the aqueous phase. Florisil column chromatography was additionally employed for final purification of the extract. Fipronil was separated and quantitated by GC-ECD using a DB-17 capillary column. Accuracy of the proposed method was validated by the recovery from crop samples fortified with fipronil at 3 levels per crop in each triplication.

CONCLUSION: Mean recoveries ranged from 86.6% to 106.0% in five representative agricultural commodities. The coefficients of variation were less than 10%. Limit of quantitation of fipronil was 0.004 mg/kg as verified by the recovery experiment. A confirmatory technique using GC/MS with selected-ion monitoring was also provided to clearly identify the suspected residue. Therefore, this analytical method was reproducible and sensitive enough to determine the residue of fipronil in agricultural commodities.

Key words: Fipronil, GC-ECD/MS, Residue

서론

농약은 병해충 및 잡초를 방제하는데 필수적인 요소로써 농산물, 수목 및 임산물을 포함하는 농작물을 해치는 균, 곤충, 응애, 선충, 바이러스, 잡초, 그 밖에 농림수산식품부령으로 정하는 병해충을 방제하는데 사용하는 살균제, 살충제 및 제초제와 농작물 등의 생리 기능의 증진 또는 억제에 사용되는 성장 촉진제, 발아 억제제 등이 있다(MAFRA, 2010). 최근에는 농약의 범위가 넓어져 해충을 포식하는 천적 및 해충에 병을 유발시켜 죽게 하는 병원균 등의 생물자재도 농약에 포함시키고 있으며, 생물공학 기법인 유전자를 재조합하여 병

*Corresponding author: Myoung-Gun Choung
Phone: +82-33-540-3321; Fax: +82-33-540-3329;
E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr

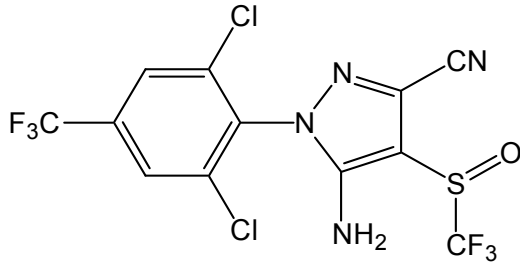


Fig. 1. Chemical structure of fipronil.

해충에 저항성을 갖는 작물체(insect resistant crops) 및 제초제에 저항성을 갖는 작물체(herbicide resistant crops)를 만들어냄으로써 앞으로 농약의 개념은 더욱 넓어질 전망이다(Jeong *et al.*, 2000).

현재 국내에 사용되고 있는 농약의 경우 일부 속효성 약제를 제외하고는 살포 후 일정기간 이상 잔류되는 특성이 있어 최종 수확 농산물에 살포농약이 잔류할 가능성이 있으므로, 살포한 농약들로부터의 안전성 확보는 반드시 이루어져야 할 과제이다(Kwon and Lee, 2003).

농약은 위해요소 중점관리기준(Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP)에서 화학적 위해요소로 분류되고 식품매개질병(food-borne disease)의 화학원인 물질로 검출대상이 되어 있으며, 식품 중 잔류농약의 감시는 농약의 오남용을 감소시키는 가장 중요한 방법 중 하나이다(Ock, 2009).

Fipronil(5-amino-1-(2,6-dichloro- α, α, α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-[(trifluoromethyl)sulfonyl]pyrazole-3-carbonitrile; Fig. 1)은 1985년 프랑스의 Rhône-Poulenc사에 의해 개발되었으며, 1987년 미국에서 특허를 받은 뒤 1993년에 처음 시장에 유통된 해충에 광범위하게 작용하는 phenylpyrazole계 살충제이다(Tomlin, 2006). Fipronil은 완효성의 특성을 나타내며 감귤류, 면, 망고 중의 총채벌레, 사탕수수 및 옥수수의 흰개미류, 곡물, 해바라기, 사탕무의 딱정벌레를 방제하는 데 사용되는 광범위한 살충제이다(Hadjmohammadi *et al.*, 2006). 국내에서는 주로 감자의 방아벌레와 벼의 벼멸바구미, 벼잎물가파리, 벼잎벌레, 애멸구 및 이화명나방의 방제에 사용되고(KCPA, 2015), 국내에서의 농약잔류허용기준(Maximum Residue Limits; MRL)은 0.01-0.1 mg/kg 범위로 설정되어 있다(MFDS, 2014).

Fipronil의 물리화학적 특성으로 *n*-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})는 4.01로 비극성인 중성화합물이며 녹는점은 200.5°C이고 분자량은 437.15(C₁₂H₄C₁₂F₆N₄OS)으로 백색의 분말 형태이다(Tomlin, 2006). 다양한 유기용매에 잘 용해되며(acetone 545.9 g, dichloromethane 22.3 g, ethyl acetate 264.9 g, methanol 137.5 g, toluene 3 g/L), 물에 대한 용해도는 극히 낮아 1.61 mg/L에 불과하다(FAO, 2009).

현재 fipronil의 잔류분석은 HPLC-UVD(High performance liquid chromatograph-Ultra violet detector) 혹은 GC-MS(Gas chromatograph-mass spectrometry)를 이용한

다중농약 분석법이 보고된 바 있으나(Vilchez *et al.*, 2001; Hadjmohammadi *et al.*, 2006; Cella *et al.*, 2012), 선행 연구결과들은 SPE(Solid phase extraction)에 의한 정제과정 적용으로 인해 재현성 및 정제도가 불량할 우려가 있고, 또한 대상농약의 검출을 위한 검출기의 최적화가 이루어지지 않은 것으로 판단되며, 실제 농산물을 대상으로 대상농약의 분석조건 확립 및 회수율 등이 검토된 결과는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 phenylpyrazole계 살충제인 fipronil을 대상으로 정확성 및 정밀성이 확보되고, 다양한 농산물에 적용 가능한 신규 분석체계를 확립하여 국내 잔류농약 검사의 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

본 연구에 사용된 fipronil은 순도 98.8%의 분석용 표준품을 Dr. Ehrenstorfer GmbH(독일)로부터 구입하여 사용하였다. 표준품의 stock solution은 acetone에 녹여 1,000 mg/L의 농도로 조제하여 -20°C의 냉동고에서 보관하고 필요 시마다 *n*-hexane으로 희석하여 사용하였다. J. T. Baker(미국)사로부터 구입한 florisil(60-100 mesh)은 130°C에서 하루 이상 가열하여 활성화한 후 사용하였다. HPLC용 초순수 증류수는 J. T. Baker(미국)사에서 구입하여 사용하였으며, acetone, *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate 및 acetonitrile은 잔류분석용을, 기타 유기용매 및 시약은 시약특급 혹은 잔류분석용을 사용하였다. 감압농축기는 Eyela NE-1000SW(일본)를 이용하였으며 농산물시료의 균질화는 고속 호모게나이저(IKA, Ultra-Turrax T-25, 미국)를 사용하였다.

농산물 시료

식품의 농약 잔류허용기준(MFDS, 2014) 중 fipronil의 사용이 등록 되어있는 농산물을 분석대상으로 하였고, Codex의 잔류분석법 대상 대표 농산물군(Codex, 2003)을 고려하여 과일류는 사과, 채소류는 배추 및 고추, 곡류는 현미, 두류에서는 콩을 대표 농산물로 선정하였다(Lee *et al.*, 2010). 유기농 농산물로 인증된 사과, 배추, 고추, 현미 및 콩의 무농약 시료를 지역의 대형마트에서 구입하여 식품공전상의 검체 처리방법(MFDS, 2012)에 따라 전처리 후 사용하였다. 대조구 시료는 잔류농약 검사를 실시하여 무농약 시료임을 확인하였다.

GC-ECD/MS 기기분석 조건

Fipronil은 분자구조 내에 2개의 chlorine 및 6개의 fluorine을 함유하고 있어 GC(Gas chromatography) 검출기로는 ECD(Electron capture detector)가 최적의 검출기로 판단된다. ECD를 장착한 GC는 Agilent(미국) 6890을 사용하였으며, 내경이 0.53 mm인 capillary column을 이용하여 190°C의 등온조건에서 분석하였다. 시료주입의 경우

Table 1. GC-ECD operating parameters for the analysis of fipronil

Instrument	Agilent 6890 GC
Detector	⁶³ Ni - electron capture detector (ECD)
Column	DB-17 capillary column (0.53 mm i.d. × 30 m, 0.50 μ m film thickness)
Temp.	Column oven : 190°C Detector : 300°C Injector : 280°C
Gas flow rate	Carrier : N ₂ 10 mL/min Make up : N ₂ 60 mL/min Detector purge : N ₂ 5.5 mL/min
Sample size	1 μ L Direct injection

Table 2. GC-MS operating parameters for the confirmation of fipronil

Instrument	Agilent 7890/7000 GC/MSD Triple Quad
Column	HP-5MS capillary column (0.25 mm i.d. 30 m, 0.25 μ m film thickness) Column oven : programming Rate 1 : from 170°C to 300°C(22 min) at 10°C/min
Temp.	Injector : 300°C Interface : 280°C
Gas flow rate	Carrier : He 1.5 mL/min
Sample size	1 μ L
Injection mode	Splitless
Ionization	Electron ionization (EI), 70 eV
Mass range (m/z)	50 - 500

packed inlet을 이용, 시료 전량을 칼럼 안으로 직접 주입되는 방법을 적용하였다. 잔류분의 재확인용 GC/MS 분석에는 Agilent(미국) 7890/7000 GC/MSD를 사용하였고, 각각의 자세한 분석조건은 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

표준검량선 및 분석정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

Fipronil의 stock solution을 재희석하여 0.005-2 mg/L의 농도가 되도록 표준용액을 각각 조제하고, 각 1 μ L씩 GC-ECD에 주입하여 분석된 피크의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하였다. 또한, 분석기기의 재현성(reproducibility)을 검증하기 위해 0.5 mg/L 수준의 fipronil 표준용액을 GC-ECD에 15회 연속으로 주입하여 크로마토그램에서의 retention time (Rt.)과 피크면적의 변이를 비교해 평가하였다.

분석 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 무농약의 농산물 시료로부터 간섭물질이 존재하지 않음을 확인한 뒤, 분석기기의 정량한계 및 시료량, 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 아래의 계산식에 의해 산출하였고(Ahn *et al.*, 2014), 동일 수준으로 fipronil을 처리하여 회수율을 검토하였다.

$$\text{정량한계 (mg/kg)} = \left[\frac{\text{기기 정량한계 (ng)}}{\text{주입량 (μL)}} \right] \times \left[\frac{\text{시료용액 (mL)}}{\text{시료량 (g)}} \right]$$

시료의 추출 및 분배

25 g의 농산물 시료에 acetone을 100 mL 가하고(콩 및 현

미시료의 경우 추출 30분 전 미리 20 mL의 증류수를 가하여 습윤화 함) 호모게나이저를 이용하여 2분여 동안 고속 마쇄 (12,000 rpm), 추출하였다. 추출물은 여과지(Toyo No. 6, Japan)를 장착한 Büchner funnel 상에서 여과하고, 시료와 호모게나이저 컵을 acetone 40 mL로 세척하여 앞서의 여과액과 합쳤다. 합한 추출액을 1 L 용량의 분액갈때기에 옮겨 담고 포화식염수 50 mL 및 증류수 450 mL를 첨가한 후 *n*-hexane/dichloromethane(20/80, v/v) 100 mL로 분배 추출하였으며, 이를 정치하여 아래층의 *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v)만을 취해 무수 황산나트륨에 통과시켜 탈수한 뒤 40°C에서 감압 농축하여 건고하였다. 현미 및 콩을 제외한 시료의 건고물은 dichloromethane 10 mL에 재용해하여 florisil 흡착 크로마토그래피에 직접 공시하였다. 현미 및 콩 시료의 건고물은 미리 acetonitrile로 포화시켜둔 *n*-hexane 40 mL에 재용해하여 250 mL 용량의 분액갈때기에 옮겨 담고 미리 *n*-hexane으로 포화시켜둔 acetonitrile 40 mL로 3회 분배 추출하였다. 앞서의 acetonitrile 추출액을 40°C에서 감압 농축하여 건고하였으며, dichloromethane 10 mL에 재용해한 잔류물은 florisil 흡착 크로마토그래피에 공시하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피

130°C에서 하루 이상 가열하여 활성화시킨 florisil 10 g을 길이 40 cm, 내경 1.5 cm의 유리칼럼에 건식 충전한 후, 그 위에 3 g의 무수 황산나트륨을 첨가하였다. 칼럼에 dichloromethane

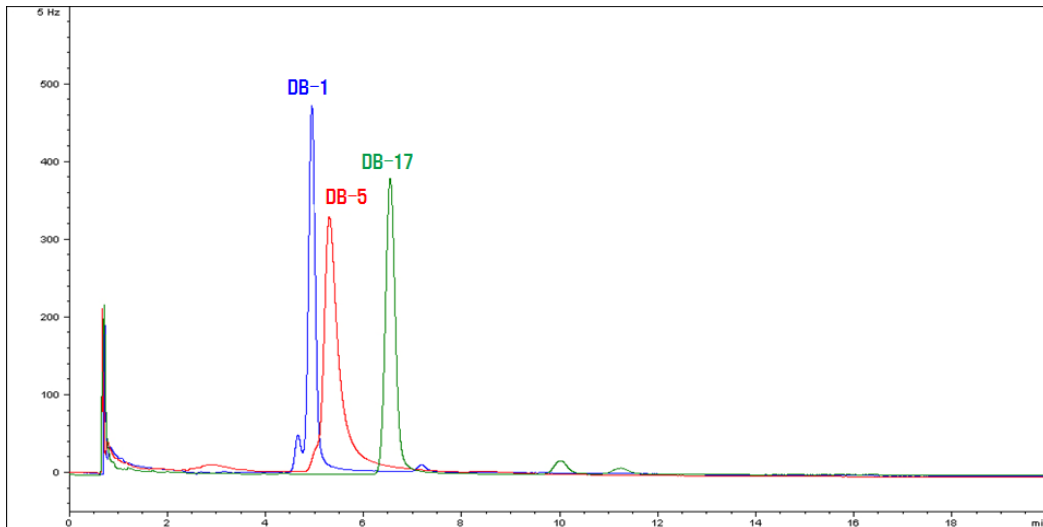


Fig. 2. GC-ECD chromatograms of fipronil using typical capillary columns (1 μ L of 0.1 mg/L in *n*-hexane).

50 mL를 가하여 상단에 소량의 dichloromethane 만이 남을 정도로 유출시켜 버린 후 dichloromethane 10 mL에 녹인 시료 용액을 가하여 약 3 mL/min의 유속으로 흘렸다. 충전제의 표면이 노출되기 직전 다시 dichloromethane 100 mL를 첨가하여 유출시켜 버리고 재차 dichloromethane/ethyl acetate 혼합용액(97/3, v/v) 150 mL를 유출시켜 fipronil 성분을 회수하였다. Fipronil이 유출된 분획은 40°C에서 감압 농축, 건조하고 잔류물을 *n*-hexane 10 mL에 재용해하여 GC-ECD로 분석하였다.

대표 농산물에 대한 fipronil의 회수율 시험

본 연구에서 확립한 fipronil 잔류분석법에 대한 신뢰성 및 효율 검증을 위해 실제 농산물 시료를 이용한 회수율 시험을 수행하였다. 즉 마쇄 혹은 분쇄한 각 25 g의 각 대표 농산물 무농약 시료에 대한 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배에 해당하는 fipronil 표준용액을 각각 3반복으로 처리 후 상기의 분석과정을 수행하여 회수율과 분석오차를 측정하였다.

결과 및 고찰

GC-ECD 분석조건의 확립

GC-ECD를 이용한 fipronil 분석의 최적 column을 선정하기 위해 column의 극성별로 분리양상을 확인하였다. Phenylsiloxane/methylsiloxane의 비율별로 극성을 달리하여 분리능을 검토한 결과, methylsiloxane 함유량이 각각 100% 및 95%인 DB-1 및 DB-5 capillary column보다 methylsiloxane 함유량이 50%인 비교적 극성인 DB-17 capillary column에서 Fig. 2에 나타난 바와 같이 fipronil의 감도 및 분리능이 가장 우수하였다. DB-17 칼럼에서 fipronil의 머무름 시간은 190°C 등온조건에서 약 6.5분이었다. 본 분석법의 개발목적이 분석방법의 정확성 및 재현성 향상, 아울러 단시간 내에 분석 작업이 수행되어야 하는 일상적

Table 3. Reproducibility of peak area and retention time of fipronil using GC-ECD

Parameter	Retention time (min)	Peak Area (Hz)
Minimum	6.518	23788.8
Maximum	6.531	24528.6
Mean	6.525	24076.6
SD	0.00	163.05
CV (%)	0.06	0.68

*Abbreviations : SD, standard deviation; CV, coefficient of variance.

공정 분석에 적용 가능한 분석방법 이므로, 분석결과의 정확성 및 재현성을 고려하여 내경이 0.53 mm인 capillary column을 사용하고, 주입된 시료의 전량이 column으로 도입되는 직접주입법(direct injection) 및 등온조건을 선정하였다.

분석기기의 정량한계는 크로마토그램에서 피크로 나타난 대상 성분의 분석결과를 수치화하여 객관화 및 신뢰할 수 있는 한계의 농도로서, 크로마토그램에서 검출된 피크의 signal/noise (S/N) 비가 최소 10 이상인 성분의 농도를 나타낸다 (Fong *et al.*, 1999; Miller, 2005). 상기에서 확립한 GC-ECD 조건 (Table 1)으로 fipronil 표준용액을 분석한 후 S/N 비를 산출한 결과, 기기상의 정량한계(S/N \geq 10)는 0.01 ng 이었다.

한편 0.5 mg/L의 표준용액을 GC-ECD에 15번 연속 주입, 분석하여 기기분석 시 안정성 및 재현성 평가를 위한 머무름시간(retention time) 및 피크 면적(peak area)의 변이 계수(CV, %)를 확인한 결과, 두 크로마토그래피 척도 모두 최대 0.68%의 오차를 나타내어 기기분석 시 재현성 있고 안정적인 분석이 가능함을 확인하였다(Table 3).

한편 농도별로 조제한 fipronil의 표준용액(0.005-2 mg/

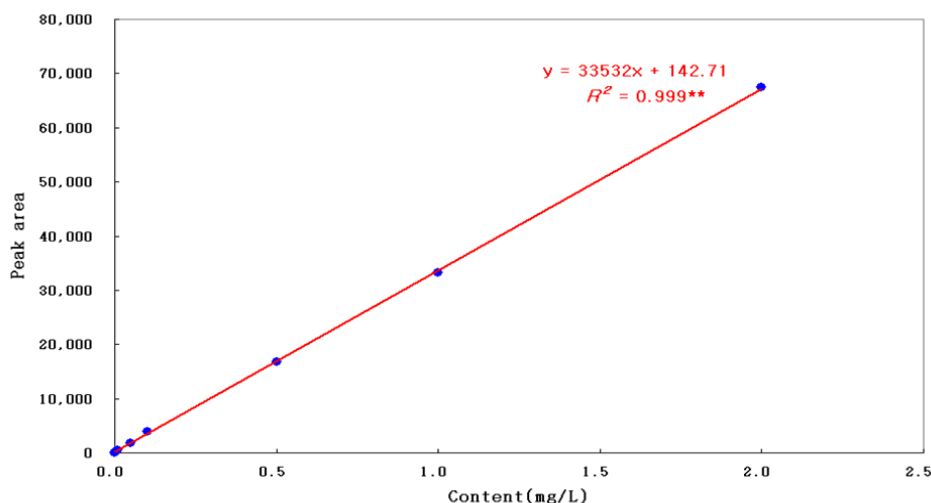


Fig. 3. Calibration curve of fipronil in GC-ECD.

Table 4. Efficiency of liquid-liquid partition of crude extract by different solvents for fipronil

Compound	Recovery (%) ¹⁾			
	Partition I ²⁾	Partition II	Partition III	Partition IV
Fipronil	90.3 ± 1.0	97.7 ± 0.4	99.0 ± 0.7	98.6 ± 1.2

¹⁾ Mean values of triplicate samples.

²⁾ Partition mixture : 150 mL acetone + 50 mL saturated NaCl + 450 mL distilled water.

I, 100 mL *n*-hexane, II, 100 mL *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v), III, 100 mL *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v), IV, 50 mL dichloromethane (×2 times).

Table 5. Efficiency of *n*-hexane/acetonitrile partition for fipronil

Compound	Recovery (%) ¹⁾	
	Partition I ²⁾	Partition II
Fipronil	85.9 ± 0.8	91.9 ± 0.4

¹⁾ Mean values of triplicate samples.

²⁾ Partition mixture : 20 mL *n*-hexane saturated with acetonitrile.

I, 40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (×2 times), II, 40 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane (×3 times).

L)을 각각 1 μL씩 GC-ECD에 주입, 분석하여 얻은 검량선의 회귀방정식은 $y=33532x+142.71$ ($R^2=0.999^{**}$)로 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 즉 fipronil은 기기정량한계의 1/2 수준인 0.005 ng에서부터 그 400배인 2 ng까지의 표준 검량선에 대한 회귀계수가 $R^2=0.999^{**}$ 이상으로 정량의 직선성이 우수하였으므로 광범위한 범위의 농도에서 농산물 시료 내 잔류량을 비례적으로 산출하는 것이 가능하였다.

시료 추출 및 분배과정의 확립

농산물 시료 중 fipronil 성분을 추출하기 위한 용매는 acetone으로 선정하였다. Acetone은 비극성 농약의 추출에 흔히 사용되는 표준적인 용매로써 농약 잔류물의 추출에 대

한 효율성 및 재현성이 인정된 바 있다(Lee *et al.*, 2010).

농산물의 추출액에서 대상 성분 외에 추가적으로 함께 추출되는 방해물질을 제거하기 위한 1차적 조정제법으로는 액-액 분배법을 적용하였다(Ahn *et al.*, 2014). 즉 수용성의 유기용매 추출액에 다량의 증류수/포화식염수를 첨가하여 희석한 후 직접 비극성 유기용매로 분배 및 추출하는 방법을 사용하였는데, 이는 US FDA법이나 AOAC법에서 중간-비극성 농약 성분에 보편적으로 사용되는 방법이며, 추출액을 농축하는 번거로운 과정을 생략할 수 있는 장점이 있다(AOAC, 2000; Lee *et al.*, 2008).

액-액 분배법의 분배용매로는 *n*-hexane, 2종의 *n*-hexane/dichloromethane 혼합액 및 dichloromethane 등 4종(Lee *et al.*, 2011)의 용매계를 공시하여 대상 성분에 대한 분배효율을 검토하였다(Table 4). 액-액 분배조건에 의한 대상 성분의 분배효율을 확인한 결과, 100 mL의 *n*-hexane으로 분획 시 fipronil의 회수율은 90.3%, 100 mL의 *n*-hexane/dichloromethane (80/20, v/v) 분획 시 97.7%, 100 mL의 *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v) 분획 시 99.0%, dichloromethane 50 mL로 2회 반복하여 분획하였을 때 98.6%를 나타내어 가장 우수한 회수율을 나타낸 *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v) 100 mL (분배용매 III) 조건을 fipronil 분배용매로 선정하였다.

n-Hexane/dichloromethane (20/80, v/v) 액-액 분배과정

Table 6. Elution profile of fipronil on florisil column chromatography

Elution solvent (v/v)	Recovery (%) ¹⁾			
	0 - 50 mL	51 - 100 mL	101 - 150 mL	Total
CH ₂ Cl ₂	0.0	0.0	0.0	0.0
99 : 1 ²⁾	27.6	45.6	12.4	85.6
97 : 3 ²⁾	79.3	11.5	0.0	90.8
95 : 5 ²⁾	86.9	4.3	0.0	91.2
93 : 7 ²⁾	89.1	2.6	0.0	91.7

¹⁾ 10 g of activated florisil (60 - 100 mesh) was packed without solvent.

²⁾ Pre-washed with 100 mL of dichloromethane, and then eluted dichloromethane/ethyl acetate (v/v).

Table 7. Recoveries of fipronil with different crop samples

Crop	Fortification (mg/kg)	Recovery (%) ¹⁾	CV (%)	LOQ (mg/kg)
Apple	0.004	106.0 ± 3.8	3.6	0.004
	0.04	88.4 ± 2.9	3.3	
	0.2	87.8 ± 0.9	1.0	
Kimchi cabbage	0.004	105.3 ± 6.0	5.7	0.004
	0.04	87.0 ± 0.5	0.6	
	0.2	92.5 ± 1.9	2.0	
Green pepper	0.004	96.8 ± 2.5	2.6	0.004
	0.04	95.6 ± 1.0	1.1	
	0.2	86.6 ± 2.8	3.2	
Hulled rice	0.004	99.1 ± 3.7	3.7	0.004
	0.04	100.4 ± 0.3	0.3	
	0.2	94.1 ± 2.0	2.2	
Soybean	0.004	99.6 ± 4.9	4.9	0.004
	0.04	87.2 ± 1.8	2.0	
	0.2	93.4 ± 0.7	0.8	

¹⁾ Mean values of triplicate samples with standard deviations.

을 통해 시료 내 포함되어 있는 상당량의 극성물질과 기타 방해물질이 제거되었으리라 예상되나, 유지성분은 *n*-hexane/dichloromethane (20/80, v/v) 층으로 대상성분과 더불어 분배되므로 제거되지 않는다. 유지성분은 기기분석 수행 시 치명적인 간섭 혹은 분리용 칼럼과 검출기에 대해 급격한 열화를 유발하므로 반드시 제거해야 되는 간섭물질이다. 대상 농산물 중 현미 및 콩은 유지성분이 약 1-3% 및 20% 수준 포함되어 있는 시료이므로 이런 유지성분 제거를 위하여 *n*-hexane/acetonitrile 액-액 분배법을 추가하였다(US FDA, 1999; AOAC, 2000). Table 5와 같이 미리 *n*-hexane으로 포화 시킨 acetonitrile을 이용하여 3회 분배하였을 시 fipronil의 전량 회수가 가능하였으므로 유지성분 및 비극성 간섭물질을 제거하기 위한 *n*-hexane/acetonitrile 액-액 분배법은 분배 조건 II로 설정하였다. 한편 유지성분의 함량이 0.1-0.4%로 비 유지 시료에 해당하는 사과, 고추 및 배추에서는 제거되는 비극성 불순물과 유지성분의 양이 극히 작고, 크로마토그램에서

그 정제의 효과 또한 미미하였으므로 *n*-hexane/acetonitrile 액-액 분배과정을 생략하였다.

Florisil 흡착 크로마토그래피 정제조건 최적화

농산물에 포함된 fipronil의 잔류분석 시 상기의 액-액 분배과정과 *n*-hexane/acetonitrile 분배과정으로 인해 대부분의 불순물 및 비극성 간섭물질이 제거되었으리라 판단되나, 각각의 농산물 시료에 따라 유래되는 다양한 기타 불순물들이 존재하므로 추가적 정제과정이 필요하다고 판단되어 흡착 크로마토그래피에 의한 정제법을 검토하였다. 잔류농약 분석 시 정제과정에 가장 많이 이용되는 방법으로는 흡착크로마토그래피를 들 수 있으며(Lee *et al.*, 2010; Ahn *et al.*, 2014), 흡착제 중에서는 florisil, silica gel 및 alumina 등이 가장 많이 사용된다. 이 중 florisil은 지방 및 색소의 제거에 뛰어난 특성으로 인해 미국의 FDA(1999)나 AOAC(2000) 등에서 가장 보편적으로 사용하는 방법이다.

본 연구에서는 florasil을 흡착제로 선택하였고 용매의 극성조절을 위해 dichloromethane/ethyl acetate의 용매체계를 이용하여 정제조건을 최적화 하였다(Table 6). 극성을 순차적으로 조절한 용매체계를 이용하여 fipronil의 회수율을 검토한 결과 dichloromethane 100 mL로 pre-washing한 후 dichloromethane/ethyl acetate 혼합액(97/3, v/v) 150 mL로 용출할 경우 fipronil의 회수율은 90.8%였으며, ethyl acetate의 비율을 높여 용출용매의 강도를 높여도 회수율의 개선정도는 미미하였다. 따라서 florasil 흡착크로마토그래피법을 이용한 간섭물질 제거를 위한 추가적인 정제법은 상기의 방법으로 적용하였다.

농산물 시료 중 fipronil의 분석 정량한계 및 회수율

Fig. 4는 본 연구에서 확립한 시료의 추출, 정제 및 기기 분석 과정을 무농약 농산물 시료에 적용한 결과이다. 최종 무농약 농산물 시료용액에서 대상농약 성분과 동일한 머무름 시간대에 간섭물질이 존재하지 않음을 확인하였으며, 분석기기의 정량한계, 시료량 및 분석과정 중의 농축배율을 계상하여 본 분석법의 정량한계를 산출하였다.

본 연구에서 산출된 fipronil의 정량한계는 0.004 mg/kg이었으며, 국제기준인 Codex(Codex Alimentarius Commission,

2003)와 식품공전 잔류농약분석법 실무 해설서(Lee, 2012)에서 제안하는 잔류농약 분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 허용기준의 1/2 이하의 정량한계 기준을 만족하였다.

각 농산물의 무처리 시료에 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배의 농도가 되도록 fipronil 표준용액을 첨가하고, 상기에서 확립한 분석방법에 따라 대표 농산물을 3반복으로 분석하여 fipronil의 회수율을 조사한 결과 정량한계 수준에서는 96.8-106.0%, 정량한계 10배 수준에서는 87.0-100.4%, 정량한계 50배 수준에서는 86.6-94.1%의 양호한 회수율을 나타내었고, 재현성 역시 양호하여 반복 분석 시 변이는 최대 5.7%로 조사되었다. 따라서 처리수준과 농산물 시료의 종류에 상관없이 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 범위와 분석오차 10% 이내를 만족하는 결과를 확인하였다(Table 7).

이상의 결과에서 볼 때 본 연구에서 확립된 fipronil의 분석법은 국내 외 농산물의 잔류농약 분석과 검사에 충분히 적용 가능함을 확인하였다.

GC/MS를 이용한 잔류분의 재확인

확립한 분석법의 신뢰성 및 정확성을 확보하기 위해 GC/MS에 의한 재확인 과정을 추가하였다. Narrow bore capillary column을 사용하여 표준용액을 주입, Fig. 5와 같이

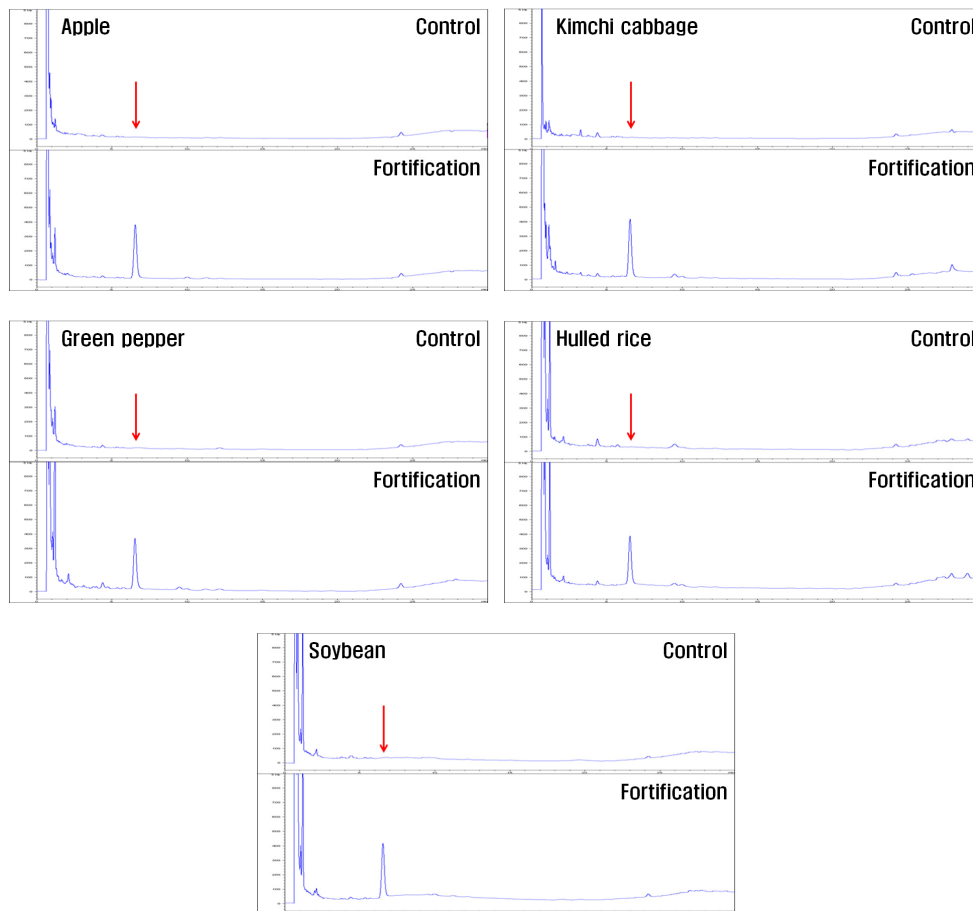


Fig. 4. GC-ECD chromatograms of typical agricultural commodity extracts for the analysis of fipronil, fortified at ten-fold of LOQ level.

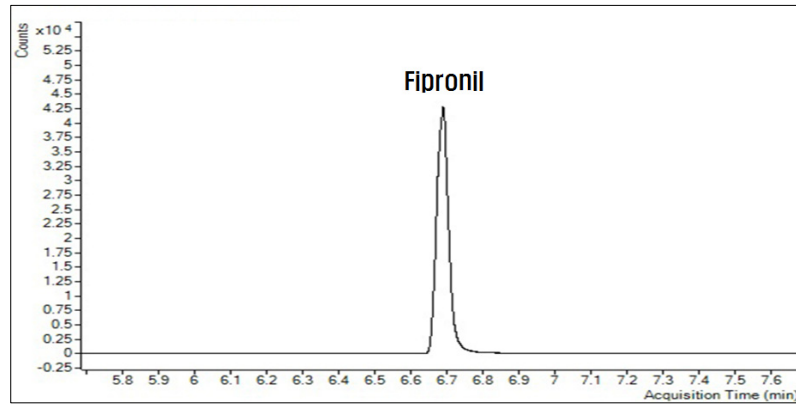


Fig. 5. Total-ion chromatogram (TIC) of fipronil in GC/MS.

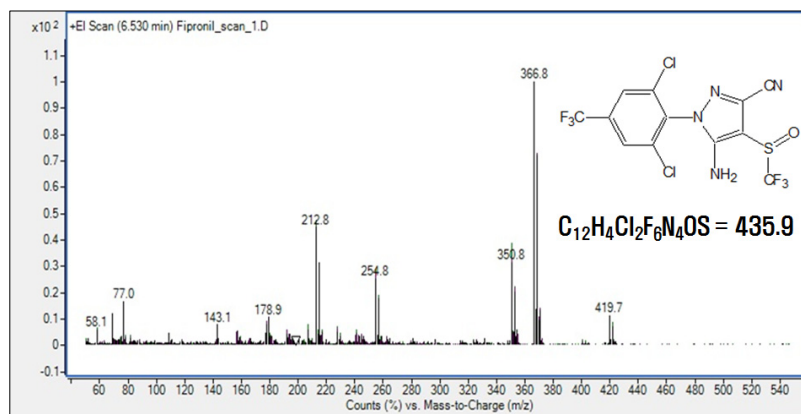


Fig. 6. EI mass spectrum of fipronil.

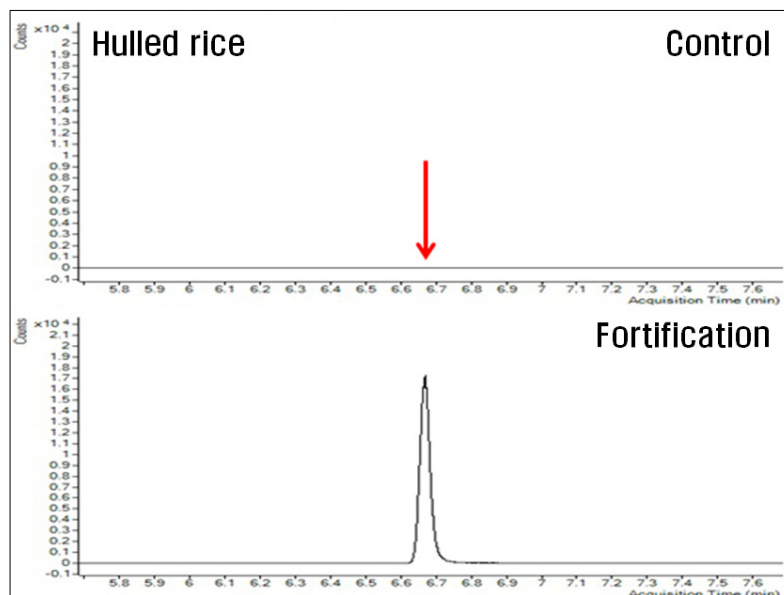


Fig. 7. SIM chromatogram of hulled rice extract for the confirmation of fipronil, fortified at ten-fold of LOQ level.

GC/MS의 TIC(total-ion chromatogram)를 얻었으며, TIC로부터 EI spectrum(Fig. 6)을 조사한 결과 $[M]^+$ ion인 435.9는

intensity가 낮아 관찰되지 않았으나, $[M-CF_3]^+$ ion인 366.8, $[M+2-C_4H_2F_3N_2OS]^+$ ion인 254.8 및 $[M-C_5F_3H_2N_4OS]^+$ ion

212.8은 충분한 intensity로 관찰되어 fipronil의 분자구조를 EI spectrum을 통해 명확히 확인할 수 있었다. Fig. 7은 본 실험에 사용된 대표적 농산물 중 현미에 함유된 fipronil의 잔류분을 재확인한 selected-ion monitoring(SIM) chromatogram이며, 본 연구에 사용된 모든 농산물 시료의 무처리 시료에서는 대상 농약성분과 일치하는 피크가 전혀 관찰되지 않았고, 인위로 첨가된 시료에서는 동일한 머무름 시간대에 명확하게 fipronil의 잔류분만을 재확인할 수 있었다.

따라서 본 연구에서 검토한 GC/MS의 SIM 조건은 GC-ECD를 이용한 정량법과 함께 fipronil 잔류분의 추가적인 정성분석법으로도 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

요약

본 연구는 GC-ECD/MS법을 적용하여 농산물에 함유된 phenylpyrazole 살충제 fipronil의 잔류 분석법을 확립하였다. 대표 농산물은 사과, 고추, 배추, 현미 및 콩을 선정하였고, acetone에 의해 추출된 fipronil 성분을 *n*-hexane/dichloromethane 액-액 분배법과 florisisil 흡착크로마토그래피법으로 정제하여 분석시료로 사용하였다. Fipronil의 정량적 분석을 위한 최적 GC-ECD 분석 조건을 확립하였으며 정량한계(LOQ)는 0.004 mg/kg이었다. 각 대표 농산물에 대해 정량한계, 정량한계의 10배 및 50배 수준에서 회수율을 검토한 결과, 모든 처리농도에서 86.6-106.0% 수준을 나타내었고, 반복 간 변이계수(CV)는 최대 5.7%를 나타내어 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 및 분석오차 10% 이내를 충족시키는 결과를 도출하였으며, GC/MS/SIM을 이용하여 실제 농산물 시료에 적용하여 재확인하였다. 이상의 결과로 신규 fipronil의 GC-ECD/MS 분석법은 검출한계, 회수율 및 분석오차 면에서 국제적 분석기준을 만족하는 신뢰성이 확보된 정량 분석법으로 사용 가능할 것이다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of Ministry of Food and Drug Safety(Project No.: 13162MFDS010), Republic of Korea in 2015.

References

- Cella, A. L., Moura-Andrade, G. C. R., Freguglia, R. M. O., & Tornisielo, V. L. (2012). Evaluation of organochlorine pesticide residues and fipronil in Corumbataí river basin, Piracicaba, São Paulo, Brazil. *Journal of pharmacy*, 2(5), 61-66.
- Codex Alimentarius Commission. (2003). Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Rome, Italy.
- Fong, W. G., Moye, H. A., Seiber, J. N., & Toth, J. P. (1999). Pesticide residues in food: Methods, technologies, and regulations. pp. 3-4, 40-44, Canada.
- Hadjmohammadi, M. R., Nikou, S. M., & Kamel, K. (2006). Determination of fipronil residue in soil and water in the rice fields in north of Iran by RP-HPLC method. *Acta Chimica Slovenica*, 53(4), 517-520.
- Korea Crop Protection Association, (2015). Using guideline of crop protection agents, p. 735. Korea Crop Protection Association, Korea.
- Kwon, C. H., & Lee, Y. D. (2003). Terminal residues of monocrotophos and phosphamidon in apples. *Life Science Research*, 1(3), 277-286.
- Lee, J. H., Park, H. W., Keum, Y. S., Kwon, C. H., Lee, Y. D., & Kim, J. H. (2008). Dissipation pattern of boscalid in cucumber under greenhouse condition. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 12(1), 67-73.
- Lee, S. J., Hwang, Y. S., Kim, Y. H., Kwon, C. H., Do, J. A., Im, M. H., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2010). Determination of Captan, Folpet, Captafol and Chlorothalonil Residues in Agricultural Commodities using GC-ECD/MS. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 29(2), 165-175.
- Lee, S. J., Kim, Y. H., Hwang, Y. S., Kwon, C. H., Do, J. A., Im, M. H., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2010). Determination of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 14(1), 37-48.
- Lee, S. J., Kim, Y. H., Song, L. S., & Choung, M. G. (2011). Determination of Ametryn Residue in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 15(2), 125-133.
- Lee, S. J., Kim, Y. H., Song, L. S., Hwang, Y. S., Lim, J. D., Sohn, E. H., Im, M. H., Do, J. A., Oh, J. H., Kwon, K. S., Lee, J. K., Lee, Y. D., & Choung, M. G. (2011). Development of analytical method for Fenoxycarb, Pyriproxyfen and Methoprene residues in agricultural commodities using HPLC-UVD/MS. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 15(3), 254-268.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. 2nd ed. pp. 286-287, John Wiley & Sons, USA.
- Ock, H. S. (2009). Developmental trend of analytical methods for pesticide residues. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 13(4), 336-348.
- Tomlin, C. D. S. (2006). *The pesticide manual: a world compendium*. 14th ed. pp.462-464, Hampshire, England.
- Vilchez, J. L., Prieto, A., Araujo, L., & Navalon, A. (2001). Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919(1), 215-221.